

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年4月4日(04.04.2013)



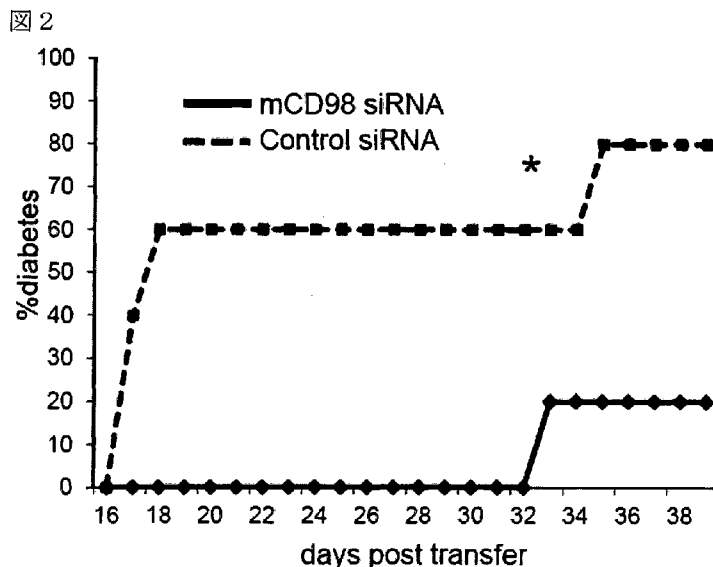
(10) 国際公開番号
WO 2013/047889 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/075587
- (22) 国際出願日: 2012年9月26日(26.09.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願 2011-210392 2011年9月27日(27.09.2011) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人徳島大学(THE UNIVERSITY OF TOKUSHIMA) [JP/JP]; 〒7708501 徳島県徳島市新蔵町2丁目2番地 Tokushima (JP).
- (72) 発明者: 安友 康二(YASUTOMO, Koji); 〒7708503 徳島県徳島市新蔵町3丁目1番地の15 国立大学法人徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部医療創生科学部門生体防御医学分野内 Tokushima (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
 — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

[続葉有]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING AUTOIMMUNE DISEASES

(54) 発明の名称: 自己免疫疾患治療用医薬組成物



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a pharmaceutical composition and a treatment method both for treating/preventing autoimmune diseases. It is found that a pharmaceutical composition containing siRNA that can inhibit the expression of a CD98 heavy chain is useful for the prevention/treatment of autoimmune diseases. As a result, it becomes possible to provide a novel treatment method using the siRNA for autoimmune diseases such as type-1 diabetes and rheumatoid arthritis.

(57) 要約: 本発明は、自己免疫疾患の治療・予防のための医薬組成物および治療法を提供することを目的とする。CD98重鎖を発現抑制するsiRNAを含有する医薬組成物が、自己免疫疾患の予防・治療に有用であることを見出した。その結果、自己免疫疾患として1型糖尿病や関節リウマチなどの自己免疫疾患に上記siRNAを使用する新たな治療方法を提供できるようになった。

WO 2013/047889 A1

- 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称

自己免疫疾患治療用医薬組成物

5 技術分野

本発明は、CD98に関する機能性核酸の新規用途に関する。より詳細には、本発明は、CD98のsiRNAを用いた自己免疫疾患治療用医薬組成物に関するものである。更に詳しくは、糖尿病治療剤（特に1型糖尿病）や関節リウマチ治療用医薬組成物に関するものである。

10

背景技術

CD98とは、細胞膜上に幅広く発現している約120kDaのヘテロ2量体の糖タンパク質であり、アミノ酸輸送、増加した細胞膜発現とインテグリンが仲介する接着に付随する細胞融合に関連すると考えられている。CD98の構造は、約80kDaII型膜貫通型タンパク質CD98hc（重鎖：4F2hc、SLC3A2）と6種類ある約40kDaの軽鎖（LAT1、LAT2、y+LAT1、y+LAT2、xCT、asc）の1つとジスルフィド結合によるヘテロ2量体を構成し、アミノ酸トランスポーターとして機能している。CD98の重鎖（CD98hc）は細胞膜に2量体を移動させる役割を持ち、軽鎖（lc）がトランスポーターの機能を持つと考えられている。

20

CD98hcは、最初、T細胞活性化抗原として発見されたものであり、様々な機能を持った糖タンパク質である。その機能としては、増殖中リンパ球、腫瘍細胞、その他の増殖能の高い細胞で高発現し、腫瘍形成を促進するインテグリン依存性シグナルに重要な役割を果たしている。

25

CD98が関与するアミノ酸輸送システムは、基質となるアミノ酸分子の多様性を反映して6種類のトランスポーター（約40kDaの軽鎖）の一つから構成されており、その輸送基質選択性とNa⁺依存性により種々の輸送系に分類されている。例えば、中性アミノ酸輸送系L、小型中性アミノ酸輸

送系 a s c、中性および塩基性アミノ酸輸送系 y + L、シスチン、塩基性および中性アミノ酸輸送系 x - c に相当する特定のトランスポーター (LAT 1, LAT 2, y + LAT 1, y + LAT 2, xCT, a s c) とジスルフィド結合している。そして、CD 9 8 重鎖は、上皮細胞の血管側の細胞膜に存在し、上記のトランスポーターを上皮細胞の血管側の細胞膜へ移送する働きをしている。

また、CD 9 8 は、多種の癌細胞で高発現していることが知られている。その理由として、癌細胞は細胞増殖を促進させるために、増殖に必要な必須アミノ酸を積極的に取り込む必要があるため、そこで中性アミノ酸トランスポーターが過剰発現していると考えられる。例えば、癌細胞に特異的に高く発現しているアミノ酸トランスポーターとして、L - type amino acid transporter 1 (LAT 1) がクローニングされている (Kanai et al., J. Biol. Chem. (1998), 273, 23629 - 23632)。LAT 1 は、CD 9 8 重鎖と複合体を形成し、ロイシン、バリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、ヒスチジン等の大型の側鎖を持つ中性アミノ酸をナトリウムイオン非依存的に輸送する機能を有している。このLAT 1 は、脳、胎盤、骨髄、精巣を除く殆どの正常組織において、その発現が低いか、あるいは認められないものであるが、大腸癌、胃癌、乳癌、膵癌、腎癌、喉頭癌、食道癌、肺癌等のヒト悪性腫瘍組織では、CD 9 8 と共に発現が亢進していることが知られている (非特許文献 1)。

そこで、CD 9 8 重鎖や軽鎖 (LAT 1) の発現を低下させ、アミノ酸取り込みを抑制すると、腫瘍の増殖が抑えられることが考えられた。即ち、軽鎖 (LAT 1) の発現を低下させると、腫瘍の増殖抑制が起きることが癌移植マウスモデルで報告されている (特許文献 1)。そこで、LAT 1 の活性を抑えることは癌の治療法に有望であると考えられた。

また、CD 9 8 (重鎖と軽鎖の複合体) のアミノ酸輸送を抑制するため、抗 CD 9 8 抗体を用いた癌細胞の抑制効果が癌移植マウスモデルで報告されている (特許文献 2、3)。このように、抗 CD 9 8 抗体を使用して、抗癌剤

として使用する試みについては、色々取り組みが行われている。しかし、抗癌剤以外の用途に関する取り組みは、ほとんど行われていない状況である。

しかも、s i R N Aを用いてC D 9 8の発現を抑制し、上記抗癌剤等に関する治療効果を評価する試みについては、全く行なわれていない状況である。

5

先行技術文献

特許文献

特許文献1：特開2000-157286号公報

10 特許文献2：特開2009-189376号公報

特許文献3：WO2007/114496号パンフレット

非特許文献

15 非特許文献1：Yanagida et al., Biochem. Biophys. Acta, (2001), 1514, 291-302

発明の概要

発明が解決しようとする課題

20 本発明は、C D 9 8の機能性核酸による自己免疫疾患の医薬組成物の提供を目的とする。特に、C D 9 8重鎖の発現抑制型のs i R N Aを有効成分とする医薬組成物の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

25 本発明者は、C D 9 8の重鎖を認識するモノクロナール抗体を特定し、このモノクロナール抗体がT細胞の活性化を抑制することを見出した。そして、この抗体は、アミノ酸輸送に影響を与えず、フィブロネクチンを介した細胞接着を抑制することを見出した。そして、この抗体を用いて糖尿病NODマウスを治療したところ、C D 4 ⁺ T細胞の活性化を抑制し、糖尿病の状態を

通常のレベルに戻すことが出来た（PCT/JP2011/057432）。

そこで、本発明者は、CD98重鎖の発現を抑制するsiRNAを用いて、糖尿病NODマウスの治療を行なったところ、CD98の重鎖に対するsiRNAが1型糖尿病の進行を抑制するだけでなく、治療できることを見出した。即ち、これまでインスリンの補充療法以外に適切な治療方法のなかった膵臓β細胞のアポトーシスに基づく1型糖尿病に対して、本抗体が非常に有効であることが示された。更に関節リウマチモデルマウスにCD98重鎖の発現を抑制できるsiRNAを投与したところ、関節炎の発症が抑制されることを確認した。このような知見は、CD98のsiRNAを有効成分として含む医薬組成物が、自己免疫疾患（1型糖尿病や関節リュウマチ等）の治療・予防に有効であることを示すものである。

これらの知見から、本発明のsiRNAは、自己免疫疾患の治療薬として有用であることが示された。本発明者は、以上の知見に基づいて本発明を完成した。

すなわち本発明は以下のとおりである。

(1) CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効成分として含むことを特徴とする自己免疫疾患を予防又は治療するための医薬組成物。

(2) 上記機能性核酸がsiRNAである、上記(1)記載の医薬組成物。

(3) 上記自己免疫疾患が1型糖尿病又は関節リウマチである、上記(1)又は(2)の医薬組成物。

(4) 上記siRNAが二本鎖RNAである、上記(2)記載の医薬組成物。

(5) 上記二本鎖RNAが、配列番号1と配列番号2、配列番号3と配列番号4、あるいは配列番号5と配列番号6の一つ以上を含有するsiRNAである、上記(4)記載の医薬組成物。

(6) 上記二本鎖RNAが、配列番号7と配列番号8、配列番号9と配列番号10、あるいは配列番号11と配列番号12の一つ以上を含有するsiRNAである、上記(4)記載の医薬組成物。

(7) 配列番号1と配列番号2、配列番号3と配列番号4、あるいは配列番号5と配列番号6のいずれかの配列を有する二本鎖siRNA。

(8) 二本鎖RNA部分が、配列番号7と配列番号8、配列番号9と配列番号10、あるいは配列番号11と配列番号12のいずれかの配列を有する二

本鎖 s i R N A。

(9) 哺乳類に、CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効量投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

(10) 上記機能性核酸が、s i R N Aである、上記(9)記載の治療方法。

5 (11) 上記 s i R N Aが、上記(7)または(8)の2本鎖 s i R N Aである、上記(10)記載の治療方法。

(12) 上記自己免疫疾患が、1型糖尿病又は関節リウマチである上記(9)～(11)のいずれかに記載の治療方法。

10 発明の効果

本発明によれば、CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を投与することにより、高い治療効果を得ることができるため、本発明の医薬組成物および治療法は、自己免疫疾患の治療に極めて有用である。特に、これまで効果的な治療方法のなかった、1型糖尿病と関節リウマチに有効である。

15

図面の簡単な説明

20 図1は1型糖尿病を発症したNODマウスのT細胞を重症複合型免疫不全症のNODモデルマウス(NOD-SCIDマウス)に投与する。投与後のマウスに、CD98重鎖に対するマウス s i R N A (4 n m o l / m o u s e)、あるいはコントロールの s i R N Aを、2日目、5日目、8日目に投与する。なお、T細胞を投与した日を起算日とする。

25 図1は、3日後の末梢血単核球細胞のCD98重鎖の発現をフローサイトメトリーで評価した図である。灰色(GRAY)の部分は、CD98抗体を投与した場合の測定結果である。点線部分は、コントロールの s i R N Aを投与した場合の測定結果であり、実線部分は、CD98重鎖に対する s i R N Aを投与した場合の測定結果を示している。

30 図2は1型糖尿病の治療効果を見るために、血糖値を測り、評価した図である。マウス5匹を一群として実験を行い、*印は統計的な有意差を示す(p < 0.05)。点線部分は、コントロールの s i R N Aを投与した場合の結

果であり、実線部分は、CD98重鎖に対するsiRNAを投与した場合の結果である。

図3はリウマチモデルマウス(コラーゲン誘導性関節炎モデル)を使用し、siRNAを0日目、1日目、2日目、3日目、4日目に腹腔内投与した結果を表わした図である。マウスsiRNAの投与により、リウマチの発症が
5 大きく軽減された結果が示されている。

図4はヒトTリンパ腫由来のJurkat細胞に対してヒトsiRNAを投与し、細胞表面におけるCD98タンパクの発現の変化を、フローサイトメーターで測定、評価した図である。無処置群、コントロールsiRNA投与群と比較し、ヒトsiRNAを投与することにより、CD98タンパクの
10 発現の抑制が大きく抑制されたことを示している。

発明を実施するための形態

一本発明の第一の態様—

本発明の一つの態様としては、「CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効成分として含むことを特徴とする自己免疫疾患を予防又は治療するための医薬組成物」および「CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効量投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法」が挙げられる。ここで「CD98」は公知のタンパク質であり、DNA配列とアミノ酸配列は、
20 特許文献2等に記載されている。本発明における「CD98」は、これらの配列に限定されるものではなく、CD98の機能が保持される限り、アミノ酸やDNAの変異数や変異部位には制限はないものとする。

本発明において「機能性核酸」とは、タンパク質の発現を抑制できる機能を持ったsiRNA、miRNA、アプタマー、リボザイム、アンチセンス核酸のことを言う。好ましいものとしては、siRNAを挙げることができる。即ち、本発明のsiRNAとは、CD98重鎖の遺伝子発現を抑制するsiRNAをさす。具体的には、対照群(コントロールsiRNAを使用した場合)と比較してCD98の遺伝子発現を50%以上抑制できるsiRNAを、好ましくは80%以上抑制できるsiRNAをいう。siRNAは、
25

RNA干渉と呼ばれる配列特異的な遺伝子発現の抑制を誘導することが知られている。siRNAは、一般的に二本鎖のRNA部分と、センス鎖およびアンチセンス鎖の3'末端のオーバーハング部分から構成される。siRNAは、当業者にとって公知の方法によって設計することができる。例えば、選

5 択したDNA配列（19～21塩基が望ましい）をそのままRNA配列に変換したもの（センス鎖）とそのアンチセンス鎖を二本鎖RNA部分とし、オーバーハング部を付加する。オーバーハング部は、1又は2塩基の任意の核酸（リボ核酸またはデオキシ核酸）であるが、ウリジン（U）もしくはチミジン（dT）が好ましい。本発明のsiRNAは、CD98、好ましくはヒトのCD98重鎖のDNA配列に基づいて設計され、CD98重鎖の発現を抑制できるsiRNAであれば、特に限定されるものではない。発現の抑制は、CD98重鎖に特異的であることが望ましい。特異的であるかどうかは、一般公開されているBLAST検索を実施することにより確認できる。またオーバーハング部分は必須ではない。

15 また本発明のsiRNAには、投与対象内で本発明のsiRNAと同じ効果を有する任意の分子も含まれる。このような分子としては、例えば、shRNAが挙げられる。shRNAとはショートヘアピン構造型のRNAであり、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。二本鎖RNA部分が、本発明のsiRNA

20 と同一構造を有するshRNAも本発明のsiRNAに含まれる。他には、投与対象に投与することによって本発明のsiRNAを発現することができるようなDNAも本発明のsiRNAに含まれる。このようなDNAは、siRNAをコードするDNAを発現ベクター（例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルスなどのベクター）に組み込んで構築して使用される。

25 本発明において、機能性核酸を医薬組成物として使用する場合には、治療薬としての特性を改善するための修飾、あるいはリポソームなどの輸送担体に含包することが望ましい。ポリヌクレオチドの治療薬としての特性を改善するには、ヌクレオチドの修飾または類似体を導入することができる。例えば、ヌクレアーゼ耐性の向上および/または細胞透過性の向上などである。ヌクレアーゼ耐性は、アンチセンス、siRNA、shRNAおよび/またはリボザイムの生理活性を妨げないような技術上周知の任意の方法によりもたら

30

される。ヌクレアーゼ耐性の向上を目的にオリゴヌクレオチドに加えることができる修飾の例としては、リン酸骨格中のヘテロ原子のリンまたは酸素の修飾である。例えば、メチルリン酸、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、およびモルホリノオリゴマーなどである。また、技術上周知の他の修飾により、生理活性は維持したまま、ヌクレアーゼに対する安定性を大幅に高めるようにしてもよい。

更に、本発明において機能性核酸を医薬組成物や治療方法として使用する場合には、機能性核酸そのものを治療に用いる方法と、ベクターを用いて機能性核酸を発現させて治療に用いる方法が存在する。

機能性核酸そのものを治療に用いる場合には、アテロコラーゲン等の安定化剤、pH調節剤などを添加した水溶液を作製し、そのまま非経口で投与することが望ましい。

ベクターを用いて *in vivo* 発現を行なう場合には、特に本発明の治療を必要とする患者体内での発現に際しては、発現ベクター、特に哺乳動物発現ベクターを使用するのが望ましい。発現ベクターは技術上周知であり、好ましくはプラスミド、コスミド、ウイルス発現系を含む。好ましいウイルス発現系の例としてはアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスなどである。また細胞や組織にベクターを導入する方法は技術上周知である。好ましい例としては、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、および組み換えウイルスベクターによる感染などである。

本発明の「哺乳動物」とは、例えばラット、マウス、モルモット等のげっ歯類、例えばイヌやネコ、更には例えばヒトやサルの霊長類を挙げることができる。

本発明の「自己免疫疾患」とは、免疫系が内因性抗原に対する自己抗体を起すことで起こる疾患であり、例えば1型糖尿病、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、乾癬、クローン病、全身性エリテマトーデス、バセドウ病等を挙げることができる。いずれの自己免疫疾患も、T細胞の異常な過剰活性化がその原因となっていることがこれまでの研究から明らかになっている。特に、CD4陽性あるいはCD8陽性のTリンパ球（T細胞）が過剰に活性化し、自己抗体の産生を促したり、組織破壊を引き起こしたりすることが病状の進展に大きな影響を与えることは広く知られている事実である。従って、本発明の *siRNA* が抗CD98抗体と同様にTリンパ球（T細胞）の活性化を抑制することから、本発明の *siRNA* を用いて、上記の自己免疫疾患の治

療を行なうことができる。例えば、図2に示されるように、本発明の siRNA は、1型糖尿病の治療に有効であり、また、図3に示されるように、関節リウマチの治療に有効である。このように、本発明の siRNA は、例えば1型糖尿病、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、乾癬、クローン病、全身性エリテマトーデス、バセドウ病等の自己免疫疾患の治療に使用することができる。以上のように、本発明の siRNA の好ましい用途としては、1型糖尿病、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、乾癬、クローン病、全身性エリテマトーデス、バセドウ病であり、特に好ましい用途として、1型糖尿病あるいは関節リウマチを挙げることができる。

5

10

本発明の「関節リウマチ」とは、関節や骨、筋肉、じん帯、腱などが痛む自己免疫疾患のことを言い、きわめて慢性の経過をたどり治療に難渋することが多いもつとも頻度の高い自己免疫疾患である。関節リウマチは、CD4陽性T細胞が過剰に活性化し、様々なサイトカインを産生することに加えて、CD8陽性T細胞が関節組織を破壊することによって病状が進展することが知られている。そのため、T細胞（Tリンパ球）の活性化抑制作用を持つ、本発明の siRNA は、関節リウマチの治療に好適なものである。

15

20

本発明の「1型糖尿病」とは、主に自己免疫により膵β細胞が破壊され、インスリンの産生が枯渇して、インスリン不足に陥る疾患を言う。また、糖尿病が重症化し、インスリン抵抗性が亢進し、膵臓β細胞が疲弊し、アポトーシスが起り始めると、2型糖尿病から結果として、1型糖尿病に推移して来ることになる。1型糖尿病の発症にはCD4陽性およびCD8陽性T細胞のいずれもが寄与し、最終的にCD8陽性T細胞が膵臓β細胞を破壊することによりインスリンの欠乏が惹起される。従って、T細胞（Tリンパ球）の活性化抑制作用を持つ、本発明の siRNA は、1型糖尿病の予防と治療に好適なものである。

25

30

本発明の医薬組成物により、自己免疫疾患を治療する際には、上記の機能的核酸と共に、通常の製剤学的に許容しうる1又は2種以上の製剤用添加物を用いて医薬組成物を製造して投与することが好ましい。本発明の医薬組成物の投与方法は非経口投与が望ましく、静脈投与、筋肉内投与、腹腔内投与、または皮下投与などを行うことができる。

本発明の機能性核酸の投与量は、投与対象、投与方法等により異なるが、例えば非経口投与する場合は、自己免疫疾患の患者（60kg）に対して、例えば、一日約0.01～30mg、好ましくは約0.1～20mg、より好ましくは約0.1～10mgを静脈注射することができる。

5

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、実施例は本発明をより良く理解するために例示するものであって、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されることを意図するものではない。

10

（実施例1）CD98重鎖の発現抑制用のsiRNAによる1型糖尿病の進行抑制試験

1) 実験材料：

a) 動物：

15

1型糖尿病モデルマウス（NODマウス）：NOD-SCIDマウスは、日本SLC社（浜松、日本）から購入した。すべてのマウスは徳島大学の動物センター内で無菌条件下で飼育され、すべての実験は動物の管理と利用のガイドラインに則って実施された。

20

NODマウスの糖尿病発症状況は、このマウスの尿中の糖濃度と空腹時の血糖値を一週間毎に測定してモニターした。250mg/dl以上の血中濃度を持つマウスが糖尿病であるとした。NODの雌性マウスが20～25週令になると80%以上の割合で、1型糖尿病になる。

b) フローサイトメトリー：

25

脾臓、脾臓リンパ節、脾臓から得られるリンパ球は、CD4、CD8、TCRV α 2とTCRV β 5に対する蛍光色素の結合抗体（eBioscience社、UAS）で染色された。幾つかの実験では、細胞をメモンシンの存在下、250ng/mlのPMA（シグマ社）と1 μ g/mlのイオノマイシン（シグマ社）で5時間刺激し、CD4又はCD8用の表面染色をした。更に、グランザイムB、IFN- γ 又はIL-17用の細胞内染色をした。

30

7-アミノアクチノマイシンD（シグマ社）は、死細胞を除くために使用された。

実験操作は、マニュアルに則って実施した。データは、FACSのコントロール下で集計され、FlowJoソフト（スリースター、米国）を使用して行った。

c) マウス s i R N A :

CD98重鎖の発現抑制用の下記表1の3種のマウス s i R N A の混合物、又は標的遺伝子を持たないコントロールの s i R N A (B - B r i d g e 社) を作製し、使用した。

5 [表1]

s i R N A	番号	センス	アンチセンス
Mouse Sic3a2	SMF27A-2086-1	guacagaggugggucacaTT (配列番号1)	ugugccaccaccucuguacTT (配列番号2)
	SMF27A-2086-2	cuacaaagugccaagaaaaTT (配列番号3)	uuuucuuggcacuuuguagTT (配列番号4)
	SMF27A-2086-3	gggaccagaaugagcguaaTT (配列番号5)	uaacgcucauucuggucccTT (配列番号6)
Negative Control	#1	auccgcgcgauaguacguaTT	uacguacuauccgcgcggauTT
	#2	uuacgcguagcguaauacgTT	cguauuacgcuaacgcguaaTT
	#3	uauucgcgcguauagcgguTT	accgcuaauacgcgcgaauaTT

2) 方法 :

10 上記CD98重鎖の発現抑制用の3種の s i R N A の混合物、又は標的遺伝子を持たないコントロールの s i R N A とアテロコラーゲン (高研、日本) とを実験手順書に従い混合し、 s i R N A 溶液を調製した。

15 糖尿病NODマウスのT細胞が投与された重症複合型免疫不全症モデルマウス (N O D - S C I D マウス) に、上記 s i R N A 溶液を 4 n m o l / マウスになるように腹腔内投与した。 s i R N A の投与スケジュールは、2日目、5日目と8日目である。なお、T細胞が投与された日を起算日とする。上記 s i R N A 溶液の投与後3日目に、血液を採取し、白血球を単離して、抗マウス CD98 抗体で染色して、フローサイトメトリーで評価した。

3) 結果 :

20 フローサイトメトリーでの評価結果を図1に示す。灰色 (G R A Y) の部分は、CD98抗体を投与した場合の測定結果である。点線部分は、コントロールの s i R N A を投与した場合の測定結果であり、実線部分は、CD98重鎖に対する s i R N A を投与した場合の測定結果を示している。

統計解析として、すべての実験において群間の有意差は、マン-ホイットニ U テストを用いて計算された。差が p < 0. 05 の場合に有意差があ

ると考えられる。

また、上記の1型糖尿病モデルマウス（NOD-SCIDマウス）にCD98重鎖のsiRNAを投与した結果を図2に示す。図2に示されるように、このマウスの1型糖尿病の進行をsiRNAの投与で抑制できることが分かった。この結果は、CD98が1型糖尿病の進展に極めて重大な役割を果していることを示すと共に、CD98重鎖をターゲットとするsiRNAを用いた治療が、1型糖尿病や他のT細胞に起因する自己免疫疾患の予防と治療に非常に有効であることを示している。

5

10 (実施例2) CD98重鎖の発現抑制用のsiRNAによる関節リウマチの進行抑制試験

1) 実験材料:

リウマチ・モデルマウス(コラーゲン誘導性関節炎モデルマウス)の作製:

15

DBA/1Jマウス(7週齢の雌、10匹)のそれぞれ2群に分け、牛コラーゲンIIと完全アジュバントを混合乳化させたエマルジョン投与を投与した。更に、26日目に2回目の牛コラーゲンIIを投与し、関節炎の発症を観察評価した。

図3では、その臨床スコアの平均±標準偏差で表している。横軸は二回目のコラーゲン免疫後からの日数を表している。

20

2) 方法:

DBA/1Jマウス(雌性)にII型コラーゲンを投与した日を起算日として、実施例1に記載の3種のsiRNA混合溶液を4nmol/マウスになるように腹腔内投与した。siRNAの投与スケジュールは、0日目、1日目、2日目、3日目と4日目である。

25

なお、siRNA混合溶液は、実施例1に記載のようにsiRNAをアテロコラーゲンと用事調整で混合し、作製後直ちにマウスに投与した。

3) 結果:

30

上記のリウマチモデルマウス(DBA/1Jマウス)にCD98重鎖のsiRNAを投与したところ、図3に示すように、リウマチの進行を抑制できることが分かった。このように、CD98が1型糖尿病の進展に極めて重大な役割を果していることを示すと共に、CD98重鎖をターゲットとするsiRNAを用いた治療が、自己免疫疾患(リウマチ)の予防と治療に非常に有効であることを示している。

(実施例3) CD98重鎖の発現抑制用の siRNAによるヒト白血病T細胞 (Jurkat細胞) のCD98発現進行抑制試験

1) 実験材料:

5 • Jurkat細胞: ヒトCD98タンパクを高発現するJurkat細胞をATCCから購入した。

 • トランスフェクション試薬 (FuGENE8): 非リポソーム系トランスフェクション試薬であるFuGENE8をロシュ・アプライド・サイエンス社から購入した。

10 • ヒト siRNA:
 CD98重鎖の発現抑制用の下記表2の3種のヒト siRNAの混合物の siRNAを作製 (B-Bridge社に依頼) し、使用した。

[表2]

siRNA	番号	センス	アンチセンス
Human CD98	hCD98si#1	cuggucuucaacucuggccTT (配列番号7)	ggccaagaguugaagaccacTT (配列番号8)
	hCD98si#2	cuggugccguggucauaaucTT (配列番号9)	gauuaugaccacggcaccacTT (配列番号10)
	hCD98si#3	gguuccaccacucagguugacTT (配列番号11)	gucaaccugaguggagaaccTT (配列番号12)

2) 方法:

15 Jurkat細胞にCD98に対して上記ヒト siRNAを使用し、FuGENE8をつかって遺伝子導入し、2日後に細胞表面上のCD98発現をFITC標識したヒトCD98抗体を用いて、フローサイトメーターで測定し、非処理を100としたときの発現量を測定した。

3) 結果:

20 Jurkat細胞表面におけるCD98発現の比率をフローサイトメーターにより測定、評価し、その結果を図4に示す。図4に示されるように、コントロール siRNA投与群では、CD98のタンパク発現は非処理群と同じであった。しかし、ヒト siRNAの投与群では、CD98のタンパク発現が約75%抑制された。このことから、これらの3種のヒト siRNAを使用して、1型糖尿病や他のT細胞に起因する自己免疫疾患の予防と治療が
 25 できることを示している。

産業上の利用可能性

本発明の自己免疫疾患の予防・治療用医薬組成物は、s i R N AによるC D 9 8の発現抑制という新たな作用機序により、自己免疫疾患（例えば、1型糖尿病や関節リウマチでなど）を予防・治療し得るものである。本発明の

5 医薬組成物を用いることにより、これまで適切な治療方法がなかった、自己免疫疾患の治療方法に新たな道を開くものとなっている。

請求の範囲

[請求項1]

CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効成分として含むことを特徴とする自己免疫疾患を予防又は治療するための医薬組成物。

5 [請求項2]

上記機能性核酸が siRNA である、請求項1に記載の組成物。

[請求項3]

上記自己免疫疾患が1型糖尿病又は関節リウマチである、請求項1又は2に記載の組成物。

10 [請求項4]

上記 siRNA が二本鎖RNAである、請求項2に記載の医薬組成物。

[請求項5]

上記二本鎖RNAが、配列番号1と配列番号2、配列番号3と配列番号4、あるいは配列番号5と配列番号6の一つ以上を含有する siRNA である、
15 請求項4に記載の医薬組成物。

[請求項6]

上記二本鎖RNAが、配列番号7と配列番号8、配列番号9と配列番号10、あるいは配列番号11と配列番号12の一つ以上を含有する siRNA である、請求項4に記載の医薬組成物。

20 [請求項7]

配列番号1と配列番号2、配列番号3と配列番号4、あるいは配列番号5と配列番号6のいずれかの配列を有する二本鎖 siRNA。

[請求項8]

二本鎖RNA部分が、配列番号7と配列番号8、配列番号9と配列番号10、あるいは配列番号11と配列番号12のいずれかの配列を有する二本鎖
25 siRNA。

[請求項9]

哺乳類に、CD98重鎖の発現を抑制する機能性核酸を有効量投与することを特徴とする自己免疫疾患の治療方法。

[請求項10]

上記機能性核酸が、s i R N Aである、請求項9記載の治療方法。

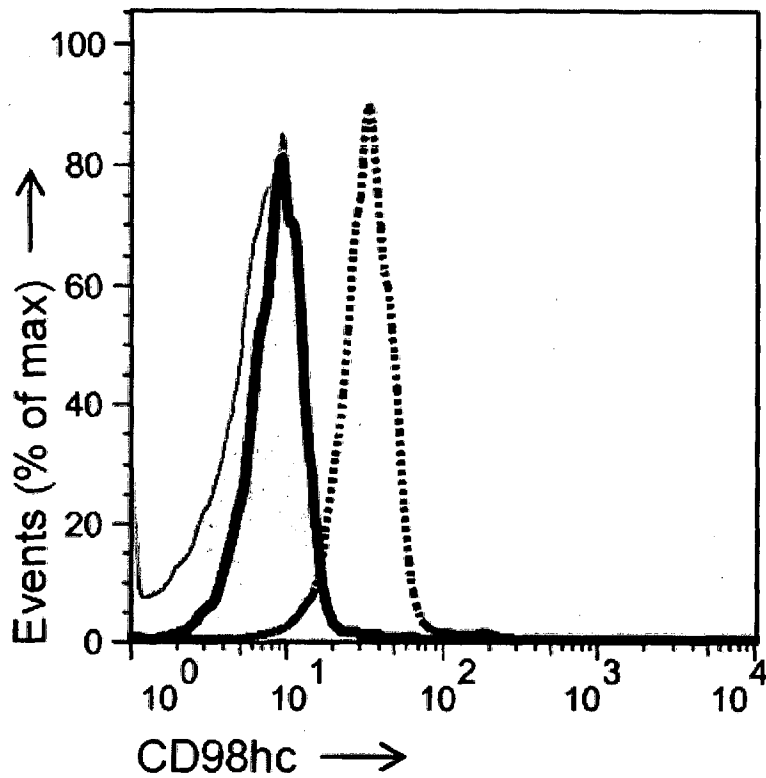
[請求項11]

上記s i R N Aが、請求項7または8の2本鎖s i R N Aである、上記(1
5 0)記載の治療方法。

[請求項12]

上記自己免疫疾患が、1型糖尿病又は関節リウマチである、請求項9～1
1のいずれかに記載の治療方法。

図 1



Gray; unstained
 Bold; CD98 siRNA
 Dot; Control siRNA

図 2

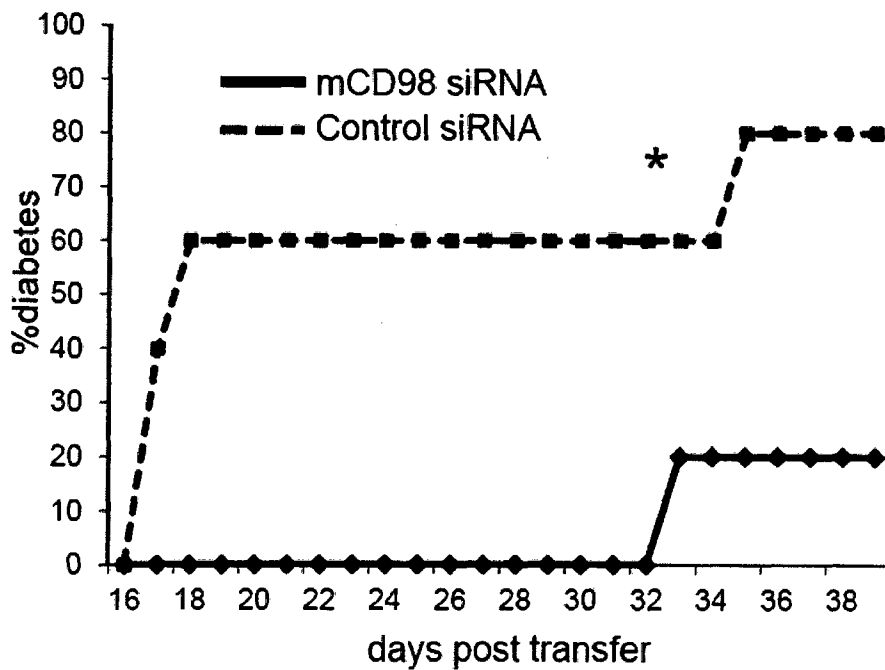


図 3

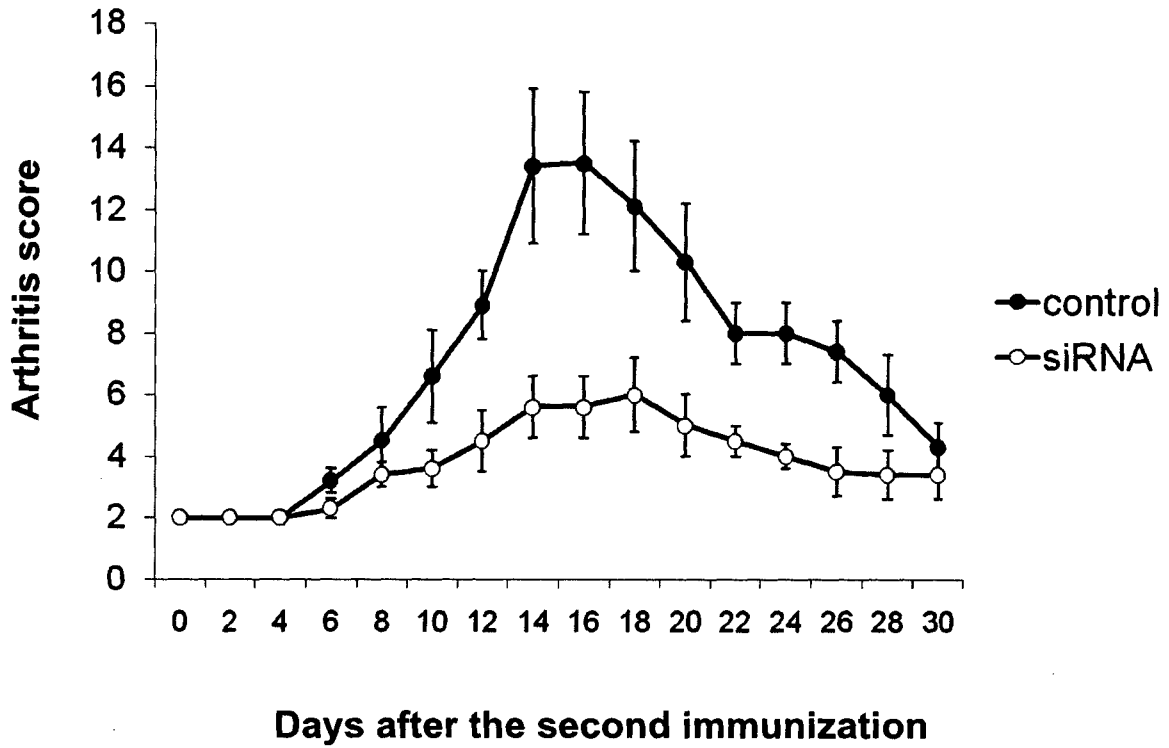
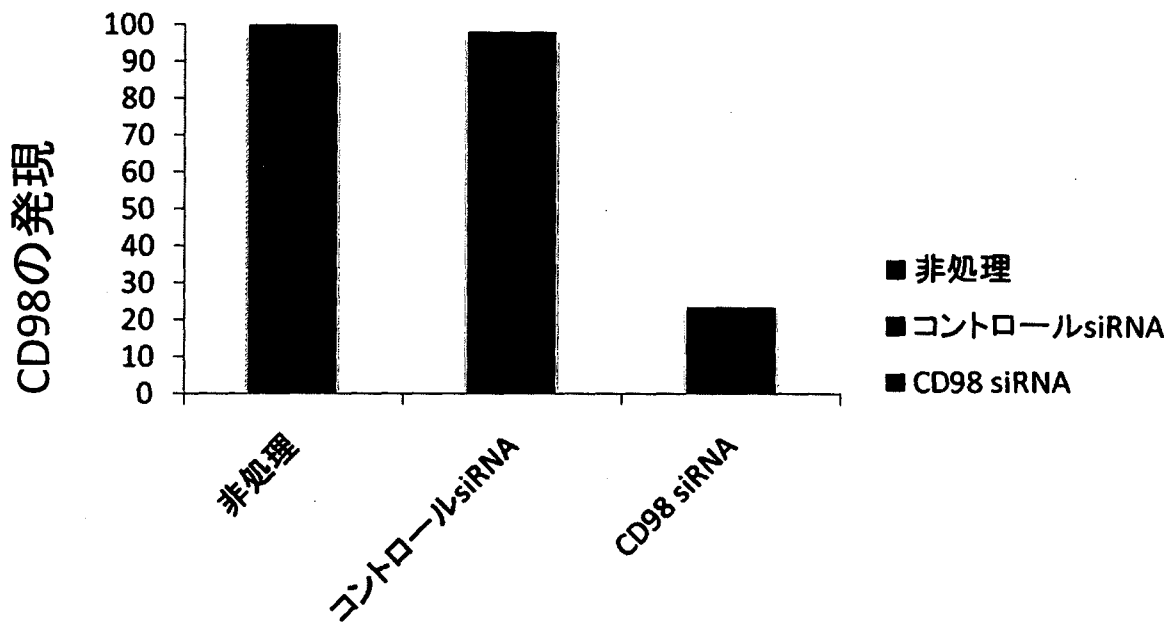


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075587

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K48/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K48/00, A61K31/713, A61P3/10, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Cantor J, et al., Loss of T cell CD98 H chain specifically ablates T cell clonal expansion and protects from autoimmunity, The Journal of Immunology, 2011.07.15, Vol. 187, No. 2, p. 851-860	1-8
Y	JP 2010-540595 A (VIB VZW), 24 December 2010 (24.12.2010), claim 2; table 2 & US 2011/0008350 A1 & EP 2201117 A & WO 2009/043922 A2	1-8
Y	Kudo Y, et al., RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells, FEBS Letters, 2004.11.19, Vol. 577, No. 3, p. 473-477	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 November, 2012 (08.11.12)

Date of mailing of the international search report
20 November, 2012 (20.11.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075587

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Pinho MJ, et al., Overexpression of non-functional LAT1/4F2hc in renal proximal tubular epithelial cells from the spontaneous hypertensive rat, Cellular Physiology and Biochemistry, 2007, Vol. 20, No. 5, p. 535-548	1-8
Y	Diaz LA, et al., A role for CD98 in rheumatoid arthritis and in the regulation of superantigenic responses, Arthritis & Rheumatism, 1994.09, Vol. 37, No. 9, Suppl., p. S313 (#916)	1-8
Y	Laroui H, et al., Silencing of CD98 Expression Using a Nanoparticle-Based Delivery System Ameliorates Induced Colitis in Mice, Gastroenterology, 2011.05, Vol. 140, No. 5, Suppl. 1, p. S10-S11 (#44)	1-8
P,X P,A	WO 2012/026526 A1 (University of Miyazaki), 01 March 2012 (01.03.2012), paragraph [0113], sequence no.27 to 30 (Family: none)	8 1-7
P,X	Lian G, et al., Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice, The Journal of Immunology, 2012.03.01, Vol. 188, No. 5, p. 2227-2234	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075587

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 9-12
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
(See extra sheet)

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/075587

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

Claims 9-12 involve "method for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic method for same" and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2) (a) (i) and PCT Rule 39.1(iv).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K48/00(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P19/02(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P37/06(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61K48/00, A61K31/713, A61P3/10, A61P19/02, A61P29/00, A61P37/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2012年
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年
 日本国登録実用新案公報 1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Cantor J, et al., Loss of T cell CD98 H chain specifically ablates T cell clonal expansion and protects from autoimmunity, The Journal of Immunology, 2011.07.15, Vol. 187, No. 2, p. 851-860	1-8
Y	JP 2010-540595 A (フエー・イー・ベー・フエー・ゼツト・ウエー) 2010.12.24, 請求項2, 表2 & US 2011/0008350 A1 & EP 2201117 A & WO 2009/043922 A2	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>
---	---

国際調査を完了した日 08.11.2012	国際調査報告の発送日 20.11.2012
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小松 邦光	4U	4495
	電話番号 03-3581-1101 内線 3439		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Kudo Y, et al., RNA interference-induced reduction in CD98 expression suppresses cell fusion during syncytialization of human placental BeWo cells, FEBS Letters, 2004.11.19, Vol. 577, No. 3, p. 473-477	1-8
Y	Pinho MJ, et al., Overexpression of non-functional LAT1/4F2hc in renal proximal tubular epithelial cells from the spontaneous hypertensive rat, Cellular Physiology and Biochemistry, 2007, Vol. 20, No. 5, p. 535-548	1-8
Y	Diaz LA, et al., A role for CD98 in rheumatoid arthritis and in the regulation of superantigenic responses, Arthritis & Rheumatism, 1994.09, Vol. 37, No. 9, Suppl., p. S313 (#916)	1-8
Y	Laroui H, et al., Silencing of CD98 Expression Using a Nanoparticle-Based Delivery System Ameliorates Induced Colitis in Mice, Gastroenterology, 2011.05, Vol. 140, No. 5, Suppl. 1, p. S10-S11 (#44)	1-8
P, X	WO 2012/026526 A1 (国立大学法人宮崎大学) 2012.03.01, 段落 [0113] の配列番号 27-30 (ファミリーなし)	8
P, A		1-7
P, X	Lian G, et al., Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice, The Journal of Immunology, 2012.03.01, Vol. 188, No. 5, p. 2227-2234	1-8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 9-12 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項9-12は「人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法」を包含するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。