

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4487376号
(P4487376)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.		F 1
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 13/12	(2006.01)	A 6 1 P 13/12

請求項の数 2 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2000-97553 (P2000-97553)	(73) 特許権者	000000066
(22) 出願日	平成12年3月31日 (2000.3.31)		味の素株式会社
(65) 公開番号	特開2001-288111 (P2001-288111A)		東京都中央区京橋1丁目15番1号
(43) 公開日	平成13年10月16日 (2001.10.16)	(74) 代理人	100089244
審査請求日	平成19年1月12日 (2007.1.12)		弁理士 遠山 勉
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実
		(74) 代理人	100100549
			弁理士 川口 嘉之
		(72) 発明者	小島 至
			群馬県前橋市文京町1-1-7-301
		審査官	長部 喜幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腎疾患治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フォリスタチンを有効成分として含有する腎疾患治療剤。

【請求項2】

アクチビン作用が関与する腎疾患の治療に用いられる請求項1記載の腎疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は腎疾患治療に有効な薬剤を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】

アクチビン (activin) に結合性を有するタンパク質であるフォリスタチン (follistatin) は、下垂体培養細胞の濾胞刺激ホルモン (FSH) 産生促進活性を指標に発見された (Esch, F.S. et al., Mol. Endocrinol.; 1(11):849-55 (1987))。当初は、フォリスタチンがFSHの分泌を抑制したことから、FSHの分泌促進作用を有するアクチビンと逆作用を有するものと考えられていた。その後の研究により、アクチビンの特異的結合蛋白質であり、アクチビンに結合してアクチビン活性を抑制することが明らかとなっている (Nakamura, T. et al., Science, 247(4944):836-8 (1990))。生体内にはアクチビン A、アクチビン AB、アクチビン B など数種類のアクチビンが存在するが、フォリスタチンはこれらいずれのアクチビンに対しても阻害活性を示すことが知られている (Fukui, A. et al., Dev.

Biol.; 159 (1): 131-139 (1993)、Sugino, H. et al., Seikagaku; 68(8): 1405-1428 (1996))。

【 0 0 0 3 】

また、フォリスタチンは、それをコードする遺伝子が単離されており、アミノ酸配列も報告されている (W089/01945、Shimasaki, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 85(12):4218-22 (1988))。

【 0 0 0 4 】

フォリスタチンの薬理効果としては、局所投与によって肝臓の細胞増殖を促進することが知られている (Kogure, K. et al., Hepatology; 24(2):361-6 (1996)、Kojima, I., BIO Clonica; 883(12), 43-46 (1997))。また、フォリスタチンの拮抗物質が、創傷および線維性障害に対して癒痕形成が少ない治癒を促進することが報告されている (W097/15321))。しかし、フォリスタチンが腎疾患の治療に対して有効であることは知られていない。

【 0 0 0 5 】

従来、腎疾患治療にはステロイド製剤、プロスタグランジン製剤、降圧利尿製剤などが用いられているが、根本的な治療には十分であるとはいえない。

【 0 0 0 6 】

【 発明が解決しようとする課題 】

本発明は、従来の腎疾患治療剤と異なる作用を有し、有効な治療を可能とする腎疾患治療剤を提供することを課題とする。

【 0 0 0 7 】

【 課題を解決するための手段 】

本発明者は、上記課題を解決するために検討を行った結果、障害を有する腎臓においてフォリスタチンの発現が低下することを見出した。また、腎臓細胞の細胞増殖、細胞機能に関わっていると推測されるアクチビンに着目し、その作用を抑制することによって腎細胞の増殖を促進させることができることを、フォリスタチンを用いて実証し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 8 】

すなわち本発明は、アクチビン阻害剤を有効成分として含有する腎疾患治療剤である。また本発明は、アクチビン作用が関与する腎疾患の治療に用いられる前記腎疾患治療剤を提供する。

さらに本発明は、アクチビン阻害剤がフォリスタチンである前記腎疾患治療剤を提供する。

【 0 0 0 9 】

様々な障害後に見られる組織の再生、すなわち組織の再構築という現象で見られる反応は、発生過程の器官形成における細胞の分化・増殖・遊走といった現象と非常に相同性が高く、そのメカニズムに関与する液性因子も共通していると考えられている。

【 0 0 1 0 】

これまでに腎臓の形態形成において、必須の分化誘導因子である肝細胞成長因子 (HGF) を代表とするいくつかの増殖因子は、いずれも腎尿細管の再生、すなわち各種急性腎不全モデル (虚血、腎毒性物質など) における尿細管上皮の再生において、尿細管細胞の増殖を促進し、あるいはアポトーシスを抑制することにより腎機能障害を軽減することが報告されている。アクチビンやフォリスタチンも、これまでの検討の結果、腎原基を用いた器官培養、MDCK細胞 (コッカスバニエル雌犬腎臓) を用いた管腔形成のインビトロモデル、あるいはトランスジェニックマウスの表現型から、腎臓の発生過程における重要な分化誘導因子であると同時に、再生という現象においても何らかの役割を果たしていることが予想される (Maeshima, A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.; 268(2):445-9(2000))。一方、再生におけるアクチビンとフォリスタチンの役割については肝切除に引き続いて起こる肝再生の開始と停止の調節機構として研究が進んでいる (Kogure, K. et al., Hepatology; 24(2):361-6 (1996)、Kojima, I., BIO Clonica; 883(12), 43-46 (1997))。そこで、本発明者は、虚血性急性腎不全モデルを用いて、腎尿細管の再生における

アクチビンやフォリスタチンの役割を検討した。

【 0 0 1 1 】

その結果、後記実施例に示すように、虚血 / 再灌流後に認められたアクチビン、フォリスタチンの発現変化は尿細管再生において何らかの機能を果たしていることが示唆された。すなわち、虚血 / 再灌流後 4 8 時間では、アクチビンの発現は亢進している一方で、そのアンタゴニストであるフォリスタチンの発現は減少していることから、一時的にせよアクチビンは機能的に活性状態と思われる。このような両者の発現変化が尿細管再生においてどのような意味を持つかは今のところ不明であるが、これまでの他臓器での検討、すなわち脳虚血モデルや皮膚修復モデルにおける再生現象においてアクチビンはその発現が誘導され、細胞外マトリクスの産生や組織の線維化に参与していることなどから、腎臓においても同様の機序によって組織障害の遷延化に参与している可能性が推測される。

10

【 0 0 1 2 】

そこで、アンタゴニストであるフォリスタチンを投与することによりアクチビンの作用を阻害することで、上記虚血 / 再灌流モデルでの尿細管再生や組織障害の程度に何らかの影響を及ぼすかを検討し、細胞増殖が有意に増加することを明らかにした。

【 0 0 1 3 】

以上の結果より、アクチビン、フォリスタチンは腎臓の発生あるいは再生過程において重要な分化誘導因子であるとともに、以下のような病態においてもその発症機序に対して何らかの関与が推測される。

【 0 0 1 4 】

1 尿細管・間質障害の発症機序：

尿細管間質障害は、糸球体障害よりも腎機能の予後との相関が強いことから、近年その発症機序に関する研究が進んでいる。その障害の原因として、糸球体障害に引き続いておこる二次的なもの以外にも、虚血・再灌流障害、腎後性障害、薬剤性などがあり、またその障害を進展させる因子として間質への細胞浸潤、間質線維化、尿細管・間質細胞の形質転換などが提起されている。

20

【 0 0 1 5 】

腎尿細管は、全身臓器の中で卵巣と並んで最も多くフォリスタチンを発現している組織であることから、フォリスタチンは再生だけでなく様々な尿細管・間質障害においてもその尿細管構造および機能を保持するために存在しているものと思われる。

30

【 0 0 1 6 】

2 慢性腎不全の進行阻止：

慢性腎不全はその進行過程において、糸球体硬化や間質の線維化など細胞外マトリクスの持続的蓄積が原因の 1 つと考えられており、また年々増加傾向にある透析導入患者を減らす上でも、その原因となる腎不全の進行を遅らせることは腎疾患の治療を考える上で重要な課題の 1 つでもある。これまでにアクチビンは肝硬変や肺線維症においてその発現が亢進しコラーゲン産生を誘導する、あるいは腎線維芽細胞においても T y p e I コラーゲンの産生を亢進するなど、組織の線維化に参与することが報告されている (Matsuse, T., Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi; 36(5): 413-20 (1998), Sugiyama, M., Gastroenterology; 114(3): 550-8(1998))。

40

【 0 0 1 7 】

細胞外マトリクスは、発生・分化において組織・器官を構築するために存在し、細胞の分化した形質を保持するために質的・量的に制御されていると同時に、様々な病態、特に組織の線維化においても重要な因子として機能している。細胞外マトリクス産生においてアクチビンは重要な調節因子であることが予想されることから、腎臓においても細胞外マトリクスの蓄積による各種腎疾患 (慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症など) から慢性腎不全への進展においてトランスフォーミング成長因子 (TGF) と同様、その進行に参与している可能性があり、逆を言えば、アンタゴニストであるフォリスタチンを用いて進行阻止の治療戦略を検討することが可能になるとと思われる。例えば、慢性腎不全において線維化までには至っていない尿細管・間質領域をフォリスタチンにより量的あるいは機能的に

50

拡大することにより、尿細管機能のある程度保持し腎不全の進行を遅らせることなどが可能であると考えられる。

【0018】

3 その他：

尿細管細胞に限らず、メサンギウム細胞においてもアクチピン、フォリスタチンの産生が認められることから、糸球体腎炎などメサンギウム細胞の関与する様々な病態においてもその細胞の増殖や分化に関与している可能性が推測される。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明の腎疾患治療剤は、アクチピン阻害剤を有効成分として含有する。本発明において「アクチピン阻害剤」とは、アクチピンが持つ生理的機能を低下又は消失させるものを意味し、アクチピンに直接結合してアクチピンの生理的機能を阻害するものであってもよいし、アクチピン自体の産生を阻害するものであってもよい。また、アクチピンがアクチピン受容体に結合することによって生じるシグナル伝達を阻害するものであってもよい。

【0020】

アクチピン阻害剤として具体的には、フォリスタチン、抗アクチピン抗体、アクチピン受容体の阻害剤もしくは抗アクチピン受容体抗体、アクチピン受容体に関連するシグナル伝達系の阻害剤、腎臓におけるアクチピン産生阻害剤等が挙げられる。アクチピン受容体の阻害剤としては、アクチピン受容体をブロックし、アクチピンとフォリスタチンとの結合を阻害するフォリスタチンと類似の構造を有するタンパク質又は化合物が挙げられる。また、アクチピン産生阻害剤としては、アクチピン遺伝子に対するアンチセンスDNA等が挙げられる。

【0021】

アクチピン阻害剤の作用は、アクチピン阻害剤の存在下及び非存在下でアクチピンの活性を測定することによって調べることができる。アクチピンの活性は、赤芽球細胞に対する分化誘導作用（EDFアッセイ：Eto, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.; 142(3):1095-103(1987)）あるいは下垂体細胞に対する卵胞刺激ホルモン分泌促進作用などを指標としたインビトロ試験で測定できる。

【0022】

本発明においては、フォリスタチンの種類や起源の如何にかかわらず、アクチピン阻害作用を有する限りは本発明の効果が得られる。例えば、アクチピン阻害作用を有する限り、ヒト・フォリスタチンのみならず、ブタ等の動物由来のフォリスタチンであってもよく、また、天然型フォリスタチンであっても、組換え型フォリスタチンであってもよい。

【0023】

フォリスタチンは、ペプチド部分の分子量が3～4万の糖蛋白質で、アミノ酸残基数が315個、303個、288個など異なること、及び、糖鎖付加の部位や数が異なることが知られている。また、それ以外の構造変化を有する場合でも、アクチピンとの結合能を有し、アクチピン結合蛋白質として同等のアクチピン阻害活性が保持されている限り、本発明の効果が得られる。

【0024】

天然型のフォリスタチンは、動物の臓器、たとえば卵巣から抽出した後、精製工程を経て調製される。また、組換え型のフォリスタチンは、ヒトもしくは動物のフォリスタチンcDNAを適当な発現ベクターに組み込んで適当な動物細胞に遺伝子導入し、この細胞の培養液から精製工程を経て調製される。

【0025】

組換えフォリスタチンは、フォリスタチンをコードするDNAを用いて、通常の組換え技術による異種タンパク質の製造法にしたがって調製することができる。フォリスタチンをコードするDNA及び同DNAを用いて組換えフォリスタチンを製造する方法は、WO89/01945に開示されている。後記実施例では、315アミノ酸からなるヒトフォリスタチンに

10

20

30

40

50

対応するcDNAを組み込んだCHO細胞の培養液より精製したものを使用した。

【0026】

本発明の腎疾患治療剤は、フォリスタチン等のアクチビン阻害剤単独又はアクチビン阻害剤と製剤用添加物を含む医薬用組成物の形態の医薬として提供される。アクチビン阻害剤は単独で用いてもよく、複数種のアクチビン阻害剤を併用してもよい。また、アクチビン阻害剤とともに、従来用いられている腎疾患治療剤の有効成分として用いられている薬剤を配合してもよい。

【0027】

本発明の腎疾患治療剤の剤型としては、注射剤、舌下剤、経皮パップ剤、錠剤、カプセル剤、細粒剤、シロップ剤、座薬、軟膏剤、点眼剤等が挙げられる。これらのうちでは、注射剤、舌下剤、経皮パップ剤が好ましい。また、剤型に応じて、製剤上許容される賦形剤、例えば、乳糖、バレイショデンプン、炭酸カルシウム、又はアルギン酸ナトリウム等を配剤してもよい。さらに、通常製剤に用いるその他の材料、例えば血清アルブミン等の蛋白質、緩衝作用、浸透圧調整のための塩、担体、賦形剤等の成分を配合しても良い。注射剤の場合には、溶媒として注射用蒸留水、生理食塩水、リンゲル液等が使用され、これに分散剤を添加してもよい。本発明の腎疾患治療剤の投与量としては、アクチビン阻害剤としてフォリスタチンを用いる場合においては、患者の年齢、症状等により異なるが、一般には静脈投与では成人1人1日当り、フォリスタチンの量として、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲であり、好ましくは、 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲が挙げられる。

【0028】

本発明の腎疾患治療剤は、腎疾患の治療、予防に有用であるが、このような疾患としてはアクチビン作用の亢進が関与すると考えられる腎疾患、例えば、急性腎不全、慢性腎不全、糸球体腎炎、糖尿病性腎症、などを挙げることができるが、これらに限定されることはなく、広く腎臓障害に適用される。

【0029】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0030】

【実施例1】

文献(Onomichi, K. et al., J Biochem (Tokyo); 2(1):123-31(1987))記載の方法を用いて、文献(Shimasaki, S. et al., Proc Natl Acad Sci U S A; 85(12):4218-22(1988))記載のヒトフォリスタチンcDNAを動物細胞発現ベクターに組み込み、図1に示すプラスミドpSD(X)/Folを作製した。pSD(X)/Folを、文献(Murata, et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.; 151(1):230-5(1988))の方法でCHO-DHFR欠損細胞(チャイニーズハムスターオバリー細胞ジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株)にリン酸カルシウム法を用いて遺伝子導入した。 $0.1 \mu\text{M}$ のMTX(メソトレキセート)を含有する選択培地中で2週間培養した後、新鮮培地に交換して更に1週間培養を継続して耐性細胞を取得した。この細胞を $0.5 \mu\text{M}$ のMTXを含有する選択培地中に移し、耐性細胞を取得し、以下MTX濃度を段階的に増加させて同様な操作を繰り返し、最終的に $40 \mu\text{M}$ のMTX耐性細胞を得た。

【0031】

この細胞よりシングルセル分離法を用いてクローン分離を行った後、アクチビン中和活性を指標にフォリスタチン産生量を測定した。アクチビン活性はEDFアッセイを用いて行い、文献(Eto, Y. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.; 142(3):1095-103(1987))記載の方法で調製した $5 \text{ng}/\text{ml}$ のアクチビンA(EDF)の活性に対する阻害活性を判定した。最も高い産生量を示したクローンを選別し、ローラーボトルを用いて培養し、培養液約10Lを得た。限外ろ過膜(ミリポア社製MW5000cut-off)で5倍濃縮した後、50%PBSで平衡化したヘパリンカラム(70mlベッド容積)にチャージした。50%PBSで洗浄した後、1.5MのNaClを含有する50%PBSで溶出し、UV

10

20

30

40

50

モニターで蛋白溶出部分を分取した。このうち1/5量をHPLC (YMC Pack S-10 834/20mm) を用いて、アセトニトリル濃度勾配で分離溶出した。図2に溶出パターンを示した。矢印で示した部分を分取し、凍結乾燥した後、少量の蒸留水に溶解し、精製フォリスタチンを得た。精製フォリスタチンの蛋白量はHPLC吸光度より算出した。図3に精製フォリスタチンのアクチビン阻害活性を示した。

【0032】

【実施例2】

雄性Wistarラットの両側腎動脈を45分間クランプ後、開放し、虚血/再灌流モデルを作製した。前記処置後、経時的に腎臓を摘出し、アクチビン Aサブユニット及びフォリスタチンの発現を、それぞれRT-PCR (Vukicevic, S. et al., J. Clin. Invest., 102(1): 202-214 (1998))、ノーザンブロット (Zhang, Y. Q. et al., Hepatology, 25(6): 1370-1375 (1997)) により調べた。また、腎組織内でのフォリスタチンmRNAの局在を、in situハイブリダイゼーション (Suzuki, M. et al., Diabetes, 46(9): 1440-1444 (1997)) により検討した。

10

【0033】

その結果、アクチビン Aサブユニットは、正常ラット及びsham群ラットの腎臓においては発現がほとんど検出できなかったが、虚血/再灌流モデルでは、虚血/再灌流処置から12時間後には、その発現が亢進し、120時間後まで持続した。一方、フォリスタチンは、正常ラット及びsham群の腎臓においては多量に発現していたが、虚血/再灌流モデルでは、虚血/再灌流処置から48時間をピークとして一過性に減少し、その後元のレベルまで回復した。

20

【0034】

また、in situハイブリダイゼーションの結果、フォリスタチンmRNAの発現は、髄質外層の尿細管細胞に局在しており、虚血/再灌流後にはノーザンブロットの結果に一致してそのシグナルは弱くなり、壊死組織だけでなく形態学的に正常な尿細管細胞でもその発現は低下していた。

【0035】

【実施例3】

実施例2と同様にして作製した虚血/再灌流モデルラットに、フォリスタチン3 μ g (投与群) 及び生理的食塩水 (対照群) を、虚血/再灌流処置後30分以内に尾静脈より単回投与し、その後経時的に腎臓を摘出した。組織学的変化をPAS染色、腎再生の程度をBrdU (プロモデオキシウリジン) 染色により評価し、フォリスタチン投与群および対照群で比較検討した。

30

【0036】

その結果、対照群では48時間をピークとして一過性にDNA合成の増加が認められた (BrdU染色: 図5)。また、BrdU陽性細胞は、主として虚血により障害される髄質外層の尿細管細胞に認められた。一方、フォリスタチン投与群では対照群に比べて有意に陽性細胞が増加した (図5)。また、BrdU陽性細胞は、髄質外層のみでなく、皮質の尿細管にも認められた。組織学的に、対照群では虚血による組織障害に伴い尿細管壊死、尿細管腔の拡大、鬱血などが認められたが、フォリスタチン投与群では対照群に比べ軽度であった。

40

【0037】

図6に示したように3 μ gのフォリスタチンを投与したラットでは24時間後の血中BUN (血液尿素窒素) およびクレアチニン量が非投与群に比べて低減していることから、腎機能が改善されていることが明らかとなった。また図7はフォリスタチン投与24時間後のBrdU陽性細胞を測定したものであるが、投与量10 μ g/kg前後より効果が観察され、20 μ g/kgより高投与量で最大活性が維持された。

【0038】

上記のように、フォリスタチン投与により虚血性急性腎不全後の尿細管再生が促進されたことから、腎尿細管の再生促進因子としての作用が明らかになった。それと同時に障害を受けていないと思われる皮質尿細管にもDNA合成を誘導したことから、単に再生を促進

50

するだけでなく、無傷 (intact) の状態の尿細管細胞に対しても何らかの作用を発揮する可能性がある。このことは、急性腎不全に限らず様々な尿細管・間質障害に対する治療戦略を考える上で重要な情報と思われる。

【0039】

【発明の効果】

本発明により、新規な腎疾患治療剤が提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒトフォリスタチン cDNA発現ベクターの構造を示す図。

【図2】 HPLCを用いたフォリスタチンの精製を示す図。縦軸は吸光度 (OD₂₈₀)、横軸は溶出時間 (分) を示す。矢印で示す部分に組換え型ヒトフォリスタチンが溶出された。

10

【図3】 精製フォリスタチンによるアクチビン阻害活性を示す図。EDFアッセイを用いて、5 ng/mlのアクチビンAに対する阻害活性を測定した。縦軸はEDF活性を、横軸はフォリスタチン濃度を示す。各群 n = 6

【図4】 フォリスタチンによる腎障害の改善を示す図。縦軸の「」はBUN (血液尿素窒素) を、「」はクレアチニン濃度を示す。

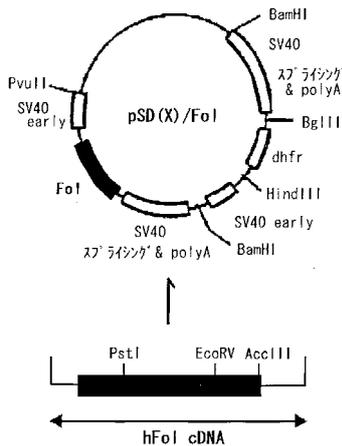
【図5】 フォリスタチンによる腎細胞増殖促進の経時変化を示す図。縦軸はBrdU陽性細胞数を、横軸は投与後の時間を示す。はフォリスタチン投与群を、は対照群を示す。各群 n = 6

【図6】 フォリスタチンによる腎細胞増殖促進の用量特性を示す図。縦軸はBrdU陽性細胞数を、横軸はフォリスタチン投与量を示す。

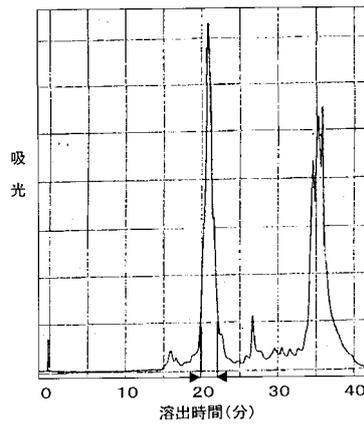
20

【図7】 フォリスタチン投与ラットの腎細胞のBrdUの取り込みを示す写真。

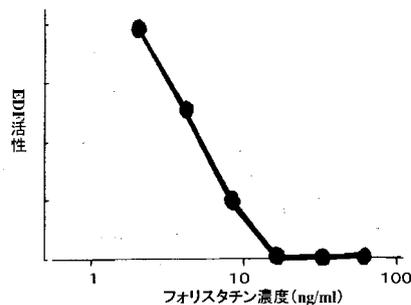
【図1】



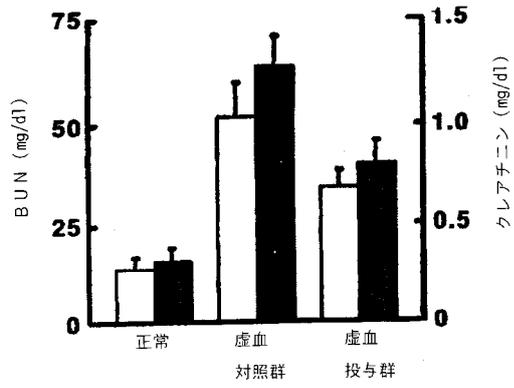
【図2】



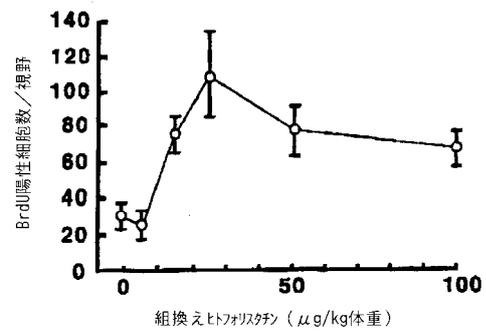
【図3】



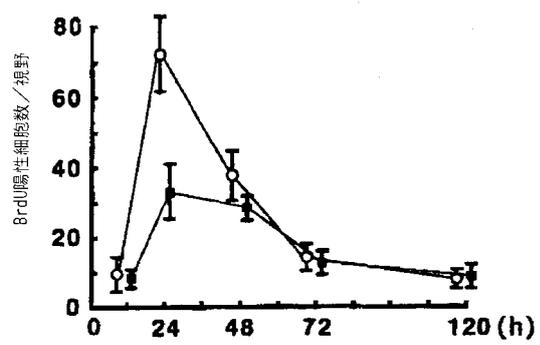
【 図 4 】



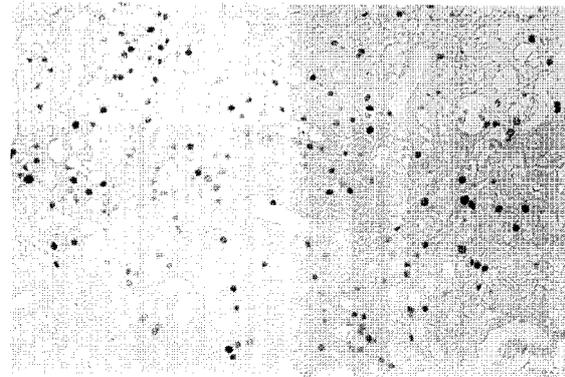
【 図 6 】



【 図 5 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(56)参考文献 Makoto Shiozaki , Biochemical and Biophysical Research Communications , 1992年 , Vol. 183, No.1 , Pages 273-279

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 38/00

A61K 45/00

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)