

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/123156

発行日 平成24年10月25日 (2012.10.25)

(43) 国際公開日 **平成22年10月28日 (2010.10.28)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C O 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 7
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2011-510400 (P2011-510400)	(71) 出願人	504258527 国立大学法人 鹿児島大学
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/057735		鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
(22) 国際出願日	平成22年4月23日 (2010.4.23)	(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	特願2009-105170 (P2009-105170)	(74) 代理人	100118773 弁理士 藤田 節
(32) 優先日	平成21年4月23日 (2009.4.23)	(72) 発明者	小戩 健一郎 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	坂本 泰二 鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号 国立大学法人鹿児島大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 血管新生抑制剤

(57) 【要約】

糖尿病網膜症及び加齢黄斑変性等の血管新生機序に関連する疾患の治療、予防又は再発防止に適用するための物理的治療法に替わる血管新生阻害効果又は抑制効果を有する新規の組成物を開発し、提供することを目的とする。

4回膜貫通型タンパク質ファミリーに属するCD9の抑制剤で構成される血管新生抑制剤及び当該血管新生抑制剤を含有する血管新生抑制組成物を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

膜タンパク質 CD9 の抑制剤で構成される血管新生抑制剤。

【請求項 2】

前記 CD9 抑制剤が CD9 の発現を抑制する、請求項 1 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 3】

前記 CD9 抑制剤が CD9 をコードする遺伝子の転写産物を標的とする、請求項 1 又は 2 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 4】

前記 CD9 抑制剤が CD9 の RNA 干渉剤、CD9 アンチセンス核酸又は CD9 - U1 アダプターである、請求項 3 に記載の血管新生抑制剤。 10

【請求項 5】

前記 CD9 抑制剤が CD9 の RNA 干渉剤、CD9 アンチセンス核酸又は CD9 - U1 アダプターをコードする核酸を発現可能なように連結した発現ベクターである、請求項 1 又は 2 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 6】

前記 CD9 の RNA 干渉剤が、CD9 - siRNA 又は CD9 - shRNA である、請求項 4 又は 5 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 7】

前記 CD9 - siRNA が配列番号 3 及び 4 で示される塩基配列から構成される、請求項 6 に記載の血管新生抑制剤。 20

【請求項 8】

前記発現ベクターが配列番号 5 及び / 又は 6 で示される塩基配列を含む、請求項 5 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 9】

前記 CD9 抑制剤が CD9 アプタマー又は抗 CD9 抗体である、請求項 1 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 10】

血管新生疾患又は癌の治療用である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の血管新生抑制剤。 30

【請求項 11】

前記血管新生疾患が血管新生を病因とする眼疾患である、請求項 10 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 12】

前記眼疾患が、糖尿病網膜症又は加齢黄斑変性である、請求項 11 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 に記載の少なくとも 1 以上の血管新生抑制剤及び製薬上許容可能な担体を含む血管新生抑制組成物。

【発明の詳細な説明】 40**【技術分野】****【0001】**

本発明は、血管新生抑制剤、及びこれを含む含有する医薬組成物に関する。

【背景技術】**【0002】**

血管形成に関与する疾患は、血管の消退による虚血性疾患と、血管の形成増強による血管新生疾患の二つに大別される。このうち、血管新生疾患としては、これまでに各医療分野において 50 種類以上の疾病が報告されている。例えば、眼疾患では糖尿病網膜症 (Diabetic Retinopathy) 及び加齢黄斑変性 (age-related macular degeneration: AMD)、癌では各種固形腫瘍、脈管系 50

疾患では血管線維腫及びアテローム硬化性プラーク、皮膚疾患では乾癬及び血管腫、骨関節疾患ではリウマチ様関節炎及び変形性関節症、並びに生殖器系疾患では卵胞嚢胞及び卵巣肥大症候群が挙げられる。

前記糖尿病網膜症及び加齢黄斑変性は、成人において視機能の低下や中途失明等の深刻な症状をもたらす進行性網膜疾患である。これらの疾患に共通する原因の一つとして、網膜における血管新生の発生が知られており、その進行に伴い病態が悪化し、重症化することが判明している（非特許文献1、2）。

上記疾患は、近年増加傾向にあることから、眼科分野ではその有効な治療法の開発が求められている。現在行われている主な治療法には、レーザー光凝固法や光線力学療法（Photodynamic Therapy：PDT）がある。

レーザー光凝固法は、網膜上の新生血管部位又は虚血部位にレーザー光を照射し、その熱で当該部位を凝固することにより新生血管を閉塞させて、病態の進行を抑える方法である。この方法は、網膜細胞の熱凝固により稀に視力低下を引き起こすことや、病変サイズが大きい場合又は中心窩に新生血管ができていない場合には使用できないという欠点がある。

光線力学療法は、特定の波長の光に反応する薬剤を患者に注射した後、低出力レーザー光を患部に照射して、レーザー光凝固法と同様に新生血管を閉塞させる方法である。この方法は、レーザー照射した箇所周辺の組織へのダメージがほとんどないため中心窩に新生血管がある場合にも使用可能ではあるが、1回の処置では効果が弱く、複数回にわたる治療が必要という欠点がある。

上記物理的治療法以外に、最近ではベバシズマブ等の薬剤による治療法も報告されている。ベバシズマブ（Bevacizumab：商品名アバスチン（登録商標））は、血管新生において最も重要な因子の一つであり、血管新生促進因子として機能するVEGF（vascular endothelial growth factor：血管内皮細胞増殖因子）に対する中和抗体である。ベバシズマブは、VEGFの機能を抑えることによって血管新生を抑制する一定の効果が認められている。しかし、1回の処理での効果持続期間が1～3ヶ月と短く、注入中止による再発性が高いという欠点が未解決のままである（非特許文献3～5）。また、再発性を防止するためには本薬剤を定期的に投与する必要があるが、眼球に直接注射する必要があるため、投与回数の多いことが侵襲性の高さ及び患者の精神的負担面での問題となっている。さらに、標的となるVEGFは、本来正常な血管を維持する上で必須の因子であり、長期のVEGF抑制は、例えば、正常血管の狭細化、脆弱化等の副作用が懸念されている。一方で、VEGF以外の血管新生促進因子も知られている。例えば、HGF（Hepatocyte growth factor：肝細胞増殖因子）は、VEGFと同等かそれ以上に強力な血管新生作用をもつ増殖因子である（非特許文献6）。HGFは、VEGFとは異なる受容体を介して細胞内に血管新生促進のシグナルを送っており、それ故、その血管新生促進のメカニズムもVEGFとは異なる。したがって、VEGFの中和抗体ではHGF等の他の血管新生促進因子の作用を阻害することはできず、その治療効果と有用性は限定されたものとなっている（非特許文献6）。VEGFのみならず、HGFを含む他の血管新生促進因子による血管新生を総合的に抑制できる汎用的な血管新生阻害剤は未だに開発されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【非特許文献1】Martin A. et al., 2003, Medicinal Research Reviews, Vol. 23, No. 2: 117 - 145

【非特許文献2】Ferris III, F.L. et al., 1984, Archives of Ophthalmology, Vol. 102, Issue 11: 1640 - 1642

【非特許文献3】Yenerel N.M. et al., 2008, J Ocul Pharmacol Ther., Jun; 24(3): 362 - 363

10

20

30

40

50

【非特許文献4】K o p e l A . C . , 2 0 0 8 , O p h t h a l m i c S u r g L a s e r s I m a g i n g . , M a r - A p r ; 3 9 (2) : 1 5 3 - 1 5 4

【非特許文献5】J o n a s J . B . , 2 0 0 7 , J O c u l P h a r m a c o l T h e r . , J u n ; 2 3 (3) : 2 4 0 - 2 4 2

【非特許文献6】Y o u W . K . a n d M a c d o n a l d D . M . , 2 0 0 8 , B M B R e p . D e c 3 1 ; 4 1 (1 2) : 8 3 3 - 9

【発明の概要】

【0004】

以上のように、現在用いられている糖尿病網膜症及び加齢黄斑変性等の治療方法は、いずれも根治的かつ効果的な治療法とは言えず、これらの疾患の失明率は未だに高い。それ故、より効率的で、治療又は薬剤の効果持続時間が長く、かつ副作用がほとんどないか又はたとえあっても無視できる程度の治療方法が、依然として強く望まれている。

そこで、本発明ではこれらの問題を解決できる新規の血管新生抑制効果を有する薬剤及び医薬組成物を開発し、提供することを目的とする。

本発明者らは、鋭意研究を行った結果、上記の4回膜貫通型タンパク質(テトラスパニン: tetraspanin)ファミリーに属する膜タンパク質CD9の発現又は機能を阻害することによって血管新生が抑制されることを見出し、この効果により前記課題を解決することができることを明らかにした。本願発明は、当該知見に基づいてなされたものであり、すなわち以下を提供することである。

(1) 膜タンパク質CD9の抑制剤で構成される血管新生抑制剤。

(2) 前記CD9抑制剤がCD9の発現を抑制する、(1)に記載の血管新生抑制剤。

(3) 前記CD9抑制剤がCD9をコードする遺伝子の転写産物を標的とする、(1)又は(2)に記載の血管新生抑制剤。

(4) 前記CD9抑制剤がCD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸又はCD9-U1アダプターである、(3)に記載の血管新生抑制剤。

(5) 前記CD9抑制剤がCD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸又はCD9-U1アダプターをコードする核酸を発現可能なように連結した発現ベクターである、(1)又は(2)に記載の血管新生抑制剤。

(6) 前記CD9のRNA干渉剤が、CD9-siRNA又はCD9-shRNAである、(4)又は(5)に記載の血管新生抑制剤。

(7) 前記siRNAが配列番号3及び4で示される塩基配列から構成される、(6)に記載の血管新生抑制剤。

(8) 前記発現ベクターが配列番号5及び/又は6で示される塩基配列を含む、(5)に記載の血管新生抑制剤。

(9) 前記CD9抑制剤がCD9アダプター又は抗CD9抗体である、(1)に記載の血管新生抑制剤。

(10) 血管新生疾患又は癌の治療用である、(1)~(9)のいずれか1項に記載の血管新生抑制剤。

(11) 前記血管新生疾患が血管新生を病因とする眼疾患である、(10)に記載の血管新生抑制剤。

(12) 前記眼疾患が、糖尿病網膜症又は加齢黄斑変性である、(11)に記載の血管新生抑制剤。

(13) 前記(1)~(12)に記載の少なくとも1以上の血管新生抑制剤及び製薬上許容可能な担体を含む血管新生抑制組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2009-105170号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0005】

図1は、HMVECを用いた細胞遊走誘導因子による細胞遊走結果

図2は、CD9-siRNAによる内在性CD9の抑制効果を示すウェスタンブロッテ

イング

図3は、CD9-siRNAによるHMVEC細胞の遊走能の変化

図4は、CD9-siRNAによるHMVEC細胞の浸潤能の変化

図5は、CD9-siRNAによるラット眼球の角膜における血管新生抑制効果

図6は、CD9-siRNAによるラット眼球の角膜における血管新生抑制効果

図7は、CD9-siRNAによるラット眼球の脈絡膜における血管新生抑制効果

図8は、CD9-siRNAによるラット眼球の脈絡膜における血管新生抑制効果

【発明を実施するための形態】

【0006】

1. 血管新生抑制剤

本発明の一の態様は、CD9の抑制剤で構成される血管新生抑制剤である。

「血管新生抑制剤」とは、血管新生を抑制するために使用される薬剤をいう。ここでいう「血管新生」とは、VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮細胞増殖因子)ファミリーやアンジオポエチンファミリーのような血管新生促進因子によって誘導される血管ネットワークの新たな形成及びその増強、並びにそれらと密接に関連する現象(例えば、血管内皮細胞の増殖及び遊走、並びに血管透過性の亢進)を意味する。血管新生には、創傷部位及び性周期に伴う子宮内膜等で見られるような生理的血管新生と、腫瘍組織及び炎症部位等で見られるような病的血管新生があるが、本発明でいう血管新生はそのいずれも包含する。好ましくは、病的血管新生である。

「CD9」とは、前述のように4回膜貫通型タンパク質(テトラスパニン)ファミリーに属する膜タンパク質である。テトラスパニンファミリーは、海綿から哺乳動物に至る動物のみならず、糸状菌から被子植物に至る植物でも広く知られている。生体内において、CD9は、腫瘍細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞をはじめとする様々な細胞の細胞膜表面に存在することが知られている。特に血管内皮細胞においては、同じファミリーに属するCD81及びCD151と共にインテグリン α 1に結合することが報告されており(Yanez-Mo M. & Alfranca A., 1998, The Journal of Cell Biology, Vol. 141, No. 3, May 4, 791-804)、細胞接着の調節、細胞間の情報伝達、細胞融合及び細胞遊走等に関与することが明らかとなっている(Maeshima K and Yahata K., 2006, J Cell Sci 119(21): 4442-4451)。このようにCD9の細胞レベルにおける現象及び関連する分子等については、複数の報告があるが、生体内におけるCD9の具体的かつ詳細な機能に関しては未だに不明な点が多い(Maecker H.T., 1997, FASEB J. May; 11(6): 428-442)。個体レベルにおけるCD9の唯一の機能としては、CD9が受精において卵子と精子の融合に関与することがCD9ノックアウトマウスを用いた研究結果から明らかになっている(Miyado K, et al., 2000, Science, 149: 1289-1296)。しかしながら、CD9は、生体内の様々な細胞で発現しているにも関わらず、前記不融合による不妊以外の表現型は観察されておらず、その生体内機能は、依然として未知のままである。

本明細書に記載のCD9は、いずれの生物種由来のものであってもよいが、好ましくは哺乳動物由来、より好ましくは霊長類由来、一層好ましくはヒト由来である。特に、本発明の血管新生抑制剤を血管新生機序に関連する疾患の治療、予防又は再発防止を目的としてヒトに適用する場合には、標的とするCD9はヒト由来、すなわちヒトCD9が望ましい。ただし、ヒトに適用する場合であっても、ヒトCD9のアミノ酸配列と全長又は標的とする一部領域のアミノ酸配列が同一である生物由来のCD9あるいはヒトCD9をコードする核酸の塩基配列と全長又は標的とする一部領域の塩基配列が同一である生物由来のCD9をコードする核酸については、この限りではない。ここでいう一部領域とは、ヒトCD9の場合であれば、例えば、免疫原となり得るペプチドの長さ(例えば、5アミノ酸以上全長アミノ酸未満)を有する領域であり、ヒトCD9をコードする核酸の場合であれ

10

20

30

40

50

ば、例えば、免疫原となり得るペプチドをコードする塩基数又は s i R N A の一方の鎖を構成する長さを有する領域である。

「ヒトCD9」の野生型アミノ酸配列及びそれをコードするヌクレオチド配列は、GenBank (米国NCBI) から入手可能である。例えば、前記アミノ酸配列は、GenBank NP__001760 (配列番号1で示す) として、また、前記ヌクレオチド配列は、GenBank NM__001769 (配列番号2で示す) として登録されている。本発明では、前記野生型CD9及びその野生型遺伝子の他にそれらの天然変異体を含む。ここでいう「天然変異体」とは、自然界に存在する変異体であって、例えば、前記アミノ酸配列又はヌクレオチド配列において、それぞれ1個又は数個のアミノ酸又はヌクレオチドが欠失、置換又は付加されたもの、前記アミノ酸配列又はヌクレオチド配列とそれぞれ95%以上、好ましくは98%以上、より好ましくは99%以上の同一性を有するもの等をいう。ここで「同一性」とは、2つのアミノ酸配列又はヌクレオチド配列にギャップを導入して又は導入しないでアラインメントさせたときに、それぞれ、一方のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列の全アミノ酸残基数又は全塩基数に対する他方のアミノ酸配列又はヌクレオチド配列の同一アミノ酸残基又は同一塩基数の割合(%)をいう。「数個」とは、2~10個、例えば、2~7個、2~5個、2~4個、2~3個をいう。天然変異体の具体例としては、SNP (一塩基多型) 等の多型に基づく変異体、スプライス変異体、アミノ酸縮重に基づく変異体等が挙げられる。

本明細書の「CD9の抑制剤(CD9抑制剤)」とは、生体、組織又は細胞内においてCD9の発現又は機能を阻害又は抑制することのできる物質をいう。例えば、CD9をコードする遺伝子(以下、CD9遺伝子とする)の発現を阻害する若しくは抑制する物質、発現したCD9の細胞内輸送を阻害する若しくは抑制する物質又はCD9のタンパク質機能を失活させる、阻害する、抑制する若しくは競合的に排他する物質のいずれであってもよい。CD9遺伝子の発現を阻害する若しくは抑制する物質であれば、例えば、CD9遺伝子の転写産物を標的とする物質が挙げられる。また、CD9のタンパク質機能を失活させる、阻害する、抑制する若しくは競合的に排他する物質であれば、例えば、CD9アプタマー及び抗CD9抗体が挙げられる。

CD9抑制剤は、CD9の発現又は機能を抑制する物質であれば、その構成成分については特に限定しない。例えば、タンパク質(抗体を含む)、核酸(当該分野で公知の核酸類似体を含む)、低分子化合物又はそれらの組み合わせで構成されていてもよい。

前述のように、本発明は、CD9の発現又は機能を抑制することにより血管新生が抑制されるという知見に基づく。それ故、本発明の血管新生抑制剤において、CD9抑制剤は、血管新生抑制剤を構成する有効成分として作用する。

以下、CD9遺伝子の転写産物を標的とする物質、CD9アプタマー及び抗CD9抗体について、それぞれ具体的に説明をする。

1-1. CD9遺伝子の転写産物を標的とする物質

「CD9遺伝子の転写産物」とは、野生型CD9遺伝子又はその天然変異体から転写されたCD9のmRNA(mRNA前駆体及び成熟mRNAを含む)(以下、CD9 mRNAとする)をいう。本明細書において、CD9 mRNAは、CD9の機能を保持するアミノ酸領域をコードしたヌクレオチド領域を包含していれば足り、必ずしもCD9の全長をコードしている必要はない。CD9の機能阻害又は抑制を目的とするためである。

「CD9遺伝子の転写産物を標的とする物質」とは、CD9 mRNAが転写された後、翻訳されるまでの間にCD9の発現を阻害又は抑制する物質である。例えば、核内においてCD9 mRNAの転写後、CD9 mRNAのmRNAスプライシングを阻害又は抑制する物質、成熟CD9 mRNAの核外輸送を阻害又は抑制する物質、核外においてCD9 mRNAを分解する(サイレンシングを含む)物質又はCD9 mRNAの翻訳を阻害する物質が挙げられる。このうち、CD9 mRNAを分解する物質及び/又はCD9 mRNAの翻訳を阻害する物質としては、例えば、CD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸、CD9-U1アダプター又はそれらをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクター、あるいはモルフォリノオリゴ等が挙げられる。以下、CD

9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸、CD9-U1アダプター又はそれらをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクターについて説明をする。

1-1-1. CD9のRNA干渉剤

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、CD9RNA干渉剤である。「RNA干渉剤」とは、生体内においてRNA干渉(RNA interference: RNAi)を誘導し、標的とする遺伝子の転写産物の分解を介してその遺伝子の発現を抑制(サイレンシング)することができる物質をいう。例えば、siRNA(small interfering RNA)、shRNA(short hairpin RNA)又はmiRNA(micro RNA)が挙げられる。したがって、「CD9のRNA干渉剤」とは、CD9に対して遺伝子のサイレンシングを誘導することのできる物質であり、本発明においては、例えば、CD9-siRNA(1)又はCD9-shRNA(2)が該当する。以下、それぞれについて詳細に説明をする。

10

なお、RNA干渉については、例えば、Bass B.L., 2000, Cell, 101, 235-238; Sharp P.A., 2001, Genes Dev., 15, 485-490; Zamore P.D., 2002, Science, 296, 1265-1269; Dernburg, A.F. & Karpen, G.H., 2002, Cell, 111, 159-162)を参照されたい。

(1) CD9-siRNA

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、CD9-siRNA、すなわちCD9遺伝子の転写産物を標的とするsiRNAである。「siRNA」とは、標的とする遺伝子の一部に対応する塩基配列を有するセンス鎖及びそのアンチセンス鎖からなる小分子二本鎖RNAである。siRNAを細胞(真核細胞)へ導入することによってRNA干渉を誘導することができる。

20

CD9-siRNAの設計は、公知のsiRNA設計法に従って行うことができる。例えば、改訂RNAi実験プロトコル(羊土社、2004年)又はRNAi法とアンチセンス法(講談社、2005年)に記載の方法に従って設計することができる。また、siRNAを受託製造販売しているメーカー(例えば、インビトロジェン社)には、目的遺伝子の情報をweb上で入力するだけで適切なsiRNA配列候補を即座に探索できるプログラムをweb上で提供しているところもあるので、これを利用してsiRNAの設計を行うこともできる。

30

CD9-siRNA設計の具体例を挙げると、CD9遺伝子の塩基配列(例えば、ヒトCD9であれば、配列番号2で示される塩基配列)からRNAセンス鎖の塩基配列として、15塩基以上35塩基以下、好ましくは15塩基以上30塩基以下、より好ましくは18塩基以上25塩基以下の連続した塩基配列領域を選択する。このとき選択する領域の塩基配列は、標的とするCD9遺伝子の塩基配列と完全に一致させるように留意する。たとえ1塩基であっても当該領域内にミスマッチが存在するとRNAi効果が得られず、CD9抑制剤として機能し得ないためである。それ故、選択領域内にはCD9遺伝子の既知の変異箇所(例えば、SNPを含む)を含まないように設計することが好ましい。ただし、意図的にそのような変異塩基を有するCD9遺伝子を特異的に抑制することを目的とする場合は、この限りではない。RNAアンチセンス鎖の塩基配列は、選択した前記RNAセンス鎖の塩基配列に相補的な塩基配列とする。なお、siRNAの調製に際しては、センス鎖、アンチセンス鎖共に選択領域内のT(チミン)塩基をU(ウラシル)塩基に変換しておく。

40

前記選択領域は、CD9をコードする塩基配列内又はそれに相補する塩基配列内に存在する領域であって、CD9に特異的な配列であれば特に限定はしない。好ましくは開始コドンから少なくとも50塩基、より好ましくは70塩基~100塩基よりも下流の領域である。これは、開始コドンから少なくとも100塩基が、RNAiの阻害要因となり得る転写調節因子等の結合部位を包含する又はそれに隣接するためである。さらに、RNAセンス鎖の候補領域内においてAA(アデニン アデニン)を5'側に有する塩基配列領域を選択することが好ましい。選択した領域内のGC(グアニン シトシン)含有量は、好

50

ましくは20～80%、より好ましくは30～70%、一層好ましくは40～60%である。加えて、選択した領域のRNAセンス鎖及びRNAアンチセンス鎖の3'末端側にTT(チミン チミン)又はUU(ウラシル ウラシル)、好ましくはTTを付加することが好ましい。これは、RNAi効率を高めることができるからである(Tuschl et al., 1999, Genes Dev, 13(24):3191-7)。ヒトCD9-siRNAとして好ましいRNAセンス鎖及びアンチセンス鎖は、例えば、限定はしないが、それぞれ配列番号3及び4で示される塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。このヒトCD9-siRNAは、配列番号2で示される全長ヒトCD9遺伝子の塩基配列の126～144番に対応する塩基配列をセンス鎖に、またそれに相補する塩基配列をアンチセンス鎖にそれぞれ含む。当該領域は、CD9の細胞外ドメインEC2においてCD9に特異的であり、かつ構造上重要とされる可変領域をコードする。

CD9-siRNAは、設計された塩基配列に基づいて、化学的合成法又は当該分野で公知のインビトロRNA転写法によって調製することができる。好ましくは、化学的合成法である。インビトロRNA転写法と比べて調製手順が簡便で自動化が容易であり、一定の量のsiRNAを多量に得ることができるからである。siRNAの調製は、現在、多くのライフサイエンス系メーカー(例えば、タカラバイオ社、インビトロジェン社等)が受託製造サービスを行っており、それらを利用することもできる。

CD9-siRNAは、標的遺伝子に対する抑制効果の一般性が高い点において、後述する抗CD9抗体と比較して有利である。一般に、抗体は、同一のリガンドを用いて作製されたモノクローナル抗体間でさえも標的に対する抑制効果に著しい差異が見られ、ときには抗体間で全く逆の作用効果を示す場合も知られている。したがって、通常、標的とするタンパク質の異なる領域をリガンドとして作製された場合、それぞれ抗体毎にその効果を検証しなければならない。一方、siRNAは、標的遺伝子の塩基配列上の任意領域を選択しても、同一標的遺伝子に対して作製された各siRNA分子が一定以上の抑制効果を有することが知られている。また、各siRNA分子は、同一のRNAサイレンシング機構、すなわちRNA干渉によって標的遺伝子の発現を抑制することから、通常、抗体のようにsiRNA分子間で逆の作用効果を示す場合はない。

さらに、RNAi医薬は、抗体医薬よりも治療効果と安全性の面で優れていることが実験及び臨床試験でも証明されている。例えば、2007年にOpko Health社はVEGF標的siRNA医薬であるベバシラニブ(Bevasiranib)の加齢黄斑変性症に対する第III相臨床試験を行った際に、抗VEGF抗体医薬ルセンチス(Lucen-tis)との治療効果の検討を行っている。その結果、siRNA医薬であるベバシラニブの安全性と認容性が抗体医薬のルセンチスより優れていることが証明され、加齢黄斑変性症を有効に治療できるものとして評価された(実験医学, 2008, Vol. 26, No. 10(増刊):1651-1656)。また、後述するsiRNAやshRNAをコードするDNAを発現可能なように挿入した発現ベクターを生体内に投与した場合、そのベクターが生体内で維持され、コードするsiRNAやshRNAを発現し続ける限り、RNA干渉の効果を享受することができる。それ故、RNA干渉を利用するCD9-siRNA等であれば、抗CD9抗体よりも注入回数を減じることができる。血管新生疾患及び癌の治療において、特に糖尿病網膜症及び加齢黄斑変性等のような眼疾患の治療において、血管新生抑制剤を注射によって注入する場合、その注入回数は少しでも少ない方が侵襲性や細菌感染率の軽減の点からも有利である。したがって、本発明のRNA干渉を利用するCD9-siRNA等は、既存の抗VEGF抗体であるベバシズマブに比べて有利な効果を有する。

加えて、既存のVEGF抗体医薬は、VEGFが関与する血管新生にのみ治療効果を奏するものであって、HGF等の他の血管新生促進因子の作用までは抑制できない。したがって、血管新生抑制剤としての治療効果と有用性は限定される。また、全ての血管新生促進因子に対する抗体を作製し、投与方法も現実的ではない。加えて、幾つかの抗体を同時に使用することは安全面からも問題がある。VEGFだけでなく、HGF等の他の血管新生促進因子による血管新生をも抑制できる汎用性のある血管新生阻害剤は未だに開発

10

20

30

40

50

されていないが、最も理想的な医薬は、このように機序の異なる血管新生を一つの医薬で「一般化」して阻害できる医薬である。

(2) CD9 - shRNA

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、CD9 - shRNA、すなわちCD9遺伝子の転写産物を標的とするshRNA (short hairpin RNA) である。「shRNA」とは、標的とする遺伝子の一部に対応する塩基配列のセンス鎖とそのアンチセンス鎖が短いスペーサ配列で連結された一本鎖RNAである。shRNAは、一分子内でセンス領域とアンチセンス領域が互いに塩基対合し、同時に前記スペーサ配列がループ構造をとることによって、分子全体としてヘアピン型のステム・ループ構造を有する。shRNAが細胞内に導入されると、ループ構造部分が切断されて二本鎖RNA分子、すなわちsiRNAが生成される。生じたsiRNAは、前項で述べたsiRNAと同様のRNA干渉機構によって標的遺伝子の発現を抑制することができる。

CD9 - shRNAの設計は、例えば、まずCD9をコードする塩基配列(例えば、ヒトCD9であれば、配列番号2で示される塩基配列)よりRNAセンス鎖に相当する領域の塩基配列として、通常19塩基以上23塩基以下、好ましくは20塩基以上22塩基以下、より好ましくは21塩基の連続した配列を選択し、それをセンス領域とする。このとき選択する領域の塩基配列は、前記CD9 - siRNAの設計と同様でよい。そして、そのセンス領域に相補する塩基配列をアンチセンス領域とする。また、各領域の3'末端側は、TT又はUUを付加することを要しない。ヒトCD9 - siRNAの場合、好ましいセンス領域及びアンチセンス領域は、例えば、それぞれ配列番号5及び6で示される塩基配列である。続いて、選択された前記RNAのセンス領域の3'末端と前記アンチセンス鎖の5'末端とをスペーサ配列で連結する。スペーサ配列は、通常3~24塩基、好ましくは、4~15塩基からなる任意の塩基配列とすることができる。したがって、CD9 - shRNAは、全体として、通常41~80塩基、好ましくは45~70塩基、より好ましくは48~65塩基で構成することができる。

CD9 - shRNAは、設計された塩基配列に基づいて、化学的合成法又は当該分野で公知のin vitro RNA転写法によって調製することができる。例えば、Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。

1-1-2. CD9アンチセンス核酸

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、CD9アンチセンス核酸、すなわち、CD9遺伝子の転写産物を標的とするアンチセンス核酸である。ここで言う核酸は、DNA又はRNAのみならず、例えば、PNAやLNAのような核酸類似体も含む。本発明で使用する「CD9アンチセンス核酸」は、CD9 mRNAの全体若しくはその部分に相補的な配列を有する核酸分子であり、細胞内においてCD9 mRNAに結合して、その発現(又は、タンパク質への翻訳)を抑制することができる。

本発明のアンチセンス核酸は、当該分野における公知の合成又は転写技術を用いて作製することができる。例えば、Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。

1-1-3. CD9-U1アダプター

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤はCD9-U1アダプター、すなわち、CD9遺伝子の転写産物を標的とするU1アダプターである。「U1アダプター」とは、約25塩基からなる二機能性のオリゴヌクレオチドであって、標的遺伝子のmRNA前駆体における3'末エクソンに相補的な5'側の「標的ドメイン」とU1 snRNAの5'領域に相補的な配列を有する3'側の「U1ドメイン」を含む(Goraczniak R., et al., 2009, Nat Biotechnol., Vol 27, p

10

20

30

40

50

257-263,)。U1アダプターを導入するとU1 snRNAを含むU1核内低分子リボ核蛋白質(U1 snRNP)が標的遺伝子のmRNA前駆体のポリAシグナル周辺に結合し、該mRNAのポリアデニル化を特異的に阻害する。その結果、標的遺伝子のmRNA前駆体は不安定化し、その後、核内で分解されることによって、遺伝子のサイレンシングが生じる。したがって、CD9遺伝子を標的としたU1アダプターを設計すれば、CD9の発現を特異的に抑制することができる。

1-1-4. 発現ベクター

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、CD9のRNA干渉剤(例えば、CD9-siRNA又はCD9-shRNAを含む)、CD9アンチセンス核酸及びCD9-U1アダプターをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクターである。本ベクターを目的の細胞に導入した場合、それが細胞内で維持されている限りsiRNA等の効果を所定の細胞に供給し続けることができる。それ故、侵襲性を一層低くすることができる。

10

(1) CD9-siRNAをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクター

「CD9-siRNAをコードするDNA」とは、CD9-siRNAを構成するRNAセンス鎖及びRNAアンチセンス鎖のそれぞれをコードするDNA断片をいう。具体的には、限定はしないが、配列番号3及び4又は配列番号5及び6で示される塩基配列を含むDNA断片である。本発現ベクターは、CD9-siRNAをコードするDNA断片をそれぞれ別個に、すなわちトランスで、発現ベクターに挿入したものである。各DNA断片は、複数の発現ベクターにそれぞれ挿入してもよいし、一の発現ベクター内でそれぞれ別個のDNA断片として発現可能なように挿入してもよい。各DNA断片は、発現ベクター中のプロモータの下流にそれぞれのRNA鎖を発現可能なように連結されている。一般にsiRNAの転写には、RNAポリメラーゼIII(Pol III)系のプロモータ、特にU6及びH1等のプロモータが用いられることが多い。これは、Pol III系プロモータの転写量がPol II系に比べて多く、該プロモータが短いRNAを効率よく転写できるためである。ただし、必ずしもこれらのプロモータに限定されるものではない。例えば、生体内の所定の部位でのみ発現を誘導する部位特異的プロモータを使用することもできる。これらは必要に応じて、適宜選択すればよい。また、一の発現ベクターにセンス鎖及びアンチセンス鎖をコードするDNA断片をそれぞれ独立に発現可能なように挿入する場合、各鎖が同程度で発現するように、プロモータは、同一の又は同程度の発現活性を有する異なるプロモータを用いることが好ましい。

20

30

本発明で使用される発現ベクターは、ヒトに投与する場合、公知のベクター(例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス、あるいは非ウイルスベクターを基礎とするベクター)を使用することができる。前記各DNA断片を挿入するのに使用する発現ベクターは、同一種であってもよいし、異なる種類のものであってもよい。目的、作用箇所等の様々な条件に応じて、適宜選択すればよい。

センス鎖及びアンチセンス鎖をコードするDNA断片をそれぞれ挿入した別個の発現ベクターを用いて血管新生疾患又は癌の治療を行う場合、各発現ベクターを共に、好ましくは等量で投与する。投与された細胞内において、CD9-siRNAが機能するためには、それぞれの発現ベクターからセンス鎖及びアンチセンス鎖が転写される必要があるためである。

40

(2) CD9-shRNAをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクター

本発現ベクターは、CD9-shRNAをコードするDNA断片を発現ベクターに挿入したものである。CD9-siRNAを構成するセンス領域及びアンチセンス領域がスペーサ配列を介して一本のDNA分子内に、すなわちシスで存在する。例えば、配列番号5及び/又は6で示される塩基配列を含み、配列番号5の3'末端と配列番号6の5'末端がスペーサ配列を介して連結されている。細胞への導入は、通常、この1種の発現ベクターで足り、より効率的にCD9-siRNAによるRNAi効果を導入細胞に付与するこ

50

とができるので便利である。発現ベクターは、前記CD9-siRNAをコードするDNAを連結した発現ベクターと同様のものを用い、同様の方法で発現可能なようにそのベクター内に挿入することができる。

これらの発現ベクターは、各メーカーから様々な種類のものが市販されており、また、目的のshRNA(本発明ではCD9-shRNA)の設計及びそれをコードするDNAを挿入した発現ベクターの構築を、それらのメーカーに委託することも可能である。したがって、そのようなサービスを利用してよい。

(3) CD9アンチセンス核酸コードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクター

本発現ベクターは、CD9アンチセンス核酸をコードするDNA断片を発現ベクターに挿入したものである。本発現ベクターは、前記CD9-siRNAをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクターの一方、すなわち、CD9のRNAアンチセンス鎖をコードするDNA断片を挿入した発現ベクターに相当する。一般にアンチセンスRNAの転写には、CMVプロモータ等のようにその制御下にある核酸を構成的に発現できるプロモータが用いられることが多い。もちろん、必ずしもこのようなプロモータに限定されるものではない。前述のように、例えば、生体内の所定の部位でのみ発現を誘導する部位特異的プロモータを使用することもできる。これらは必要に応じて、適宜選択すればよい。

(4) CD9-U1アダプターをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクター

「CD9-U1アダプターをコードするDNA」とは、CD9-U1アダプターを構成するオリゴヌクレオチド配列をコードするDNA断片をいう。本発現ベクターは、前記CD9-U1アダプターをコードするDNAを発現可能なように発現ベクターに挿入したものである。使用する発現ベクターやプロモータ等については、基本的には、前記CD9-siRNA又はCD9-shRNAをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクターで使用したものと同様のものが利用できる。

上記のように、CD9遺伝子の発現を阻害する若しくは抑制するCD9のRNA干渉剤(例えば、CD9-siRNA又はCD9-shRNA)、CD9核酸、CD9-U1アダプター又はそれらをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクターは、CD9タンパク質の機能自体を根源的に抑制することができるため、本発明の血管新生抑制剤として特に好ましい。

1-2. CD9アプタマー

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、CD9アプタマーである。

「アプタマー」とは、標的物質と特異的に結合する能力を持ったリガンド分子をいう。アプタマーは、分子の種類により、核酸(DNA、RNA)アプタマーとペプチドアプタマーに大別することができる。いずれのアプタマーも、その分子が有する立体構造によって標的物質(例えば、タンパク質)と直接結合し、標的物質の機能の特異的に抑制することができる。本発明のCD9アプタマーは、CD9抑制剤として作用することから、CD9タンパク質(主として、CD9の細胞外ドメイン)を主な標的分子とする。そのような分子と結合するものであれば、核酸(DNA、RNA)アプタマー及びペプチドアプタマー等、その種類は問わない。

CD9アプタマーは、標的物質と直接結合することから、作用機序が簡単で、細胞外でも作用させることができる。また、後述する抗CD9抗体よりも高い特異性と親和性により標的分子と強固に結合させることができる。免疫原性や毒性も低く、かつ3~4週間程度の短期間で作製可能という点において抗CD9抗体よりも優れている。さらに、核酸アプタマーは、化学合成により大量に製造することも可能である。

本発明のCD9アプタマーは、CD9又はその断片を標的分子として、当該分野で公知の方法により作製することができる。一例を挙げると、RNAアプタマーの場合にはSELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)を用いて作製することができる。SEL

10

20

30

40

50

EXとは、ランダム配列のRNAライブラリーから標的分子であるCD9に結合する配列を選択し、それらを逆転写、PCR反応によって増幅し、それを鋳型として転写を行い、次のラウンドのライブラリーにするという一連のサイクルを数～数十ラウンド繰り返した後、より結合力の強いRNAを選択する方法である。最終的に得られた、RNAをCD9-RNAアダプターとして利用する。アダプターに関しては、例えば、Janasena, Clin. Chem. 45:1628-1650(1999)を参照されたい。

前述のように、CD9は膜タンパク質であることから、CD9アダプターの標的分子となるCD9上の領域としては細胞外又は細胞内ドメイン又はそれらの一部領域、好ましくは細胞外ドメイン又はその一部領域を選択することが好ましい。

1-3. 抗CD9抗体

一の実施形態で、本発明におけるCD9抑制剤は、抗CD9抗体又はその断片である。好ましくは抗ヒトCD9抗体又はその断片である。ここでいう「抗体」とは、免疫グロブリン若しくはその断片に由来するフレームワーク領域(FR: frame work region)及び相補性決定領域(CDR: complementarity determining region)を含み、抗原に特異的に結合し、かつそれを認識することができるポリペプチドをいう。したがって、本発明の「抗CD9抗体」とは、CD9若しくはその断片に特異的に結合し、かつCD9若しくはその断片を認識できるポリペプチドをいう。同様に「抗ヒトCD9抗体」とは、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるヒトCD9若しくはその天然変異体又はそれらの断片に特異的に結合し、かつヒトCD9若しくはその天然変異体又はそれらの断片を認識できるポリペプチドをいう。ここでいう「それらの断片」とは、(ヒト)CD9若しくはその天然変異体の一部領域であって、(ヒト)CD9若しくはその天然変異体のエピトープを少なくとも1つ有し、本発明の抗体又はその断片によって認識され得るポリペプチド断片をいう。本断片は、(ヒト)CD9の全長アミノ酸配列の30%以上、好ましくは40%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上、一層好ましくは70%以上、より一層好ましくは80%以上又は90%以上を有する。また、前記「特異的に結合」とは、標的抗原(例えば、抗ヒトCD9抗体であればヒトCD9若しくはその天然変異体又はそれらの断片)のみと結合することを意味する。

本発明の抗CD9抗体は、鳥及び哺乳動物を含めたあらゆる動物由来とすることができる。例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ロバ、ヒツジ、ラクダ、ウマ、ニワトリ又はヒト等が挙げられる。

本発明において「抗体」は、ポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を含む。ただし、本発明の血管新生抑制剤がヒトに投与することを目的とした組成物である場合には、本発明の「抗体」は、化学的に合成した又は組換えDNA法によって合成した組換え抗体であることが望ましい。なぜなら、ヒト以外の生物に由来する抗CD9抗体の定常領域は、ヒト体内において抗原性を有するため、当該抗体に対して免疫反応を起こしてしまい、本発明の目的を達成し得ないからである。本明細書において前記「組換え抗体」とは、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体及び合成抗体をいう。

「キメラ抗体」とは、ある抗体の定常領域を他の抗体の定常領域で置換した抗体である。本発明においては、ヒト以外を動物由来である抗ヒトCD9抗体の定常領域をヒト由来の適当な定常領域と置換した抗体を意味する。例えば、抗ヒトCD9マウスモノクローナル抗体の定常領域をヒト抗体の定常領域で置換した抗体が該当する。

「ヒト化抗体」とは、ある抗体(通常、非ヒト抗体、例えば、マウス抗体)由来のCDR群(すなわち、CDR1、CDR2、CDR3)とヒト抗体のFR群(すなわち、FR1、FR2、FR3、FR4)及び定常領域とを人為的に組合せたモザイク抗体である。本発明の場合であれば、例えば、抗ヒトCD9マウスモノクローナル抗体のCDR群と、任意のヒト抗体のFR群及び定常領域とを組合せた抗体が該当する。このようなヒト化抗体は、CDRグラフト抗体(Nature(1986)Vol.321,522)とも呼ばれている。

「合成抗体」とは、例えば、組換えDNA法を用いて新たに合成された抗体若しくは抗

10

20

30

40

50

体断片をいう。具体的には、限定はしないが、本発明の抗体の一以上の V_L 及び一以上の V_H を適当な長さで配列を有するリンカーペプチド等を介して人工的に連結させた一量体ポリペプチド分子又はその多量体ポリペプチドが該当する。一量体ポリペプチド分子としては、例えば、一本鎖Fv (single chain Fragment of variable region) (Pierce Catalog and Handbook, 1994 - 1995, Pierce Chemical Co., Rockford, IL参照)が該当する。免疫グロブリン分子において、一本鎖Fvは、軽鎖と重鎖に位置する可変領域(すなわち、それぞれ V_L 及び V_H)を十分な長さの柔軟性リンカーによって連結し、1本のポリペプチド鎖に包含した構造を有する合成抗体である。一本鎖Fv内において両可変領域は、互いに自己集合して1つの機能的な抗原結合部位を形成することができる。一本鎖Fvは、それをコードする組換えDNAを、公知技術を用いてファージゲノム等に組み込み、発現させることで得ることができる。また前記多量体ポリペプチドとしては、例えば、ダイアボディ(diabody)、トリアボディ(triabody)又はテトラボディ(tetrabody)等が該当する。ダイアボディは、一本鎖Fvの二量体構造を基礎とする構造を有した分子である(Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444 - 6448)。二価の抗体断片であるダイアボディにおいて、各抗原結合部位は、同一エピトープと結合する必要はなく、それぞれが異なるエピトープを認識し、結合する二重特異性を有していても構わない。例えば、一方の抗原結合部位がCD9のEC1に存在するエピトープを認識し、他方の抗原結合部位がCD9のEC2に存在するエピトープを認識するダイアボディであってもよい。トリアボディ及びテトラボディは、ダイアボディと同様に一本鎖Fv構造を基本としたその三量体及び四量体構造を有する。それぞれ、三価及び四価の抗体断片であり、多重特異性抗体であってもよい。

本明細書で使用する場合、「抗CD9抗体又はその断片」における「その断片」とは、上述した抗体の部分領域であって、該抗体が有する抗原特異的結合活性と実質的に同等の活性を有するポリペプチド鎖又はその複合体をいう。例えば、前述の抗原結合部位を少なくとも1つ包含する抗CD9抗体部分、すなわち、少なくとも1つの V_L と少なくとも1つの V_H を有するポリペプチド鎖又はその複合体が該当する。具体例としては、免疫グロブリンを様々なペプチダーゼで切断することによって生じる抗体断片等が挙げられる。より具体的な例としては、Fab、F(ab')₂、Fab'等が挙げられる。

抗CD9抗体は、当該分野で公知の方法によって作製すればよい。又はこれらの技術は、当該分野において周知である。例えば、Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Yorkを参照されたい。

2. 血管新生疾患又は癌の治療用としての血管新生抑制剤。

本発明の血管新生抑制剤及びこれを含有する後述の血管新生抑制組成物は、血管新生疾患又は癌の治療用として使用することができる。本発明の血管新生抑制剤及びこれを含有する血管新生抑制組成物は、それを体内投与することによって血管新生を抑制できる。したがって、本発明の血管新生抑制剤及びこれを含有する血管新生抑制組成物によれば、血管新生の発生、進行を原因とする疾患、特に糖尿病網膜症、加齢黄斑変性において、その治療目的とした使用が可能である。

本発明において「血管新生疾患」とは、血管新生により発症する及び/又は血管新生の進行により症状が悪化する疾患を意味する。例えば、前述のように、眼疾患では糖尿病網膜症及び加齢黄斑変性、脈管系疾患では血管線維腫及びアテローム硬化性プラーク、皮膚疾患では乾癬及び血管腫、骨関節疾患ではリウマチ様関節炎及び変形性関節症、並びに生殖器系疾患では卵胞嚢胞及び卵巣肥大症候群が挙げられる。

本発明において前記「癌」は、各種固形腫瘍を意味する。例えば、上咽頭腫、甲状腺腫瘍、中枢神経系腫瘍(例えば、神経芽細胞腫、星状細胞腫又は多形性膠芽腫)、黒色腫、

脈管腫瘍、血管腫瘍（例えば、血管腫、血管肉腫）、上皮性腫瘍、非上皮性腫瘍、血腫、白血病、リンパ腫、子宮頸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、大腸癌、肝癌、泌尿生殖器癌、卵巣癌、精巣癌、骨肉腫、軟骨肉腫、胃癌又は膵臓癌が挙げられる。

3．血管新生抑制組成物

本発明の一の態様は、少なくとも1以上の前記血管新生抑制剤を有効成分として含有し、かつ製薬上許容可能な担体を含む血管新生抑制組成物である。

3-1．製薬上許容可能な担体

「製薬上許容可能な担体」とは、製剤技術分野において通常使用する溶媒及び/又は添加剤をいう。

前記溶媒には、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。これらは、殺菌されていることが望ましく、必要に応じて血液と等張に調整されていることが好ましい。

また、前記添加剤には、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤、滑沢剤等が挙げられる。

賦形剤としては、例えば、単糖、二糖類、シクロデキストリン及び多糖類のような糖（より具体的には、限定はしないが、グルコース、スクロース、ラクトース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストリン、マルトデキストリン、デンプン及びセルロースを含む）、金属塩（例えば、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム）、クエン酸、酒石酸、グリシン、低、中、高分子量のポリエチレングリコール（PEG）、ブルロニック、カオリン、ケイ酸、あるいはそれらの組み合わせが挙げられる。結合剤としては、例えば、トウモロコシ、コムギ、コメ、若しくはジャガイモのデンプンを用いたデンプン糊、単シロップ、グルコース液、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、セラック及び/又はポリビニルピロリドン等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば、前記デンプンや、乳糖、カルボキシメチルデンプン、架橋ポリビニルピロリドン、アガー、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、アルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド又はそれらの塩が挙げられる。充填剤としては、例えば、前記糖及び/又はリン酸カルシウム（例えば、リン酸三カルシウム、若しくはリン酸水素カルシウム）が挙げられる。乳化剤としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステルが挙げられる。流動添加調節剤及び滑沢剤としては、例えば、ケイ酸塩、タルク、ステアリン酸塩又はポリエチレングリコールが挙げられる。

このような担体は、主として前記剤形形成を容易にし、また剤形及び薬剤効果を維持するために用いられるものであり、必要に応じて適宜使用すればよい。上記の添加剤の他、必要であれば矯味矯臭剤、可溶化剤、懸濁剤、希釈剤、界面活性剤、安定剤、吸収促進剤、増量剤、付湿剤、保湿剤、吸着剤、崩壊抑制剤、コーティング剤、着色剤、保存剤、抗酸化剤、香料、風味剤、甘味剤、緩衝剤等を含むこともできる。

本発明の医薬組成物は、前記血管新生抑制剤が有する薬理効果を失わない範囲において、他の薬剤を含有することもできる。例えば、注射剤の場合であれば、抗生物質を所定量含有していても良い。

3-2．血管新生抑制組成物の製造

本発明の血管新生抑制組成物の製造方法については、原則として当業者に公知の製剤化方法を応用すればよい。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Merck Publishing Co., Easton, Pa.)に記載された方法を用いることができる。

本発明の血管新生抑制組成物の剤形は、包含する血管新生抑制剤又は他の有効成分を不活化させない形態であれば特に限定しない。例えば、液体、固体又は半固体のいずれであ

10

20

30

40

50

ってもよい。具体的な剤形としては、例えば、注射剤、懸濁剤、乳剤、点眼剤、点鼻剤、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、シップ剤及び座剤等の非経口剤形又は液剤、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、トローチ剤等の経口剤形が挙げられる。血管新生抑制剤がCD9のRNA干渉剤（例えば、CD9-siRNA又はCD9-shRNA）、CD9アンチセンス核酸、CD9-U1アダプター又はそれらをコードするDNAを発現可能なように連結した発現ベクター、CD9アプタマー及び/又は抗CD9抗体の場合には、剤形は注射剤であることが好ましい。

本発明の血管新生抑制組成物の製造において、血管新生抑制組成物中の血管新生抑制剤の含有率は、その抑制剤の種類及び/又は効果の強さ、並びに血管新生抑制組成物の剤形、使用する担体、希釈剤及び/又は賦形剤の種類、製薬上許容される範囲等の様々な条件によって異なる。これらは、当該分野の公知技術に基づいて、適宜選択される。例えば、注射剤として調製する場合には、薬学的に許容可能な担体であるヌクレアーゼフリーの水に溶解し、好ましくは等張性の溶液（例えば、生理食塩水）を調製する上で十分な量の食塩、グルコース又はグリセリン及び通常の溶解補助剤、緩衝剤、pH調整剤、無痛化剤等も配合して当該分野で慣用されている方法により製造することができる。CD9抑制剤が配列番号3及び4からなるCD9-siRNAであって、血管新生抑制剤の剤形が注射剤の場合であれば、血管新生抑制剤の含有率は、一投与単位あたり通常0.1% (w/v) ~ 20% (w/v)、好ましくは0.1% (w/v) ~ 10% (w/v)である。具体的には、例えば、1回1mlの注射剤を製造する場合、前記血管新生抑制剤を通常1µg ~ 200µg含んでいればよい。

一の実施形態において、本発明の血管新生抑制剤は、製薬上許容可能な範囲内において、一の血管新生抑制剤に二以上の血管新生抑制剤を含むことができる。例えば、二組以上のCD9-siRNA又は二種以上のCD9-shRNAをコードするDNAを発現可能なように連結した一以上の発現ベクターを有効成分として含有する血管新生抑制組成物が挙げられる。さらに、一以上のCD9-siRNA及び一以上の抗CD9抗体を有効成分として含有してもよい。この場合、CD9を抗CD9抗体により直接的に（すなわち、タンパク質の機能レベルで）及びCD9-siRNAにより間接的に（すなわち、発現レベルで）抑制可能であることから、CD9-siRNAや抗CD9抗体を単独で使用する場合と比べてより効果的な結果が期待できる。また、本発明の血管新生抑制組成物は、製薬上許容可能な範囲内において一以上の本発明の血管新生抑制剤と、一以上の他の血管新生抑制効果を有する製剤とを含む複合製剤とすることもできる。ここでいう他の血管新生抑制効果を有する製剤とは、血管新生の抑制効果が立証されている公知の製剤をいう。例えば、ベバシズマブが挙げられる。ベバシズマブのように本発明の血管新生抑制剤とは標的物質が異なる（ベバシズマブはVEGFを標的とする抗VEGF抗体である）が、同一の作用効果（血管新生抑制作用）を有する製剤との併用は、血管新生を誘導し促進する複数の因子を多面的に抑制できることから、それらを単独で使用する場合と比べより効果的な結果が期待できる。

4. 血管新生抑制剤又は血管新生抑制組成物の投与方法

本発明の他の実施形態は、本発明の血管新生抑制剤又は血管新生抑制組成物を血管新生疾患又は癌の治療のために製薬上有効な量を生体に投与することである。投与する対象となる生体は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。

本明細書で使用する場合、「製薬上有効な量」とは、本発明の血管新生抑制剤又は血管新生抑制組成物に含有される血管新生抑制剤が血管新生疾患又は癌を治療可能な用量、具体的には新たな血管新生を抑制及び阻害することができる用量であって、かつ投与する生体に対して有害な副作用（例えば、正常組織におけるCD9の機能を阻害する等）がほとんどない又は全くない用量を言う。その具体的な量は、使用される剤形、被験体（特に、被験者）の情報及び投与経路によって異なる。ヒトに製剤を投与する場合には、製薬上有効な量の範囲及び好適な投与経路は、一般に細胞培養アッセイ及び動物実験から得られたデータに基づいて策定される。最終的な投与量は、個々の被験者に応じて医師の判断により決定され、調整される。その際に、勘案される被験者の情報には、病気の進行度若しく

は重症度、全身の健康状態、年齢、体重、性別、食生活、薬剤感受性及び治療に対する耐性等が含まれる。

本発明の血管新生抑制剤は、全身投与又は局所的投与のいずれであってもよい。疾患の種類、発症箇所又は進行度等に応じて適宜選択することができる。例えば、加齢黄斑変性のように病巣部が特定されている場合であれば、限定はしないが、局所的投与が好ましい。治療すべき箇所（組織又は器官）に本発明の血管新生抑制剤を十分量投与することができ、また他の組織に影響を及ぼしにくいからである。一方、転移性癌のように治療箇所を特定できない場合には、限定はしないが、全身投与が好ましい。血流を介して本発明の血管新生抑制剤を全身に行き渡らせることで、診断で発見できない病変部にも投与が可能となるからである。

本発明の血管新生抑制剤は、含有される有効成分が失活しないあらゆる適当な方法で投与することができる。例えば、非経口（例えば、注射、エアロゾル、塗布、点眼、点鼻）又は経口のいずれであってもよい。好ましくは、注射である。注射の場合、導入部位は特に限定しない。例えば、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、骨髄内、髄腔内、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内又は舌下等のあらゆる部位又は組織が挙げられる。好ましくは、病変部位又はその周辺部に局所的に直接注射することである。例えば、病変部が特定可能な加齢黄斑変性又は糖尿病性網膜症においては、この局所的注射、すなわち眼球への直接的な注射が有効である。また、全身投与を目的とする場合には、限定はしないが静脈内注射が好ましい。血流を介して本発明の血管新生抑制剤を全身に行き渡らせることが可能であり、また侵襲性が比較的 low、患者に与える負担が小さいからである。

以下、実施例によって本発明をさらに具体的に説明する、ただし、これらの実施例は例示に過ぎず、本発明はこれらの実施例により何ら制限されるものではない。

【実施例 1】

【0007】

H M V E C (H u m a n M i c r o v a s c u l a r E n d o t h e l i a l C e l l s : ヒト皮膚微小血管内皮細胞) において細胞遊走を効率的に誘導できる細胞遊走誘導因子の検証

(方法)

細胞遊走誘導因子として、血管内皮細胞増殖因子 (V E G F ; R & D 社)、肝細胞増殖因子 (H G F ; R & D 社)、ヘパリン結合性上皮増殖因子 (H B - E G F : H e p a r i n - b i n d i n g E G F - l i k e g r o w t h f a c t o r ; R & D 社)、b a s i c f i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r (b F G F ; p e p r o t e c h 社) の 4 つの増殖因子を用いて H M V E C の細胞遊走の比較を行った。細胞遊走は、I n s e r t c h a m b e r (2 4 ウェル、孔サイズ : 8 . 0 μ m ; B D F a l c o n 社) を用いて評価した。I n s e r t c h a m b e r の上室に 5 . 0 × 1 0 ⁴ 細胞 / 2 0 0 μ l (2 % F B S 含有 E G M - 2 M V 培地 (T a k a r a B i o 社)) を入れ、下室には上記増殖因子をそれぞれ 2 0 n g / m l ずつ加えた 2 % F B S 含有 E G M - 2 M V を入れた。増殖因子を非添加のサンプルを対照とした。各増殖因子群について、それぞれ 3 回実験を行った (n = 3)。開始 4、8、12 時間後に、I n s e r t c h a m b e r の上室及び下室間にある膜を通過し、下室に移動した細胞を D i f f Q u i k (S y s m e x 社) で染色し (固定液、染色液にそれぞれ 2 分間浸ける)、顕微鏡 (D P - 7 0 ; O l y m p u s 社) を用いて 4 0 倍で 5 視野 (1 視野 : 1 . 7 m m × 2 . 2 m m) の細胞数を数え、1 視野あたりの平均細胞数を算出した。

(結果)

結果を図 1 に示す。V E G F 及び H G F では細胞遊走の亢進が経時的に認められた。一方、H B - E G F、b F G F については、対照と比較して有意な差は認められなかった。

前記 4 つの増殖因子は、いずれも様々な細胞において細胞運動能や増殖能を誘導することが知られている。なかでも V E G F 及び H G F は、血管新生において重要な役割を担うとされる因子であり (S h i b u y a e t a l , 2 0 0 1 , C e l l S t r u c t u r e a n d F u n c t i o n , V o l 2 6 , 2 5 - 3 5 及び B u s s o l i n o

10

20

30

40

50

et al, 1992, The Journal of Cell Biology, Vol. 19, NO. 3)、今回の実験でもそれが証明された。そこで、以下の実験ではHMVECの遊走誘導因子としてVEGF及びHGFを用いることとした。

【実施例2】

【0008】

HMVECのCD9-siRNAによるCD9サイレンシングの確認

(方法)

siRNAの設計

ヒトCD9 mRNAを標的とするsiRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖は、それぞれ配列番号3及び4で示される塩基配列を有するRNAとした。このsiRNAの塩基配列は、CD9の発現を抑制できることが報告されている(2006, Blood, Vol. 105, No. 7, 2852-2860)。対照用siRNAには、核膜タンパク質であるヒトLaminA/C mRNAを標的とするsiRNA及びランダムな塩基配列を有するsiRNA(ランダム-siRNA)を用いた。LaminA/C mRNAを標的とするsiRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の塩基配列は、それぞれ配列番号7及び8に示す。このLaminA/C-siRNAは、センス鎖に、全長LaminA/C遺伝子の塩基配列(NM_170707)における859~877番に対応する塩基配列を含む。本領域を含むLaminA/C-siRNAは、LaminA/Cを特異的に機能抑制することが知られている(Maeshima et al., 2006, J Cell Sci 119(21):4442-4451)。また、ランダム-siRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖の塩基配列をそれぞれ配列番号9及び10で示す。前記いずれのsiRNAもTakara Bio株式会社に委託して合成したものを使用した。

HMVEC細胞のsiRNA処理

各siRNAをHMVECに導入した。具体的には、HMVEC 0.6×10^6 細胞/11ml(抗生剤不含EGM-2MV培地(Takara Bio社))をディッシュ(10cmディッシュIWAKI社)に播種し、37℃で12時間、5% CO₂インキュベータで前培養した。前培養後、600pmolの前記各siRNAを加えた1mlのOpti-MEM培地(invitrogen社)と、35µlのリポフェクトアミンRNAiMAX(invitrogen社)を加えた1mlのOpti-MEM I血清使用量低減培地(invitrogen社)とを混合した後、室温で20分放置した。対照用としてsiRNAを加えない1mlのOpti-MEM培地と35µlのリポフェクトアミンRNAiMAXを加えた1mlのOpti-MEM I血清使用量低減培地とを混合したものも同時に調製した。続いて、前記混合液を前記ディッシュに加えた。37℃、5% CO₂インキュベータで6時間インキュベートした後、抗生剤入りのEGM-2MVで培地交換し、さらに48時間培養した。

細胞の回収

前記培養後に氷上において各ディッシュを5mlのPBSで洗浄し、溶解バッファ(15mM CHAPS、0.15M NaCl、2mM EDTA(pH8)、1mM PMSF、1mM Na₃VO₄、50mM Tris-Cl(pH7.5))を300ml加えた。氷上に5分間置いた後、細胞をスクレイパ(SUMILON社)で剥離して、細胞破碎液をエッペンドルフチューブに回収した。チューブを氷中で20分間冷却した後、15000rpmで20分間遠心した。上清を別のチューブに移した後、-80℃で保存した。各サンプルは、Protein assay(Bio-Rad社)を用いてタンパク定量を行い、サンプルバッファ(0.1M SDS、1.2Mグリセロール、0.4mMプロモフェノールブルー(BPB)、0.7M Tris-HCl(pH6.8))を加えて10mg/15µlとなるように調製した。

タンパクの電気泳動

泳動槽(ミニプロティアンTetraセル、Bio-Rad社)を用いてSDS-PAGEを行った。上記で調製した各サンプルを15µl(タンパク量約10mg)ずつ5~20%勾配のレディーゲル(Bio-Rad社、17ウェル)の各ウェルに積載し、パワー

サブライ (My Power 500、ATTO社) を500V、30mAに設定して45分間泳動した。泳動後、Transblot SD (Bio-Rad社) を用いて15V、200mAの条件下で70分間通電し、ゲル中のタンパクをPVDFメンブレンに転写した。10%スキムミルクで1時間ブロッキングした後、5%スキムミルクで500倍に希釈したマウス抗ヒトCD9抗体MM2/57、Southern Biotech社) を、またタンパク質量及び転写の対照として5%スキムミルクで1000倍に希釈したマウス抗ヒト - チューブリン抗体 (Sigma社) を一次抗体として使い、さらに5%スキムミルクで5000倍に希釈したHRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Dako Cytomation社) を二次抗体として、それぞれサンプル中のCD9及び - チューブリンを検出した。前記PVDFメンブレンを500 μ lのChemi-Luminescence (nacal tesque社) に5分間浸し、HRP活性により生じた発光をX線フィルムに取り込み、画像化した。

10

(結果)

結果を図2に示す。CD9-siRNAは、血管内皮細胞におけるCD9の発現が低下していた。一方、CD9を標的としていないLaminA/C-siRNA及びランダム-siRNAでは、CD9の発現抑制は認められなかった。この結果から、本実施例で用いたCD9-siRNAによるCD9発現抑制効果が立証された。

【実施例3】

【0009】

CD9をノックダウンしたHMVECの細胞遊走の検討

20

(方法)

siRNAの設計、合成及び処理

いずれも実施例2と同様の方法によって調製した。

細胞遊走

細胞遊走は、実施例1と同様にInsert chamber (24ウェル、孔サイズ: 8.0 μ m; BD Falcon社) を用いて評価した。上室に5.0 \times 10⁴細胞/200 μ l (2% FBS含有EGM-2MV培地 (Takara Bio社)) を入れ、下室にはVEGF又はHGFを20ng/mlずつ加えた2% FBS含有EGM-2MVを入れた。各RNAiサンプルについて、それぞれ2回ずつ実験を行った (各サンプルn=3)。開始4、8、12時間後にInsert chamberの膜を通過し、下室に移動した細胞を実施例1と同様にDiff-Quick (Sysmex社) で染色後、顕微鏡 (DP-70; Olympus社) を用いて100倍 (660 μ m \times 876 μ m) で、5視野を観察し、1視野あたりの平均細胞数を算出した。

30

(結果) 結果を図3に示す。CD9-siRNAは、VEGF及びHGFによる細胞遊走の亢進 (siRNA未処理参照) を顕著に抑制した。一方、LaminA/C-siRNA及びランダム-siRNAは、VEGF及びHGFによる細胞遊走亢進をいずれも抑制することができなかった。標的mRNAとは無関係にsiRNA自体に血管新生抑制効果があることを示す報告がある (Kleinman et al: nature, Vol. 452, 2008) が、本結果のCD9-siRNAの抑制効果は、LaminA/C-siRNA及びランダム-siRNAと比較しても顕著であった。したがって、本実験の細胞遊走の抑制は、単なる非特異的siRNAの導入によるものではなく、CD9-siRNAの導入に基づくCD9の特異的抑制による血管新生抑制効果であることを強く示唆している。

40

【実施例4】

【0010】

CD9をノックダウンしたHMVECの浸潤能の検討

(方法)

siRNAの設計、合成及び処理

いずれも実施例2と同様の方法によって調製した。

細胞浸潤

50

細胞浸潤は、Invasion Insert chamber (24 ウェル、孔サイズ：8.0 μm ；膜マトリゲルコーティング：BD Biocoat社)を用いて評価した。このchamberの上室に 5.0×10^4 細胞/500 μl (2% FBEGM含有-2MV培地 (Takara Bio社))を入れ、下室には20 ng/mlのVEGF又はHGF (R&D社)を加えた2% FBS含有EGM-2MV培地を入れた。各RNAiサンプルについて、それぞれ1回ずつ実験した (各サンプルn=3)。開始16時間後に前記chamberの膜を通過した細胞をDiff Quik (Sysmex社)で染色し、顕微鏡 (DP-70; Olympus社)を用いて100倍で、5視野の細胞数を数え、1視野あたりの平均細胞数を算出した。

(結果)結果を図4に示す。VEGF又はHGFにより細胞浸潤は亢進された (siRNA未処理サンプル)。CD9-siRNAは、この亢進を顕著に抑制した。一方、LaminA/C-siRNA、及びランダム-siRNAは、HGFによる細胞浸潤の亢進を抑制することができなかった。この結果は、CD9-siRNAによるCD9の抑制が血管新生において亢進される細胞浸潤を抑制できることを強く示唆している。

【実施例5】

【0011】

ラットを用いたCD9ノックダウン治療法による治療効果の検証(1)：インビボ血管新生抑制効果の検証

(方法)

siRNAの設計、及び合成

実施例2と同様の方法によって調製した。なお、本実施例では実験動物としてラットを使用するが、ラットCD9遺伝子のヒトCD9遺伝子の配列番号3及び4に対応する領域の塩基配列は、ヒトCD9遺伝子と完全に一致することから配列番号3及び4で示される塩基配列からなるsiRNAのセンス鎖及びアンチセンス鎖は、ラットCD9 mRNAも標的とすることができる。

血管新生モデルラットの作製

本発明のsiRNAによるインビトロ実験でみられた血管内皮細胞に対する遊走・浸潤能の抑制効果が、「インビボ」において血管新生抑制効果となることを実証するために、まず生体眼球内の角膜で血管新生の抑制効果を検証する角膜マイクロポケットアンジオジェネシスアッセイ法を行った。本アッセイ法は、無血管組織である角膜を用いることで背景血管の影響がないこと、眼球表面の観察による評価のため生存状態下での血管新生領域の定量が可能であること、さらに、同一研究者による処置においてその誤差が少ないことから、インビボでの血管新生に対する新規物質の作用・効果を明確に評価できる優れた実験系として血管新生の実験に広く用いられている (Rogers et al., 2007, Nature Protocol, Vol 2, No. 10)。また、siRNAを用いた実験でも、PBSを溶媒とするsiRNAの結膜下への注入によってその効果を立証するのに用いられている (Bumsiek et al.: American Journal of Pathology, Vol. 165, No. 6, 2004)。

血管新生誘導因子のVEGFあるいはHGFのいずれかを含有するペレットをラットの角膜に埋め込んだ血管新生モデルラットを作製した。ペレットは、50 μg のHGF又はVEGF (160 ngのペレット用)と10 mgのスクラルファート (Sigma-Aldrich社)を60 mgのヒドロロンポリマー (120 mg/1 mlエタノール; Sigma-Aldrich社)と混合し、次に当該混合物を $15 \times 15 \text{ mm}^2$ のメッシュ (Tanaka Sanjiro Co., Fukuoka, Japan)に塗り込んだ後、 $1.0 \times 1.0 \times 0.2 \text{ mm}^3$ に裁断して調製した。Brown-Norwayラット (オス、8週齢)において、角膜ポケットを右眼の角膜の結膜輪部から1.5 mmの部分に作製した。この角膜ポケットに前記ペレットを挿入した。

血管新生モデルラットのsiRNA処理

対照としてランダム-siRNA注入群と、siRNAを含まないPBSのみを注入した群を調製した。実験は、各サンプルについて、それぞれラット9~12匹に対して行った

10

20

30

40

50

。ペレット挿入7日後に、以下の式を用いて、結膜における血管面積を算出し、血管新生を評価した。

$$\text{血管面積 (mm}^2\text{)} = 0.02 \times \text{血管長}^* \text{ (mm)} \times \text{クロックアワー}^{**}$$

* 血管長 = 角膜輪部から最長の血管の長さ

** クロックアワーとは、血管新生部分の分布角度を時間単位で表した数値であり、クロックアワー = 30°を grade 1 とする。

血管面積を算出後、平均値の精度を増すために John Tukey の Trim mean 法によって 20% (上下それぞれ 10%) を削除し平均値及び標準誤差を求めた。

(結果)

結果を図5及び6に示す。CD9-siRNA処理したラットでは、siRNA未処理のラットと比較して、HGF又はVEGFによって亢進される結膜上の血管新生が有意に抑制された。一方、ランダム-siRNA処理のラットの血管新生に抑制は認められず、siRNA未処理のラットと有意差は認められなかった。この結果から、インビボにおいても本発明の血管新生抑制剤でCD9を抑制することにより血管新生を抑制でき、さらにそれがsiRNA自体による効果ではなく、CD9抑制によるものであることが立証された。

さらに、CD9-siRNAがVEGF誘導の血管新生だけでなくHGF誘導の血管新生をも同様に阻害できたという結果は、既存技術と比べてCD9-siRNAが医薬として極めて優位で有望であることを立証している。前述のように、既存の技術で最も有望視されているVEGF抗体医薬は、VEGFが関与する血管新生に対してのみ有効であり、HGFなどの他の血管新生促進因子の作用を阻害することは不可能であるため、その薬剤としての治療効果と有用性は限定されているものである。よって、VEGFだけでなくHGFなどの他の血管新生促進因子による血管新生を「一般化して」阻害するCD9-siRNAは、医薬の効能と適応の広さという有用性において既存技術を凌ぐものである。

【実施例6】

【0012】

マウスを用いたCD9ノックダウン治療法による治療効果の検証(2)：血管新生疾病モデルにおける網膜での治療効果の検証

(方法)

siRNAの設計、及び合成

実施例2と同様の方法によって調製した。

血管新生モデルマウスの作製

実施例5で実証した本発明の血管新生抑制剤のインビボ血管新生抑制効果、特に治療効果をさらに実証するために、眼における血管新生疾患の主たる血管新生部位が網膜である点を鑑み、新たな実験系として網膜光凝固(photoocoagulation)法による「網膜血管新生疾患モデル動物」を用いた、さらなる治療実験を行った。本方法は、網膜の一部に強いレーザー光を照射することによって脈絡膜から網膜への血管新生を誘発することができる。具体的に説明をすると、眼底は、眼底内部表面から大きく分けて網膜、網膜色素上皮、ブルッフ膜及び脈絡膜で構成されている。レーザー光は、過剰な照射によって網膜及びブルッフ膜を貫通して、脈絡膜まで達する。レーザー光によって傷害された脈絡膜では脈絡膜新生血管(CNV: choroidal neovascularization)が生じる。したがって、網膜光凝固法は、網膜における血管新生のモデル術、特に血管新生を病態とする眼疾患に対する血管新生抑制剤の新規候補物質の治療効果の検証のための最適な動物モデルとされている(Shen J et al. Gene Ther. 13; 225-234; 2006;)。

C57BL6マウス(オス、8~11週齢)の網膜に、レーザー(Novus varia; Lumenis社製)を用いて120mW、75µm、0.1秒で眼球1つあたり4~5スポットで網膜光凝固を施行した。凝固処理約1時間後にsiRNA(本発明のCD9-siRNA又は対照としてのランダムsiRNA)又は対照としてのsiRNAを含まないPBSバッファのみ(siRNA未処理)をそれぞれ硝子体腔内に3µl = 60

p m o l / e y e で注射した。当該処理日を施術 1 日目とした。なお、本実施例で使用した C D 9 - s i R N A は、マウス C D 9 - s i R N A である。この s i R N A の設計、及び合成については、実施例 2 に記載の方法に準じた。ただし、ヒト C D 9 遺伝子の配列番号 3 及び 4 に対応するマウス C D 9 遺伝子領域の塩基配列には 1 塩基の相違が存在するため、マウス C D 9 - s i R N A の合成には配列番号 1 1 及び 1 2 で示される塩基配列をそれぞれセンス鎖及びアンチセンス鎖として用いた。

続いて、施術 7 日目に、上記と同様の条件で硝子体腔内に 2 回目の s i R N A 又は P B S バッファを注射した。

施術 1 4 日後、マウスを開腹し、血管造影剤として 0 . 3 m l の 5 0 m g / m l フルオレスセインを拍動中の心臓の心尖部に注入した。フルオレスセインを血流で全身に行き渡らせた後、眼球を摘出した。摘出した眼球をホルマリンで固定し、3 時間後に花弁状に切り開いて、角膜、水晶体を除去し、スライドグラスにマウントした。一番上の表面に当たる部分は、蛍光を遮断する網膜色素上皮であるため、脈絡膜のほとんどの血管は観察できないが、レーザーを照射した部分には穴が空いているため、その下にある脈絡膜を観察することができる。このように、レーザー照射したスポットにおける C N V 部を観察し、画像撮影後、I m a g e J を用いて C N V 部の面積を算出した。各サンプルにおける C N V 部の平均面積を前記実施例 5 と同様の方法で算出し、スチューデント t 検定により統計処理を行った。

(結果)

図 7 は、各サンプルにおいてレーザー照射した一のスポンツ周辺部の蛍光画像を、また図 8 は、各サンプルにおける C N V 部の面積の統計結果を示す。なお、図 7 における各画像は等倍率である。

図 7 におけるフルオレスセインによる蛍光は、脈絡膜における血管を表す。正常状態の脈絡膜では、通常、淡い蛍光を呈する網目状の血管が観察される (例えば、C D 9 - s i R N A の白破線円外) 。これに対して、網膜光凝固法で強レーザー光を照射された網膜下の脈絡膜では、照射スポットを中心として円状の強い蛍光領域 (例えば、C D 9 - s i R N A の白破線円内) が観察された。これは、強レーザー光の照射により脈絡膜に複数の血管が新たに誘発され、それらが絡み合ったものであり、円面積が大きいほど網膜光凝固法により血管新生が広範囲にわたって誘発されたことを示す。ランダム s i R N A 処理及び s i R N A 未処理のサンプルでは、比較的広範囲にわたる血管新生が観察された。一方、C D 9 - s i R N A 処理したサンプルでは、レーザー光照射部に強い蛍光を呈する円状領域は観察されたものの、その面積は他の二つのサンプルと比較すると有意に小さいことが明らかとなった (図 8) 。これは、すなわち、網膜光凝固法による脈絡膜血管新生を C D 9 - s i R N A が抑制したことを示している。したがって、本発明の C D 9 - s i R N A は、角膜のみならず脈絡膜 / 網膜における血管新生も広く抑制し得ることが証明された。

(結論)

上記実施例 5 及び 6 で示した 2 つの異なる動物モデル実験系による結果から、本発明の血管新生抑制剤である C D 9 s i R N A の血管新生抑制効果、及びそれに基づく治療効果が明確に実証された。

すなわち、V E G F や H G F という既に特定された 2 つの強力な血管新生誘導因子を用いてインビボ効果が明確に検出できる角膜モデルで実験することにより、C D 9 s i R N A の作用と効果が科学的に明確かつ正確に実証された。また、複数の血管新生因子が関与する点及び網膜での血管新生である点において、実際の血管新生による眼疾患により近い、網膜光凝固法による網膜血管新生疾患モデルにより本発明の治療効果を実証した。これによって、本発明の血管新生抑制剤の血管新生抑制効果が再確認され、加えて、その治療剤としての具体的な有効性も実証された。

さらに、異なる病変部位 (角膜と脈絡膜 / 網膜) 、及び異なる血管新生の誘導作用 (V E G F 及び H G F のような特定された 2 種類の異なる血管新生増殖因子だけでなく、光凝固法という複数の血管新生因子が関与するモデル) で有意な血管新生抑制効果と治療効果を実証できたことにより、その「血管新生抑制効果」や「血管新生抑制剤としての有用性

10

20

30

40

50

」に対する本発明の血管新生抑制剤の普遍性も実証された。

【産業上の利用可能性】

【0013】

本発明によれば、膜タンパク質CD9の抑制剤で構成される新規血管新生抑制剤又は当該血管新生抑制剤を含有する血管新生抑制組成物を提供することができる。

本発明の血管新生抑制剤及び血管新生抑制組成物によれば、糖尿病網膜症又は加齢黄斑変性等の血管新生を病因とする血管新生疾患又は癌の治療あるいはその症状を軽減することができる。

本発明の血管新生抑制剤及び血管新生抑制組成物の主要な標的分子であるCD9は、ノックアウトマウスの研究からその発現又は機能を抑制しても生体内において顕著な異常は認められない。それ故、本発明の血管新生抑制剤及び血管新生抑制組成物は、ベバシズマブとは異なり、長期間抑制しても副作用がほとんど問題にならないか又は生じないことが予想される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kagoshima University

<120> Inhibitory agent of the angiogenesis

<130> PH-4320-PCT

<150> JP 2009-105170

10

<151> 2009-04-23

<160> 12

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 228

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Val Lys Gly Gly Thr Lys Cys Ile Lys Tyr Leu Leu Phe Gly
1 5 10 15

Phe Asn Phe Ile Phe Trp Leu Ala Gly Ile Ala Val Leu Ala Ile Gly
 20 25 30

30

Leu Trp Leu Arg Phe Asp Ser Gln Thr Lys Ser Ile Phe Glu Gln Glu
 35 40 45

Thr Asn Asn Asn Asn Ser Ser Phe Tyr Thr Gly Val Tyr Ile Leu Ile
 50 55 60

40

Gly Ala Gly Ala Leu Met Met Leu Val Gly Phe Leu Gly Cys Cys Gly
65 70 75 80

Ala Val Gln Glu Ser Gln Cys Met Leu Gly Leu Phe Phe Gly Phe Leu
 85 90 95

Leu Val Ile Phe Ala Ile Glu Ile Ala Ala Ala Ile Trp Gly Tyr Ser
 100 105 110

His Lys Asp Glu Val Ile Lys Glu Val Gln Glu Phe Tyr Lys Asp Thr
 115 120 125

10

Tyr Asn Lys Leu Lys Thr Lys Asp Glu Pro Gln Arg Glu Thr Leu Lys
 130 135 140

Ala Ile His Tyr Ala Leu Asn Cys Cys Gly Leu Ala Gly Gly Val Glu
 145 150 155 160

20

Gln Phe Ile Ser Asp Ile Cys Pro Lys Lys Asp Val Leu Glu Thr Phe
 165 170 175

Thr Val Lys Ser Cys Pro Asp Ala Ile Lys Glu Val Phe Asp Asn Lys
 180 185 190

30

Phe His Ile Ile Gly Ala Val Gly Ile Gly Ile Ala Val Val Met Ile
 195 200 205

Phe Gly Met Ile Phe Ser Met Ile Leu Cys Cys Ala Ile Arg Arg Asn
 210 215 220

40

Arg Glu Met Val
 225

<210> 2

<211> 687

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgccggtca aaggaggcac caagtgcate aaatacctgc tgttcggatt taacttcate 60

ttctggcttg ccgggattgc tgtccttgcc attggactat ggctccgatt cgactctcag 120

accaagagca tcttcgagca agaaaactaat aataataatt ccagcttcta cacaggagtc 180 10

tatattctga tcggagccgg cgccctcatg atgotgggtgg gcttcctggg ctgctgcggg 240

gctgtgcagg agtcccagtg catgotggga ctgttcttcg gcttcctctt ggtgatattc 300

gccattgaaa tagctgoggc catctgggga tattcccaca aggatgaggt gattaaggaa 360

gtccaggagt tttacaagga cacctacaac aagctgaaaa ccaaggatga gccccagcgg 420 20

gaaacgctga aagccatcca ctatgcgttg aactgctgtg gtttggctgg gggcgtggaa 480

cagtttatct cagacatctg cccaagaag gacgtactcg aaaccttcac cgtgaagtcc 540

tgtcctgatg ccacaaaga ggtcttcgac aataaattcc acatcatcgg cgcagtgggc 600

atcggcattg ccgtggatcat gatatttggc atgatcttca gtatgatctt gtgctgtgct 660

atccgcagga accgcgagat ggtctag 687 30

<210> 3

<211> 21

<212> RNA/DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic RNA/DNA 40

<400> 3

gagcaucuuc gagcaagaat t 21

<210> 4

<211> 21
 <212> RNA/DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic RNA/DNA

<400> 4
 uucuugcucg aagaugcuct t 21 10

<210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA 20

<400> 5
 gagcatcttc gagcaagaa 21

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA 30
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic DNA

<400> 6
 ttcttgctcg aagatgctc 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> RNA/DNA 40
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic RNA/DNA

<400> 7			
cuggacuucc agaagaacat t		21	
<210> 8			
<211> 21			
<212> RNA/DNA			
<213> Artificial			10
<220>			
<223> synthetic RNA/DNA			
<400> 8			
uguucuucug gaaguccagt t		21	
<210> 9			20
<211> 21			
<212> RNA/DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> synthetic RNA/DNA			
<400> 9			
ucuuaaucgc guauaaggct t		21	30
<210> 10			
<211> 21			
<212> RNA/DNA			
<213> Artificial			
<220>			
<223> synthetic RNA/DNA			40
<400> 10			
gccuuauacg cgauuaagat t		21	
<210> 11			

<211> 21
 <212> RNA/DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic RNA/DNA

<400> 11
 gagcaucuuc gagcaagagt t

21

10

<210> 12
 <211> 21
 <212> RNA/DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> synthetic RNA/DNA

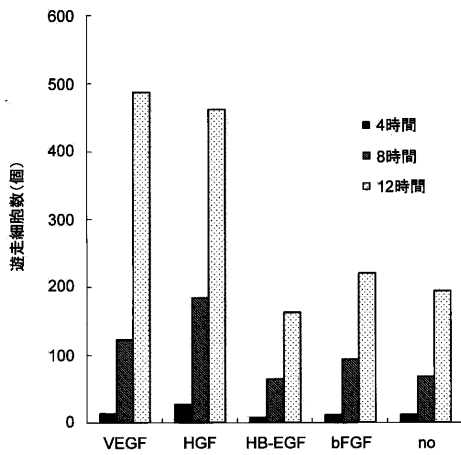
<400> 12
 cucuugcucg aagaugcuct t

21

20

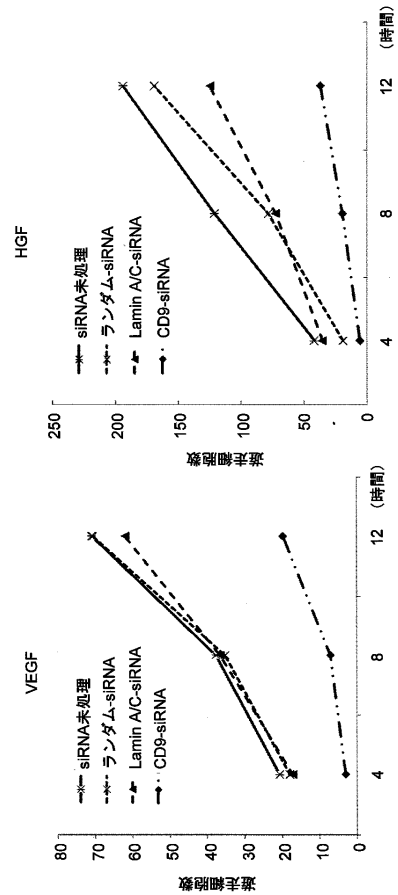
【 図 1 】

図 1

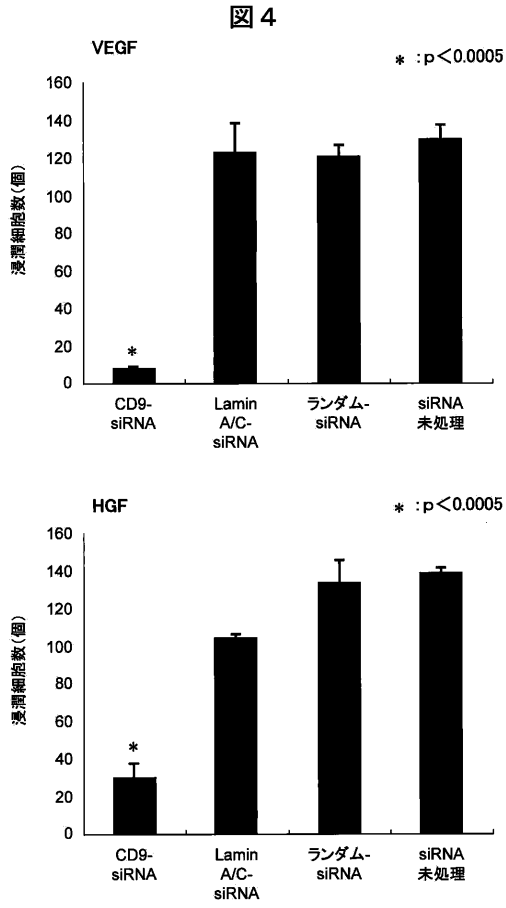


【 図 3 】

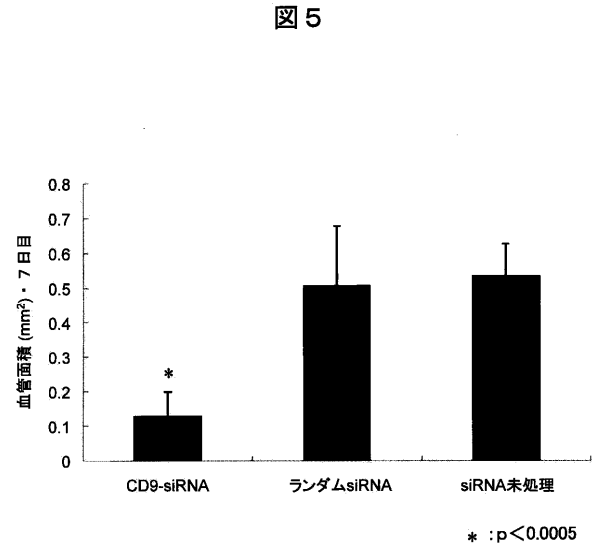
図 3



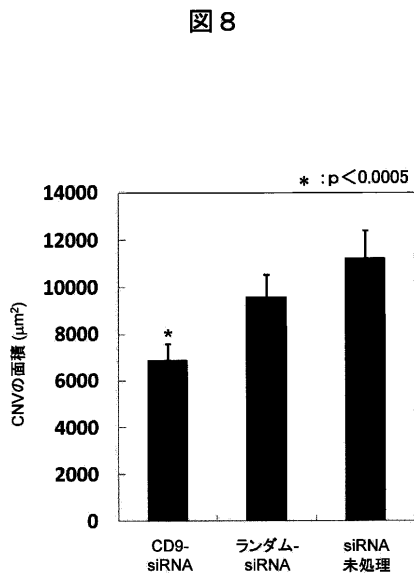
【 図 4 】



【 図 5 】

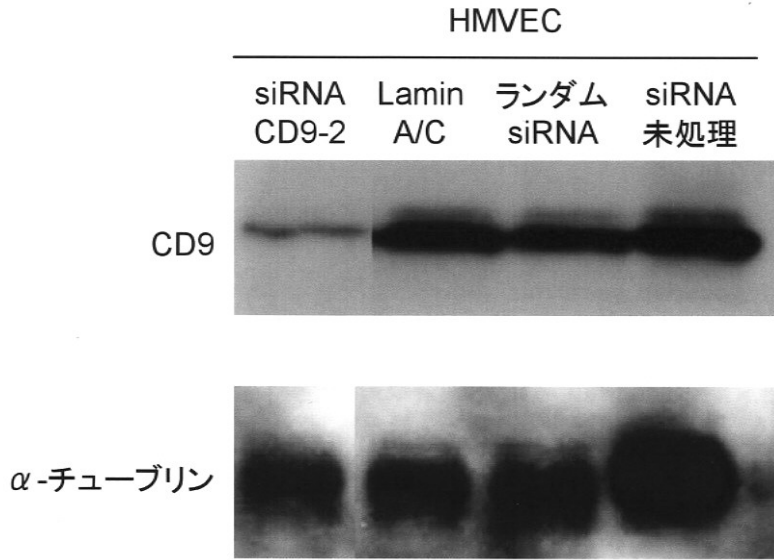


【 図 8 】



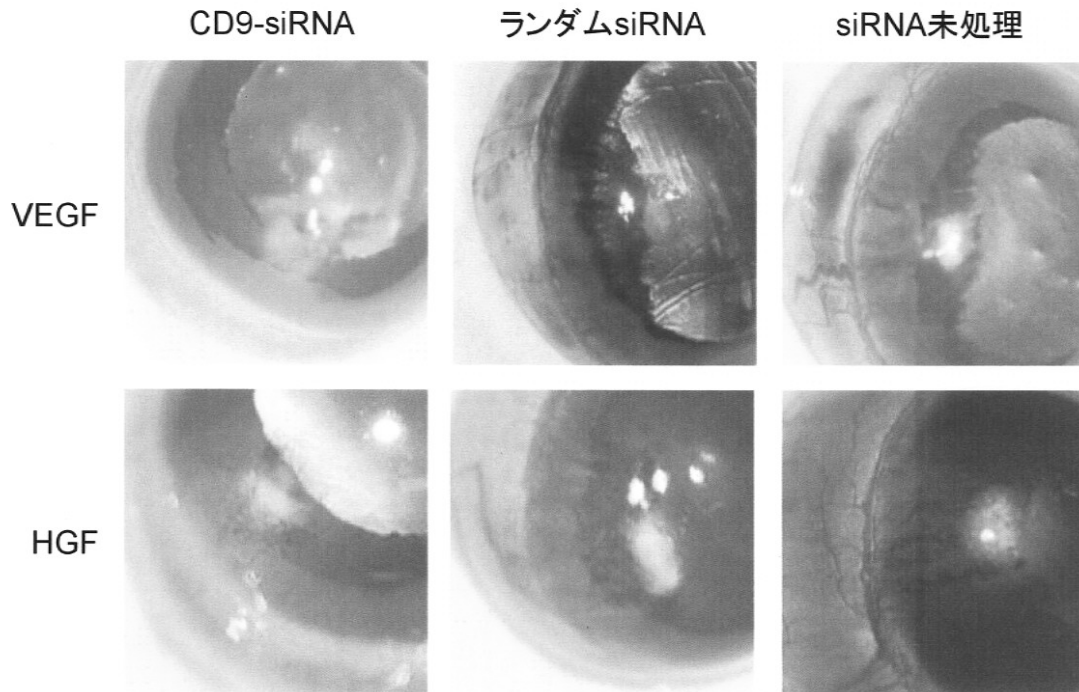
【 図 2 】

図 2



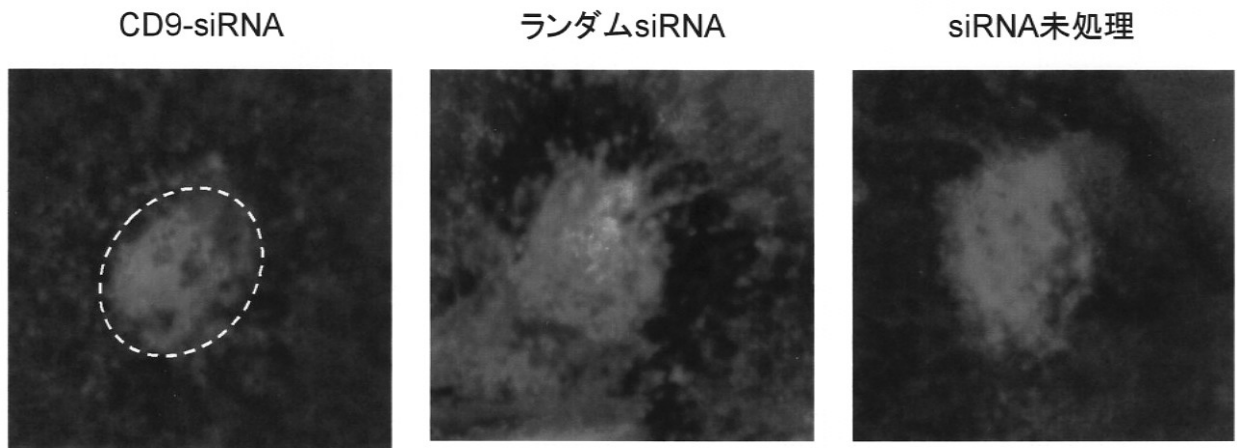
【 図 6 】

図 6



【図7】

図7



- 【手続補正書】
- 【提出日】平成23年2月9日(2011.2.9)
- 【手続補正1】
- 【補正対象書類名】特許請求の範囲
- 【補正対象項目名】全文
- 【補正方法】変更
- 【補正の内容】
- 【特許請求の範囲】
- 【請求項1】
- (削除)
- 【請求項2】
- (削除)
- 【請求項3】
- (削除)
- 【請求項4】
- (削除)
- 【請求項5】
- (削除)
- 【請求項6】
- (削除)
- 【請求項7】
- (削除)
- 【請求項8】
- (削除)

【請求項 9】

(削除)

【請求項 10】

(削除)

【請求項 11】

(削除)

【請求項 12】

(削除)

【請求項 13】

(削除)

【請求項 14】

膜タンパク質CD9をコードする遺伝子の転写産物を標的とするCD9発現抑制剤を含む、血管新生を病因とする眼疾患を治療するための血管新生抑制剤。

【請求項 15】

前記CD9発現抑制剤が血管内皮細胞において作用する、請求項14に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 16】

前記眼疾患が糖尿病網膜症又は加齢黄斑変性である、請求項14又は15に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 17】

前記CD9発現抑制剤がCD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸又はCD9-U1アダプターである、請求項14～16のいずれか一項に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 18】

前記CD9発現抑制剤がCD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸又はCD9-U1アダプターをコードする核酸を発現可能なように連結した発現ベクターである、請求項14～16のいずれか一項に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 19】

前記CD9のRNA干渉剤が、CD9-siRNA又はCD9-shRNAである、請求項17又は18に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 20】

前記CD9-siRNAが配列番号3及び4で示される塩基配列から構成される、請求項19に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 21】

前記CD9-shRNAが配列中のチミン塩基をウラシル塩基に置き換えた配列番号5及び6で示される塩基配列を含む、請求項19に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 22】

前記発現ベクターが配列番号5及び/又は6で示される塩基配列を含む、請求項18に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 23】

膜タンパク質CD9をコードする遺伝子の転写産物を標的とするCD9発現抑制剤を含む、癌治療用の血管新生抑制剤。

【請求項 24】

前記CD9発現抑制剤が血管内皮細胞において作用する、請求項23に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 25】

前記CD9発現抑制剤がCD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸又はCD9-U1アダプターである、請求項23又は24に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 26】

前記CD9発現抑制剤がCD9のRNA干渉剤、CD9アンチセンス核酸又はCD9-U1アダプターをコードする核酸を発現可能なように連結した発現ベクターである、請求

項 23 ~ 25 のいずれか一項に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 27】

前記 CD9 の RNA 干渉剤が、CD9 - siRNA 又は CD9 - shRNA である、請求項 25 又は 26 に記載の血管新生抑制剤。

【請求項 28】

請求項 14 ~ 27 に記載の少なくとも一以上の血管新生抑制剤及び製薬上許容可能な担体を含む血管新生抑制組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/057735
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P27/02 (2006.01)i, A61P35/00(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) A61K45/00, A61K31/7105, A61K31/713, A61K39/395, A61K48/00, A61P9/00, A61P27/02, A61P35/00 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 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/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.
P, X	Taro KAMISASANUKI et al., "Maku Tanpaku CD9 Hyoteki RNAi wa General ni Sayo suru Aratana Kekkan Shinsei Sogaizai to naru", Journal of Japanese Ophthalmological Society, 15 March 2010 (15.03.2010), vol.114 special extra issue, page 310, P-137, entire text	1-13
P, X	Ken'ichiro KOSAI, "CD9 wa Kekkan Shinsei ni Hissu no Maku Tanpaku dearu; Atarashii Kekkan Shinsei Yokuseizai toshite no siRNA CD9", Dai 68 Kai Annual Meeting of the Japan Cancer Association, 31 August 2009 (31.08.2009), page 217, O-327, entire text	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 10 June, 2010 (10.06.10)		Date of mailing of the international search report 22 June, 2010 (22.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.
Facsimile No.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057735

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Nakamoto T, et al, A novel therapeutic strategy with anti-CD9 antibody in gastric cancers., <i>J Gastroenterol.</i> , 2009.05.26, Vol.44, No.9, p.889-96, Abstract	1-13
X Y	Klein-Soyer C, et al, CD9 participates in endothelial cell migration during in vitro wound repair., <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i> , 2000, Vol.20, No.2, p.360-9, Abstract	1-6, 9, 10, 13 7, 8, 11, 12
X Y	WO 2004/007685 A2 (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION), 22 January 2004 (22.01.2004), claims & US 2004/0136985 A1 & WO 2004/007685 A2	1-6, 9, 10, 13 7, 8, 11, 12
Y	Barreiro O, et al, Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation., <i>Blood</i> , 2005, Vol.105, No.7, p.2852-61, page 2853, right column, second paragraph	7, 8, 11, 12
Y	WO 2005/034953 A1 (Kowa Co., Ltd.), 21 April 2005 (21.04.2005), claim 11 & US 2007/0043078 A1 & EP 1674100 A1	11, 12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/057735									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/7105(2006.01)i, A61K31/713(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K48/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P27/02(2006.01)i, A61P35/00(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. A61K45/00, A61K31/7105, A61K31/713, A61K39/395, A61K48/00, A61P9/00, A61P27/02, A61P35/00											
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 <table border="0" style="width: 100%;"> <tr><td>日本国実用新案公報</td><td>1922-1996年</td></tr> <tr><td>日本国公開実用新案公報</td><td>1971-2010年</td></tr> <tr><td>日本国実用新案登録公報</td><td>1996-2010年</td></tr> <tr><td>日本国登録実用新案公報</td><td>1994-2010年</td></tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2010年										
日本国実用新案登録公報	1996-2010年										
日本国登録実用新案公報	1994-2010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) CA/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									
P, X	上笹貴太郎ら, 膜蛋白 CD9 標的 RNAi は General に作用する新たな血管新生阻害剤となる, 日本眼科学会雑誌, 2010.03.15, Vol.114 臨時増刊号, 第310頁, P-137, 全文	1-13									
P, X	小賤健一郎, CD9 は血管新生に必須の膜蛋白である; 新しい血管新生抑制剤としての siRNA CD9, 第68回日本癌学会学術総会予稿集, 2009.08.31, 第217頁, 0-327, 全文	1-13									
☑ 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。									
* 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		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									
国際調査を完了した日 10.06.2010		国際調査報告の発送日 22.06.2010									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 菊池 美香	4C 3954								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452									

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2010/057735

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
P, X	Nakamoto T, et al, A novel therapeutic strategy with anti-CD9 antibody in gastric cancers., J Gastroenterol., 2009.05.26, Vol.44, No.9, p.889-96, Abstract	1-13
X Y	Klein-Soyer C, et al, CD9 participates in endothelial cell migration during in vitro wound repair., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, Vol.20, No.2, p.360-9, Abstract	1-6, 9, 10, 13 7, 8, 11, 12
X Y	WO 2004/007685 A2 (THE UNIVERSITY OF TENNESSEE RESEARCH FOUNDATION) 2004.01.22, 請求の範囲 & US 2004/0136985 A1 & WO 2004/007685 A2	1-6, 9, 10, 13 7, 8, 11, 12
Y	Barreiro O, et al, Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation., Blood, 2005, Vol.105, No.7, p.2852-61, 第2853頁右欄第2段落	7, 8, 11, 12
Y	WO 2005/034953 A1 (興和株式会社) 2005.04.21, 請求項1 & US 2007/0043078 A1 & EP 1674100 A1	11, 12

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

(72) 発明者 上笹貴 太郎

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人鹿児島大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 CA11 GA11 HA17

4C084 AA13 AA17 NA14 ZA331 ZA441 ZB261 ZB271

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA33 ZA44 ZB26 ZB27

4C087 AA01 AA02 CA12 NA14 ZA33 ZA44 ZB26 ZB27

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。