明　細　書

発明の名称 ：

血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤及びＶＥＧＦ産生抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤及びＶＥＧＦ産生抑制剤に関する。

背景技術

[0002] 新しい血管が作られる血管新生は、体に備わっている生理的機能である。制御機構の下で必要に応じた血管新生は、創傷治癒等に寄与する。しかし、制御機構に問題が生じる等により必要とされない血管新生が様々な疾患又は病態の要因となることが知られている。そのような疾患又は病態としては、関節疾患、肩こり、癌、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎等が知られている。これらのうち、例えば、変形性膝関節症は進行性かつ難治性の関節の変性疾患であり、極めて罹患率の高い疾病であるにもかかわらず、根治療法は無い。社会の高齢化により変形性膝関節症患者の増加が懸念されていることから、根治療法の開発が急務とされる。

[0003] 上記のように、血管新生を伴う疾患又は病態は様々なものがあり、それらを予防又は治療する方法の開発が熱望されている。ここで、血管内皮細胞増殖因子（ＶＥＧＦ；ｖａｓｃｕｌａｒ　ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ）は血管新生において中心的な役割を担うことが知られており、ＶＥＧＦを標的とした薬剤の開発が各地で進められている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：再表２０１９／１７６９０１

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｒｅｐｏｒｔｓ ７： ３５８４（２０１７）；ｍｉＲ－２９ａ

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 一実施形態においては、本発明は、血管新生を伴う疾患又は病態の新規な予防または治療剤及びＶＥＧＦ産生抑制剤を提供することを課題とする。また、別の一実施形態においては、本発明は、新規なＶＥＧＦ産生抑制剤を提供することを主目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、多種多様なｍｉＲＮＡについて滑膜肉腫細胞におけるＶＥＧＦ産生抑制効果を調査した結果、５種類のｍｉＲＮＡのみにおいて抑制効果が見られた。本発明者らはさらにそれら５種類のｍｉＲＮＡの組み合わせについて検討した結果、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの組み合わせのみ、相乗効果が見られた。本発明はかかる新規の知見に基づくものである。

[0008] したがって、本発明は、以下の項を提供する：

項１．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤。

[0009] 項２．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤。

[0010] 項３．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤。

[0011] 項４．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ＶＥＧＦ産生抑制剤。

[0012] 項５．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤。

[0013] 項６．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤。

[0014] 項７．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患、肩こり、癌、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎からなる群より選択される少なくとも一種である、項１～３のいずれか一項に記載の剤。

[0015] 項８．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患である、項７に記載の剤。

[0016] 項９．関節疾患が変形性膝関節症である、項８に記載の剤。

[0017] 項１０．注射剤である、項１～９のいずれか一項に記載の剤。

[0018] 項１１．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療における使用のための医薬組成物。

[0019] 項１２．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療における使用のための医薬組成物。

[0020] 項１３．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療における使用のための医薬組成物。

[0021] 項１４．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ＶＥＧＦ産生抑制のための医薬組成物。

[0022] 項１５．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための医薬組成物。

[0023] 項１６．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための医薬組成物。

[0024] 項１７．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患、肩こり、癌、慢性関節

リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎からなる群より選択される少なくとも一種である、項１１～１３のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[0025] 項１８．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患である、項１７に記載の医薬組成物。

[0026] 項１９．関節疾患が変形性膝関節症である、項１８に記載の医薬組成物。

[0027] 項２０．注射剤である、項１１～１９のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[0028] 項２１．血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療における使用のためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ。

[0029] 項２２．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療における使用のためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ。

[0030] 項２３．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療における使用のためのｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ。

[0031] 項２４．ＶＥＧＦ産生抑制のためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ。

[0032] 項２５．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ。

[0033] 項２６．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ。

[0034] 項２７．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患、肩こり、癌、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎からなる群

より選択される少なくとも一種である、項２１～２３のいずれか一項に記載の化合物。

[0035] 項２８．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患である、項２７に記載の化合物。

[0036] 項２９．関節疾患が変形性膝関節症である、項２８に記載の化合物。

[0037] 項３０．注射により投与される、項２１～２９のいずれか一項に記載の化合物。

[0038] 項３１．血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤を製造するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの使用。

[0039] 項３２．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤を製造するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの使用。

[0040] 項３３．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤を製造するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの使用。

[0041] 項３４．ＶＥＧＦ産生抑制剤を製造するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの使用。

[0042] 項３５．ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤を製造するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの使用。

[0043] 項３６．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤を製造するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの使用。

[0044] 項３７．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患、肩こり、癌、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎からなる群より選択される少なくとも一種である、項３１～３３のいずれか一項に記載の使用。

[0045] 項３８．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患である、項３７に記載の使用。

[0046] 項３９．関節疾患が変形性膝関節症である、項３８に記載の使用。

[0047] 項４０．前記剤が注射剤である、項３１～３９のいずれか一項に記載の使用。

[0048] 項４１．それを必要とする対象にｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの有効量を投与することを含む、血管新生を伴う疾患又は病態を予防又は治療する方法。

[0049] 項４２．それを必要とする対象にｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの有効量を投与することを含む、ＶＥＧＦ産生を抑制する方法。

[0050] 項４３．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患、肩こり、癌、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎からなる群より選択される少なくとも一種である、項４１に記載の方法。

[0051] 項４４．血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患である、項４３に記載の方法。

[0052] 項４５．関節疾患が変形性膝関節症である、項４４に記載の方法。

[0053] 項４６．ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐが注射により投与される、項４１～４５のいずれか一項に記載の方法。

発明の効果

[0054] 一実施形態においては、本発明によれば、血管新生を伴う疾患又は病態の新規な予防または治療剤及びＶＥＧＦ産生抑制剤を提供することができる。また、別の一実施形態においては、本発明は、新規なＶＥＧＦ産生抑制剤を提供することができる。

[0055] これに対し、特許文献１にはｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとは塩基配列の異なるｍｉＲ－２１の阻害薬またはＴ

ＬＲ７、８および９拮抗薬を有効成分とする、変形性関節症による抗炎症効果が開示されているが、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐについて記載がない。また、特許文献１には、その段落［００８８］に、ｍｉＲ－１４０が、変形性関節症における痛みに関与するかは不明であると記載されている。また、特許文献１には変形性膝関節症に対する治療効果は開示されていない。非特許文献１には、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとは塩基配列の異なるｍｉＲ－２９ａによって滑膜の過剰血管新生、線維化阻害による関節障害保護作用（抗炎症効果）が示唆されているが、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐについては開示されていない。また、非特許文献１にも変形性膝関節症の治療効果は開示されていない。従って、本発明のかかる効果は先行技術から予想しえないものである。

図面の簡単な説明

[0056] [図1]実施例２における、ヒト滑膜肉腫由来細胞株を用いた、細胞あたりのＶＥＧＦ産生量の測定結果を示す。ＭＯＣは溶媒のみ処理群を示す。

[図2]実施例２におけるｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ，ｈｓａ－ｍｉＲ－１０７、ｈｓａ－ｍｉＲ－１００－５ｐを単独または組み合わせて用いた場合のＶＥＧＦ産生量の測定結果を示す。

[図3]実施例３における、ヒト滑膜由来細胞を用いた、細胞あたりのＶＥＧＦ産生量の測定結果を示す。

[図4]実施例４（３）での膝前十字靭帯切断（ＡＣＬＴ）モデルラットにおける滑膜組織、関節液中のＶＥＧＦ量の測定結果を示す。

[図5]実施例４（４）でのＡＣＬＴモデルラットにおける疼痛試験の結果を示す。

[図6]実施例４（５）でのＡＣＬＴモデルラットにおける滑膜炎スコアを示す。

[図7]実施例５における、ヒト軟骨細胞株を用いた、ＶＥＧＦ産生量の測定結果を示す。

[図8]実施例６における、軟骨肉腫細胞株を用いた、ＶＥＧＦ産生量の測定結果を示す。

発明を実施するための形態

[0057] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態を示したものであり、本発明の範囲がこれらの実施形態のみに限定されることはない。

[0058] １．血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤

一実施形態において、本発明は、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤を提供する。本実施形態は、有効成分としてｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む剤であって、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用のために用いるものに関する。

本発明において「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ」には、配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ及び／又はそのホモログを示す：

配列番号１．ＣＡＧＵＧＧＵＵＵＵＡＣＣＣＵＡＵＧＧＵＡＧ

また、本発明において「ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ」とは、配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ及び／又はそのホモログである：

配列番号２．ＵＣＧＵＡＣＣＧＵＧＡＧＵＡＡＵＡＡＵＧＣＧ

なお、本明細書内に記載の塩基配列は、他に言及されない限り、左端が５’端であり、右端が３’端である。

[0059] 「配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ」には、細胞導入効率向上、安定性向上等の観点から、修飾されたｍｉＲＮＡも包含され得る。例えば、「配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ」には、当該ｍｉＲＮＡを構成するヌクレオチドの少なくとも一部が、メトキシ基、メチル基、アミノ基、チオキソ基（＝Ｓ）、ハロゲン等で置換されているもの、当該ｍｉＲＮＡを構成するヌクレオチドの少なくとも一部が有する水酸基（－ＯＨ）が水素（－Ｈ）に置換されているもの、これらの組み合わせ等が挙げられる。「配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ」には、こ

れらの修飾がされていないものも包含され得る。「配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡのホモログ」、「配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ」及び「配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡのホモログ」にも同様に、上記修飾がされているもの、及び上記修飾がされていないものが包含され得る。

[0060] 本発明の一実施形態において、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ」には、そうでないことが明記されていない場合、配列番号１で示される塩基配列に対し、１個又は数個（例えば、１～３個、１～２個、１個等）の塩基が置換、付加及び／又は欠失したものも包含され得る。

「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ」としては、例えば、配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡに代えて当該「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ」を用いる以外実施例２と同様にして滑膜肉腫細胞におけるＶＥＧＦ産生抑制効果を測定した場合、配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡと組み合わせることによる相乗効果（配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ及び配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡそれぞれ単独使用した場合と比較して有意に高いＶＥＧＦ産生抑制効果を示す）が認められるものが好ましい。

[0061] 本発明の一実施形態において、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ」には、そうでないことが明記されていない場合、配列番号２で示される塩基配列に対し、１個又は数個（例えば、１～３個、１～２個、１個等）の塩基が置換、付加及び／又は欠失したものも包含され得る。

「ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ」としては、例えば、配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡに代えて当該「ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ」を用いる以外実施例２と同様にして滑膜肉腫細胞におけるＶＥＧＦ産生抑制効果を測定した場合、配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡと組み合わせることによる相乗効果（配列番号１で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡ及び配列番号２で示される塩基配列からなるｍｉＲＮＡそれぞれ単独使用した場合と比較して有意に高いＶＥＧＦ産生抑制効果を示す）

が認められるものが好ましい。

[0062] 本発明において、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの使用割合は限定されないが、例えば、前者１モルに対し、後者を０．０１～１００モルが好ましく、０．１～１０モルがより好ましく、０．２～１０モルがさらに好ましい。

[0063] 本発明において、血管新生を伴う疾患又は病態としては、例えば、関節疾患、肩こり、癌（軟骨肉腫、結腸、直腸癌、非小細胞肺癌、腎細胞癌、肝細胞癌、乳がん、膵がん、胃がん、卵巣癌、子宮頸がん、悪性神経膠腫等）、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎（上腕骨外上顆炎、アキレス腱炎等）、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎等が挙げられ、好ましくは関節疾患等が挙げられる。本明細書において「関節疾患」とは、関節において、例えば変形、損傷、及び炎症などの異常が生じた疾患をいう。当該関節は、骨と骨とを連接させる可動性の結合部であり、具体的には軟骨、滑膜、半月板、及び靭帯などを含む。関節疾患としては、例えば、膝関節、股関節、指の関節等の疾患が挙げられる。膝関節の疾患としては、例えば、変形性膝関節症、鵞足炎、半月板損傷、膝離断性骨軟骨炎、大腿四頭筋腱炎、滑液包炎（膝蓋前滑液包炎）、膝蓋大腿関節症、膝蓋靭帯炎（膝蓋腱炎）、オスグッド病、ベーカー嚢腫、関節リウマチ、膝骨壊死、異所性骨化等が挙げられ、好ましくは変形性膝関節症等が挙げられる。

[0064] 本発明においては、本発明の有効成分であるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐそのものを血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤として用いても、薬学的に許容される各種担体（例えば、等張化剤、キレート剤、安定化剤、ｐＨ調節剤、防腐剤、抗酸化剤、溶解補助剤、粘稠化剤等）と組み合わせた組成物として用いてもよい。

[0065] 等張化剤としては、例えば、グルコース、トレハロース、ラクトース、フルクトース、マンニトール、キシリトール、ソルビトール等の糖類、グリセリン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等の多価アルコール

類、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等の無機塩類等が挙げられる。

[0066] キレート剤としては、例えば、エデト酸二ナトリウム、エデト酸カルシウム二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、エデト酸四ナトリウム、エデト酸カルシウム等のエデト酸塩類、エチレンジアミン四酢酸塩、ニトリロ三酢酸又はその塩、ヘキサメタリン酸ソーダ、クエン酸等が挙げられる。

[0067] 安定化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム等が挙げられる。ｐＨ調節剤としては、例えば、塩酸、炭酸、酢酸、クエン酸等の酸が挙げられ、さらに水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸ナトリウム等のアルカリ金属炭酸塩又は炭酸水素塩、酢酸ナトリウム等のアルカリ金属酢酸塩、クエン酸ナトリウム等のアルカリ金属クエン酸塩、トロメタモール等の塩基等が挙げられる。

[0068] 防腐剤としては、例えば、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル等のパラオキシ安息香酸エステル、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化セチルピリジニウム等の第４級アンモニウム塩、アルキルポリアミノエチルグリシン、クロロブタノール、ポリクォード、ポリヘキサメチレンビグアニド、クロルヘキシジン等が挙げられる。

[0069] 抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸水素ナトリウム、乾燥亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、濃縮混合トコフェロール等が挙げられる。

[0070] 溶解補助剤としては、例えば、安息香酸ナトリウム、グリセリン、Ｄ－ソルビトール、ブドウ糖、プロピレングリコール、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、Ｄ－マンニトール等が挙げられる。

[0071] 粘稠化剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、エチルセルロース、カルメロースナトリウム、キサンタンガム、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピル

セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等が挙げられる。

[0072] また、本発明において、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０は、ビヒクルに組み込まれた状態で、又はビヒクルと共に（例えば、ビヒクルに包埋された状態で）本発明の剤に含まれていてもよい。ビヒクルとしては、ベクター、ポリマー等が挙げられる。ベクターとしては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター等のウイルスベクター；プラスミドベクター、バクテリアベクター等の非ウイルスベクター等が挙げられる。ポリマーとしては、カチオン性ポリマー（ポリエチレンイミンナノパーティクル等）等があげられるまた、本発明にかかる「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤」には、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０を発現させるように改変した細胞；当該細胞から調製したエクソソーム、膜小胞（Ｅｖｓ）等を含む剤も包含される。

[0073] 組成物の実施形態において、組成物中のｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの含有量は特に限定されず、例えば、９９質量％以上、９５質量％以上、９０質量％以上、７０質量％以上、５０質量％以上、３０質量％以上、１０質量％以上、５質量％以上、１質量％以上等の条件から適宜設定できる。

[0074] 組成物の実施形態において、組成物中のｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの含有量の上限は特に限定されず、例えば、９９質量％以下、９５質量％以下、９０質量％以下、７０質量％以下、５０質量％以下、３０質量％以下、１０質量％以下、５質量％以下、１質量％以下等の条件から適宜設定できる。

[0075] 組成物の実施形態において、本発明の組成物は、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療に有効であることが知られている物質をさらに含んでもよい。例えば、シスプラチンやカルボプラチン等のプラチナ製剤、イリノテカン、フルオロウラシル、テガフール、ウラシル、ゲムシタビン、シクロホスファミド、メトレキサート、ドキソルビシン等の抗がん剤；アセトアミ

ノフェン、ＮＳＡＩＤｓ、ノイロトロピン、オピオイド（リン酸コデイン、モルヒネ、オキシコドン、フェンタニル、レミフェンタニル、メペリジン、トラマドール、ブプレノルフィン、ペンタゾシン等）等の鎮痛剤；キシロカイン、ネオビタカイン等の局所麻酔薬；ヒアルロン酸等が挙げられる。これらの物質は一種単独で、又は二種以上を組み合わせて用いることができる。

[0076] 製剤形態は、特に限定されず、例えば錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤等の経口投与剤；注射剤（静脈注射、筋肉注射、局所注射等）、含嗽剤、点滴剤、外用剤（軟膏、クリーム、貼付薬、吸入薬）、座剤等の非経口投与剤等の各種製剤形態を挙げることができる。上記製剤形態のうち、好ましいものとしては、例えば、経口投与剤、注射剤等が挙げられ、より好ましくは注射剤等が挙げられる。これらの製剤には、前述したエクソソーム、膜小胞等を利用する態様も含まれる。また、本発明の剤は、医薬組成物が注射筒内に充填されている、注射器の形態であってもよい。

[0077] 当該実施形態において、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤の投与量は、投与経路、患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、成人に対する１日投与量が、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの量として、通常、５０００ｍｇ以下、１０００ｍｇ以下、１００ｍｇ以下、１０ｍｇ以下等となるように設定できる。血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤の投与量の下限も特に限定されず、例えば、成人に対する１日投与量が、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの量として、通常、１０００ｍｇ以上、１００ｍｇ以上、１０ｍｇ以上、５ｍｇ以上等となるように設定できる。１日１回投与する場合は、１製剤中にこの量が含まれていればよく、１日３回投与する場合は、１製剤中にこの３分の１量が含まれていればよい。

[0078] 当該実施形態において、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０の投与量は、投与経路、患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、成人に対する１日投与量が、通常、５０００ｍｇ以下、１０００ｍｇ以下、１００ｍｇ以下、１０ｍｇ以下等となるように設定できる。ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０

の投与量の下限も特に限定されず、例えば、成人に対する１日投与量が、通常、１０００ｍｇ以上、１００ｍｇ以上、１０ｍｇ以上、５ｍｇ以上等となるように設定できる。１日１回投与する場合は、１製剤中にこの量が含まれていればよく、１日３回投与する場合は、１製剤中にこの３分の１量が含まれていればよい。

[0079] 本発明の血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤は、哺乳動物等の患者に投与される。哺乳動物としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ヒツジ等が挙げられ、好ましくはヒトである。

[0080] 本発明において、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、・・・剤」には、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ自体を含む剤だけでなく、生体内、細胞内等でｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを形成するｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体も包含される。

[0081] 本明細書において「前駆体」は、切断又は２本鎖の開裂などによって成熟ｍｉＲＮＡを生成しうるＲＮＡである。従って、前駆体としては、例えば、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ、成熟ｍｉＲＮＡとそのアンチセンス鎖からなる２本鎖ｍｉＲＮＡ（以下、単に「２本鎖ｍｉＲＮＡ」と示すこともある。）、これらの組み合わせ等が挙げられる。そのため、本発明において、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体としては、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐのｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ、２本鎖ｍｉＲＮＡ、これらの組み合わせ等が挙げられる。

[0082] また、本発明において、用語「ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により・・・予防または治療するため」には、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ自体を用いる用途だけでなく、生体内、細胞内等でｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを形成するｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの前駆体を用いる用途も包含される。本発明において、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの前駆体としては、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐのｐｒｉ－ｍｉＲＮＡ、ｐｒｅ－ｍｉＲＮＡ、２本鎖ｍｉＲＮＡ、これらの組み合わせ等が挙げられる。

[0083] 別の実施形態において、本発明は、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤を提供する。本実施形態は、有効成分としてｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む剤であって、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用のために用いるものに関する。当該実施形態においても、本発明の有効成分であるｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐそのものを血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤として用いても、薬学的に許容される各種担体（例えば、等張化剤、キレート剤、安定化剤、ｐＨ調節剤、防腐剤、抗酸化剤、溶解補助剤、粘稠化剤等）と組み合わせた組成物として用いてもよい。当該実施形態において、組成物中のｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの含有量は特に限定されず、例えば、９９質量％以上、９５質量％以上、９０質量％以上、７０質量％以上、５０質量％以上、３０質量％以上、１０質量％以上、５質量％以上、１質量％以上等の条件から適宜設定できる。

[0084] 当該実施形態において、組成物中のｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの含有量の上限は特に限定されず、例えば、９９質量％以下、９５質量％以下、９０質量％以下、７０質量％以下、５０質量％以下、３０質量％以下、１０質量％以下、５質量％以下、１質量％以下等の条件から適宜設定できる。

[0085] 当該実施形態において、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤の投与量は、投与経路、患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、成人に対する１日投与量が、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの量として、通常、５０００ｍｇ以下、１０００ｍｇ以下、１００ｍｇ以下、１０ｍｇ以下等となるように設定できる。血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤の投与量の下限も特に限定されず、例えば、成人に対する１日投与量が、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの量として、通常、１０００ｍｇ以上、１００ｍｇ以上、１０ｍｇ以上、５ｍｇ以上等となるように設定できる。１日１回投与する場合は、１製剤中にこの量が含まれていればよく、１日３回投与する場合は、１製剤中にこの３分の１量が含まれていればよい。

[0086] 当該実施形態において、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの投与量は、投与経路、患者の年齢、体重、症状等によって異なり一概に規定できないが、成人に対する１日投与量が、通常、５０００ｍｇ以下、１０００ｍｇ以下、１００ｍｇ以下、１０ｍｇ以下等となるように設定できる。ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの投与量の下限も特に限定されず、例えば、成人に対する１日投与量が、通常、１０００ｍｇ以上、１００ｍｇ以上、１０ｍｇ以上、５ｍｇ以上等となるように設定できる。１日１回投与する場合は、１製剤中にこの量が含まれていればよく、１日３回投与する場合は、１製剤中にこの３分の１量が含まれていればよい。

[0087] 当該実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの定義、使用割合、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体が包含され得る点、組成物の実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ以外の成分、対象疾患又は病態等は前述と同様である。

[0088] 別の実施形態において、本発明は、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤を提供する。本実施形態は、有効成分としてｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む剤に関する。当該実施形態においても、本発明の有効成分であるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐそのものを血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤として用いても、薬学的に許容される各種担体（例えば、等張化剤、キレート剤、安定化剤、ｐＨ調節剤、防腐剤、抗酸化剤、溶解補助剤、粘稠化剤等）と組み合わせた組成物として用いてもよい。当該実施形態において、組成物中のｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの含有量は特に限定されず、これらの合計量として、例えば、９９質量％以上、９５質量％以上、９０質量％以上、７０質量％以上、５０質量％以上、３０質量％以上、１０質量％以上、５質量％以上、１質量％以上等の条件から適宜設定できる。

[0089] 当該実施形態において、組成物中のｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの含有量の上限は特に限定されず、これらの合計量として、例えば、９９質量％以下、９５質量％以下、９０質量％以下、７０質量％以下、５０質量％以下、３０質量％以下、１０質量％以下、５質量％以下、１質量％以下等の条件から適宜設定できる。

[0090] 当該実施形態において、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤」には、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐが一つの剤形に含まれている実施形態でだけでなく、これらは別々の剤形に含まれているいわゆる組み合わせ製剤も包含される。

[0091] 当該実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの定義、使用割合、投与量、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体が包含され得る点、組成物の実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ以外の成分、対象疾患又は病態等は前述と同様である。

[0092] ２．ＶＥＧＦ産生抑制剤

本発明によれば、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとを組み合わせることにより、ＶＥＧＦ産生を抑制し、それにより血管新生を抑制することができる。従って、一実施形態において、本発明は、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤を提供する。本実施形態は、有効成分としてｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む剤であって、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用のために用いるものに関する。

[0093] 当該実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの定義、使用割合、投与量、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体が包含され得る点、組成物の実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ以外の成分等は、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈ

ｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤」について前述したのと同様である。本発明のＶＥＧＦ産生抑制剤は、in vivo又はin vitroで使用することができる。

[0094] 一実施形態において、本発明は、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤を提供する。本実施形態は、有効成分としてｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む剤であって、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用のために用いるものに関する。

[0095] 当該実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの定義、使用割合、投与量、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体が包含され得る点、組成物の実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ以外の成分等は、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤」について前述したのと同様である。本発明のＶＥＧＦ産生抑制剤は、in vivo又はin vitroで使用することができる。

[0096] 一実施形態において、本発明は、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ＶＥＧＦ産生抑制剤を提供する。本実施形態は、有効成分としてｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む剤に関する。

[0097] 当該実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの定義、使用割合、投与量、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの前駆体が包含され得る点、組成物の実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ以外の成分等は、「ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤」について前述したのと同様である。本発明のＶＥＧＦ産生抑制剤は、in vivo又はin vitroで使用することができる。

[0098] ３．その他の実施形態

以上、本発明の特定の実施形態を用いて本発明を説明したが、本発明はこれらの実施形態に限定されない。例えば、本発明には、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとを組み合わせて用いること、これらの組み合わせを血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療の用途又はＶＥＧＦ産生抑制の用途に用いるものであれば、様々な実施形態（血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するためのキット、ＶＥＧＦ産生を抑制するためのキット、血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための方法、ＶＥＧＦ産生を抑制するための方法、血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの使用、ＶＥＧＦ産生を抑制するためのｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及び／又はｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの使用等）が包含され得る。

[0099] 実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐの定義、使用割合、投与量、組成物の実施形態におけるｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ以外の成分等は、前述したのと同様である。キットの実施形態には、必要に応じて他の成分を含めることができる。他の成分は、例えば検体を採取するための道具（例えば、注射器。）、ポジティブコントロール試料及びネガティブコントロール試料などが挙げられるが、これに限定されない。

実施例

[0100] 実施例を用いて本発明の特定の実施形態をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない

[0101] 実施例１．ｍｉＲＮＡの選定

ｍｉＲＴａｒＢａｓｅ８．０（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ２０２０，８；４８（Ｄ１）：Ｄ１４８－Ｄ１５４．）を用いて、ＶＥＧＦのｍＲＮＡを制御する報告がある候補ｍｉＲＮＡを抽出した。さらに、ＦＡＮＴＯＭ （https://fantom.gsc.riken.jp/jp/ ）より軟骨、滑膜およ

び血管におけるｍｉＲＮＡ発現データを入手し、各組織に特徴的な発現パターンを示すｍｉＲＮＡを２０種任意に選択した。選択したｍｉＲＮＡを細胞内で発現させるｍｉＲＩＤＩＡＮ ｍｉｃｒｏＲＮＡ Ｍｉｍｉｃおよび Ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｏｎｔｒｏｌ＃１（以下、ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ：Ｈｏｒｉｚｏｎ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｔｄ．）を購入し、実験に用いた。

実施例で用いたｍｉＲＮＡの塩基配列は以下の通り：

ＮＣ（ｍｉＲＩＤＩＡＮ Ｎｅｇａｔｉｖｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ ＃１ ｃｅｌ－ｍｉＲ－６７）：ＵＣＡＣＡＡＣＣＵＣＣＵＡＧＡＡＡＧＡＧＵＡＧＡ

ｍｉＲ－１４０－５ｐ：ＣＡＧＵＧＧＵＵＵＵＡＣＣＣＵＡＵＧＧＵＡＧ

ｍｉＲ－１０７：ＡＧＣＡＧＣＡＵＵＧＵＡＣＡＧＧＧＣＵＡＵＣＡ

ｍｉＲ－１２６－３ｐ：ＵＣＧＵＡＣＣＧＵＧＡＧＵＡＡＵＡＡＵＧＣＧ

ｍｉＲ－２７ｂ－３ｐ：ＵＵＣＡＣＡＧＵＧＧＣＵＡＡＧＵＵＣＵＧＣ

ｍｉＲ－１９９ａ－３ｐ：ＡＣＡＧＵＡＧＵＣＵＧＣＡＣＡＵＵＧＧＵＵＡ

ｍｉＲ－１２５ａ－５ｐ：ＵＣＣＣＵＧＡＧＡＣＣＣＵＵＵＡＡＣＣＵＧＵＧＡ

ｍｉＲ－１９９ａ－５ｐ：ＣＣＣＡＧＵＧＵＵＣＡＧＡＣＵＡＣＣＵＧＵＵＣ

ｍｉＲ－１０１－３ｐ：ＵＡＣＡＧＵＡＣＵＧＵＧＡＵＡＡＣＵＧＡＡ

ｍｉＲ－３２０ａ：ＡＡＡＡＧＣＵＧＧＧＵＵＧＡＧＡＧＧＧＣＧＡ

ｍｉＲ－１２８－３ｐ：ＵＣＡＣＡＧＵＧＡＡＣＣＧＧＵＣＵＣＵＵＵ

ｍｉＲ－１４５－５ｐ：ＧＵＣＣＡＧＵＵＵＵＣＣＣＡＧＧＡＡＵＣＣＣＵ

ｍｉＲ－１２６－５ｐ：ＣＡＵＵＡＵＵＡＣＵＵＵＵＧＧＵＡＣＧＣＧ

ｍｉＲ－１００－５ｐ：ＡＡＣＣＣＧＵＡＧＡＵＣＣＧＡＡＣＵＵＧＵＧ

ｍｉＲ－１４６ａ－５ｐ：ＵＧＡＧＡＡＣＵＧＡＡＵＵＣＣＡＵＧＧＧＵＵ

ｍｉＲ－１４６ｂ－５ｐ：ＵＧＡＧＡＡＣＵＧＡＡＵＵＣＣＡＵＡＧＧＣＵ

ｍｉＲ－１４０－３ｐ：ＵＡＣＣＡＣＡＧＧＧＵＡＧＡＡＣＣＡＣＧＧ

ｍｉＲ－４５５－５ｐ：ＵＡＵＧＵＧＣＣＵＵＵＧＧＡＣＵＡＣＡＵＣＧ

ｍｉＲ－１４８ａ－３ｐ：ＵＣＡＧＵＧＣＡＣＵＡＣＡＧＡＡＣＵＵＵＧＵ

ｍｉＲ－１９３ｂ－３ｐ：ＡＡＣＵＧＧＣＣＣＵＣＡＡＡＧＵＣＣＣＧＣＵ

ｍｉＲ－１９３ｂ－５ｐ：ＣＧＧＧＧＵＵＵＵＧＡＧＧＧＣＧＡＧＡＵＧＡ

[0102] 実施例２．ヒト滑膜肉腫由来細胞株ＨＳ－ＳＹ-ＩＩにおけるｍｉＲＮＡ作用および併用作用

ヒト滑膜細胞株ＨＳ－ＳＹ－ＩＩ（ＲＩＫＥＮ Ｃｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，＃ＲＣＢ２２３１）をＦＡＬＣＯＮ ２４－ｗｅｌｌプレートに２ｘ１０^{5}細胞／ｗｅｌｌで播種し、１０％ＦＢＳ（ＮＩＣＨＩＲＥＩ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ ＩＮＣ）およびＡｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ、１６１－２３１８１）を含むＤＭＥＭ ｌｏｗ ｇｌｕｃｏｓｅ、ピルビン酸含有培地（Ｇｉｂｃｏ＃１１８８５）で培養した。選択したｍｉＲＮＡに対応するｍｉＲＩＤＩＡＮ ｍｉｃｒｏＲＮＡ Ｍｉｍｉｃ（以下、ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ：Ｈｏｒｉｚｏｎ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｌｔｄ．）をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ ＲＮＡｉＭａｘ（Ｔｈｅｒｍｏ ｆｉｓｈｅｒ）を用いて、最終濃度１０ｎＭでＨＳ－ＳＹ－ＩＩ細胞に導入し、３７℃、５％ＣＯ２インキュベーターで培養した。翌日に培地を交換し、低酸素Ｈｙｐｏｘｉａ）または通常酸素濃度下（Ｎｏｒｍｏｘｉａ）でさらに２４時間培養後に上清を回収し、Ｈｕｍａｎ ＶＥＧＦ ＳｉｍｐｌｅＳｔｅｐ ＥＬＩＳＡ ｋｉｔ（ａｂｃａｍ）を用いてＶＥＧＦ量を測定した。２４－ｗｅｌｌプレートの細胞数を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標） ２．０ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて解析し、細胞あたりのＶＥＧＦ産生量を算出した。Ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ処理群に対して、有意にＶＥＧＦ産生量を抑制したｍｉＲＮＡ-ｍｉｍｉｃを同定した。結果を図１に示す。20種類のｍｉＲＮＡ ｍｉｍｉｃのうち、５種類のｍｉＲＮＡｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ，ｈｓａ－ｍｉＲ－１０７、ｈｓａ－ｍｉＲ－１００－５ｐおよびｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－３ｐのｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃにＶＥＧＦ産生抑制傾向を認めた。

[0103] これらのｍｉＲＮＡの組み合わせをＨｙｐｏｘｉａによりＶＥＧＦ産生を誘導した条件で検討した。結果を図２に示す。図２に示すように、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの組み合わせにより、単独より抑制作用の増強が認められた。

[0104] 実施例３．ヒト滑膜由来細胞に対するｍｉＲＮＡの併用作用（ＶＥＧＦ産生抑制試験） 人工膝関節全置換術時に摘出された滑膜組織より、 ５ｍｇ／ｍｌ Ｃｏｌｌａｇｅｎａｓｅ Ｔｙｐｅ Ⅰ（Ｗｏｒｔｈｉｎｇｔｏｎ＃ＣＬＳ－１）を含む２０％ＦＢＳ ＤＭＥＭ／Ｆ１２培地（Ｇｉｂｃｏ＃１１３２０）を用いて滑膜細胞を単離し、ＣＥＬＬＢＡＮＫＥＲ １（ゼノアック）を用いて凍結保存した。実験には、１０％ＦＢＳとＡｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ Ｓｏｌｕｔｉｏｎを含むα－ＭＥＭ ＧｌｕＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ，＃ ３２５６１）（以下１０％ＦＢＳ－ＭＥＭ培地）で３回継代したものを実験に用いた。

第３継代滑膜由来細胞を１０％ＦＢＳ－ＭＥＭ培地でサブコンフルエントまで培養し、２ｘ１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｗｅｌｌで１２ｗｅｌｌファルコンプレートに播種し、播種時に１０ｎＭ ｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ ｍｉｍｉｃ（ｍｉＲ－１２６－３ｐ）、 １０ｎＭ ｍｉＲＮＡ－１４０－５ｐ ｍｉｍｉｃ単独（ｍｉＲ－１４０－５ｐ）、または、それぞれ１０ｎＭのｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ ｍｉｍｉｃとｍｉＲＮＡ－１４０－５ｐ ｍｉｍｉｃ（Ｍｉｘ）または、２０ｎＭ Ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｍｉＲＮＡ ｍｉｍｉｃ（ＮＣ）をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ ＲＮＡｉＭａｘを用いて、導入し、３７℃、５％ＣＯ２インキュベーターで培養した。播種の翌日に培地を交換し、ｍｉＲＮＡ導入後２４～４８時間培養した培地をＤａｙ２培養上清とし，同様にＤａｙ３，Ｄａｙ４，Ｄａｙ８に培養上清を回収した。Ｈｕｍａｎ ＶＥＧＦ ＳｉｍｐｌｅＳｔｅｐ ＥＬＩＳＡ ｋｉｔ（ａｂｃａｍ）を用いて、ＶＥＧＦ量を測定した。１２穴プレートの細胞数をＣｅｌｌ ｔｉｔｅｒ Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて解析し、細胞あたりのＶＥＧＦ産生量を算出した。結果を図３に示す。Ｎｅｇａｔ

ｉｖｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ処理群に対して、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとｈａｓ－ｍｉＲ－１４０－５ｐの組み合わせにより、単独より強い抑制作用が認められた。

[0105] 実施例４．膝前十字靭帯切断モデル（ＡＣＬＴ）に対するｍｉＲＮＡ　ｍｉｍｉｃの作用

（1）ＡＣＬＴモデルの作製

Ｗｉｓｔａｒ系１３週齢雄性ラットを処置の２週間前から馴化して用いた。イソフルランと酸素吸入による麻酔下で、無菌的に膝蓋腱を露出させるため、パラパテラアプローチで皮膚を１ｃｍ切開した。膝関節を９０°屈曲させ、膝蓋腱を露出させた後に、膝蓋骨を外側へ脱臼させた。膝関節内の前十字靭帯をハサミで切断後、ピンセットで内側半月板を切除した（ＡＣＬＴ処置）。膝蓋腱を整復し、関節包、皮膚を縫合した。同様に関節腔を切開しただけの群をＳｈａｍオペ群とした。

[0106] （2）ｍｉＲＮＡ　ｍｉｍｉｃの関節腔内投与

ＡＣＬＴ処置１週間後にＩＮＣＡＰＡＣＩＴＡＮＣＥ　ＭＥＴＥＲ（ＬＩＮＴＯＮ）を用いて患肢荷重配分比を測定し、体重および患肢荷重配分比の偏りがないように４群（ｎ＝５）に振り分け、Ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ群（ＮＣ）、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ　ｍｉｍｉｃ単剤群（ｍｉＲ－１２６－３ｐ）、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ単剤群（ｍｉＲ－１４０－５ｐ）、ｍｍｕ－ｍｉＲ－１２６－３ｐ＆ｍｍｕ－ｍｉＲ－１４０－５併用群（Ｍｉｘ）とした。ｍｉＲＮＡ　Ｍｉｍｉｃは、ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｊｅｔＰＥＩ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ　ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）を用いて、取扱説明書に従い２ｎｍｏｌ／３０ｕＬに調製した。ｍｉＲ－１２６－３ｐ＆ｍｉＲ－１４０－５ｐ　Ｍｉｘ群は各１ｎｍｏｌ／３０ｕＬとした。膝関節内側を１ｃｍ程度切開し、パラパテラアプローチで膝蓋腱までアプローチした。膝関節を９０°屈曲した状態で、２９Ｇ針を用い、膝蓋腱直上から関節内に向けてｍｉＲＮＡ　ｍｉｍｉｃ溶液を投与し、膝関節をゆっくり伸展位に戻し、切開した皮膚を縫合した。ｍｉＲＮＡ　Ｍｉｍｉｃ溶液は、ＡＣ

ＬＴ処置後１週から４週後まで週１回３０ｕＬを関節腔内投与した。ＡＣＬＴ処置後５週目にラットを安楽死させ、関節組織（滑膜組織および軟骨組織）を採取した。ウエスタンブロット用の関節組織は、ｍｉＲＮＡ　Ｍｉｍｉｃ溶液３０ｕＬを、ＡＣＬＴ処置後2週および4週の2回関節腔内投与し、ＡＣＬＴ処置後5週目にラットを安楽死させ採取した。

[0107]　（３）ＶＥＧＦ産生抑制試験（ウエスタンブロット）

滑膜組織は、ＲＩＰＡ溶液中で、ビーズ式破砕装置を用いて溶解し、１００００ｒｐｍで５分遠心し、上清を組織溶解試料とした。関節液試料は、関節腔内投与と同様に３０μＬの生理食塩水を注入し、針先を関節腔内に維持したまま膝を屈伸させたのち、回収可能な関節腔内の生理食塩水および体液を全て回収した。Ｌｏｗｒｙ法により試料のタンパク質濃度を測定し、関節液はアセトン沈殿によりタンパク質を濃縮した。１レーンあたり３００ｎｇのタンパク質をＷＥＳ（プロテインシンプルジャパン）を用いた免疫反応により解析した。ＶＥＧＦの検出には、抗ＶＥＧＦウサギモノクローナル抗体（ＥＰＲ２０７０５：ａｂｃａｍ、ａｂ２１４４２４）、を用い、Ｔｏｔａｌ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　ｍｏｄｕｌｅ（プロテインシンプルジャパン）を用いて補正を行い、滑膜組織、関節液中のＶＥＧＦ量を比較した。結果を図４に示す。ＡＣＬＴ処置をうけたラットのうちＮｅｇａｔｉｖｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ群の滑膜組織中のＶＥＧＦはＳｈａｍ群と比べ増加したがｍｉＲＮＡｍｉｍｉｃ投与群は、有意に増加が抑制された。

[0108]　（４）疼痛試験

患肢荷重配分比の測定は、ＩＮＣＡＰＡＣＩＴＡＮＣＥ　ＭＥＴＥＲ（ＬＩＮＴＯＮ）を用いて、ＡＣＬＴ処置後１週から５週目まで、週２回行った。結果を図５に示す。患肢荷重配分比は、ＮＣ群ではＡＣＬＴ後５週まで３０％前後で推移したが、単独投与群は投与開始後、徐々に荷重割合が改善し、５週で４２％となった。ＭＩＸ群では更に荷重配分比が改善し４７％であった。

[0109]　（５）滑膜炎スコア評価

１０％緩衝ホルマリンにて組織固定後、４℃で脱灰後、パラフィンに包埋し、薄切した。ヘマトキシリンエオジン染色を行い、滑膜組織を鏡検した。ＯＡによる軟骨変性の評価は、Ｋｒｅｎｎ らの炎症 ｓｃｏｒｅ 分類を用いて行なった。結果を図６に示す。ＡＣＬＴ処置により滑膜炎スコアが上昇したが、ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃの関節内投与により、滑膜炎が抑制された。

[0110] 実施例５．Ｃ２８／Ｉ２（軟骨細胞株）におけるＶＥＧＦ産生抑制

ヒト軟骨細胞株Ｃ２８／Ｉ２ Ｈｕｍａｎ Ｃｈｏｎｄｒｏｃｙｔｅ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ（Ｍｅｒｃｋ社）をＣｏｒｎｉｎｇ ９６ｗｅｌｌプレートに３ｘ１０^{3}細胞／ｗｅｌｌで播種し、１０％ＦＢＳ（ＮＩＣＨＩＲＥＩ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ ＩＮＣ）およびＡｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ、１６１－２３１８１）を含むＤＭＥＭ培地（Ｇｉｂｃｏ＃１１３２０）で播種した。播種時に１０ｎＭ ｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ ｍｉｍｉｃ（ｍｉＲ－１２６－３ｐ）、 １０ｎＭ ｍｉＲＮＡ－１４０－５ｐ ｍｉｍｉｃ単独（ｍｉＲ－１４０－５ｐ）、または、それぞれ１０ｎＭのｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ ｍｉｍｉｃとｍｉＲＮＡ－１４０－５ｐ ｍｉｍｉｃまたは、２０ｎＭ Ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｍｉＲＮＡ ｍｉｍｉｃ（ＮＣ）をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ ＲＮＡｉＭａｘを用いて、Ｃ２８／Ｉ２ 細胞に導入し、３７℃、５％ＣＯ２インキュベーターで培養した。２日後に培地を除去し、１０ ｎｇ／ｍＬ ｈｕｍａｎ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＩＬ－１β（Ｒ＆Ｄ）を含む培地、または含まない通常の培地に交換し、さらに２４時間培養後に上清を回収した。上清中のＶＥＧＦ含量を、Ｈｕｍａｎ ＶＥＧＦ ＥＬＩＳＡ ｋｉｔ（ａｂｃａｍ）を用いて測定した。培養上清回収時の９６－ｗｅｌｌプレートの細胞数を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標） ２．０ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて解析し、細胞あたりのＶＥＧＦ産生量を算出した。結果を図７に示す。図７に示すように、ＩＬ－１βを添加しない条件および

添加する条件で、Ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ処理群に対して、ｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐまたはｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ処理群のＶＥＧＦ産生量は有意に減少し、さらに組み合わせ群では単独処理群に対して有意に減少したことから、ヒト軟骨細胞株においてもｍｉＲＮＡの組み合わせによりＶＥＧＦ産生抑制作用が増強された。

[0111] 実施例６．ＳＷ１３５３（軟骨肉腫細胞株）におけるＶＥＧＦ産生抑制

ヒト軟骨肉腫細胞株ＳＷ１３５３（Ｃｅｌｌ ｌｉｎｅｓ ｓｅｒｖｉｃｅ社）をＣｏｒｎｉｎｇ ９６ｗｅｌｌプレートに3×10^3細胞／ｗｅｌｌで播種し、５％ＦＢＳ（ＮＩＣＨＩＲＥＩ ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥＳ ＩＮＣ）およびＡｎｔｉｂｉｏｔｉｃ－Ａｎｔｉｍｙｃｏｔｉｃ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ（Ｆｕｊｉｆｉｌｍ、１６１－２３１８１）を含むＤＭＥＭ：Ｆ１２（１：１）（Ｇｉｂｃｏ＃１１３２０）で播種した。播種時に１０ｎＭ ｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ ｍｉｍｉｃ（ｍｉＲ－１２６－３ｐ）、１０ｎＭ ｍｉＲＮＡ－１４０－５ｐ ｍｉｍｉｃ単独（ｍｉＲ－１４０－５ｐ）、または、それぞれ１０ｎＭのｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐ ｍｉｍｉｃとｍｉＲＮＡ－１４０－５ｐ ｍｉｍｉｃまたは、２０ｎＭ Ｎｅｇａｔｉｖｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｍｉＲＮＡ ｍｉｍｉｃ（ＮＣ）をＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎ ＲＮＡｉＭａｘを用いて、ＳＷ－１３５３細胞に導入し、３７℃、５％ＣＯ２インキュベーターで培養した。２日後に培地を除去し、１０ ｎｇ／ｍＬ ｈｕｍａｎ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ＩＬ－１β（Ｒ＆Ｄ）を含む培地、または含まない通常の培地に交換し、さらに２４時間培養後に上清を回収した。上清中のＶＥＧＦ含量を、Ｈｕｍａｎ ＶＥＧＦ ＥＬＩＳＡ ｋｉｔ（ａｂｃａｍ）を用いて測定した。培養上清回収時の９６－ｗｅｌｌプレートの細胞数を、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）２．０ Ｃｅｌｌ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて解析し、細胞あたりのＶＥＧＦ産生量を算出した。

結果を図８に示す。図８に示すように、IL-1βを添加しない条件では、Ｎ

ｅｇａｔｉｖｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ処理群に対して、ｍｉＲＮＡｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐおよびｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ処理群および組み合わせ群のＶＥＧＦ産生量は検出限界以下に減少した。炎症を促進するサイトカインであるIL-1β処理により、ＳＷ１３５３のＶＥＧＦ産生量は３倍以上増加し、この条件下においても、Ｎｅｇａｔｉｖｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ　ｍｉＲＮＡ－ｍｉｍｉｃ処理群に対して、ｍｉＲＮＡｈｓａ－ｍｉＲＮＡ－１２６－３ｐおよびｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ処理群のVEGF産生量は有意に減少し、さらに組み合わせ群では検出限界以下に減少したことから、ヒト軟骨肉腫細胞株においても組み合わせによりＶＥＧＦ産生抑制作用が増強された。

請求の範囲

[請求項1] ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、血管新生を伴う疾患又は病態の予防または治療剤。

[請求項2] ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤。

[請求項3] ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用により血管新生を伴う疾患又は病態を予防または治療するための剤。

[請求項4] ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐ及びｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ＶＥＧＦ産生抑制剤。

[請求項5] ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤。

[請求項6] ｈｓａ－ｍｉＲ－１２６－３ｐを含む、ｈｓａ－ｍｉＲ－１４０－５ｐとの併用によりＶＥＧＦ産生を抑制するための剤。

[請求項7] 血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患、肩こり、癌、慢性関節リウマチ、がん細胞増殖・転移、粥状動脈硬化症、血管新生黄斑症、乾癬、糖尿病性網膜症、近視性脈絡膜新生血管、加齢黄斑変性、付着部炎、野球肘、腱板損傷及び足底筋腱炎からなる群より選択される少なくとも一種である、請求項１～６のいずれか一項に記載の剤。

[請求項8] 血管新生を伴う疾患又は病態が関節疾患である、請求項７に記載の剤。

[請求項9] 関節疾患が変形性膝関節症である、請求項８に記載の剤。

[請求項10] 注射剤である、請求項１～６のいずれか一項に記載の剤。