

明 細 書

発明の名称：

心筋再生、心筋線維化の抑制または心疾患の処置用の医薬組成物

技術分野

[0001] 本特許出願は、日本国特許出願第2023-149419号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、心筋再生、心筋線維化の抑制または心疾患の処置用の医薬組成物に関するものである。

背景技術

[0002] 心筋梗塞や拡張型心筋症などの心疾患では、ポンプ機能を担う心筋細胞が障害を受け、最終的には変性または壊死し、その結果として心筋組織の線維化による心筋リモデリングが生じる。これらの変化は心不全や不整脈、それに伴う心臓死をもたらすことがよく知られている。心筋細胞は一般的に自己再生能力を欠き、哺乳類では心筋再生は生後まもない期間にしか見られない（非特許文献1、2）。

[0003] NF- κ Bは、炎症、細胞増殖およびアポトーシスに関与する転写因子である。NF- κ Bの活性化は阻害サブユニットのI κ Bにより制御されており、I κ Bのリン酸化、ユビキチン化および分解を要する。NF- κ B活性化の開始段階を担うI κ Bキナーゼ（IKK）複合体は、IKK α 、IKK β （IKK-2とも呼ばれる）およびIKK γ の3つのサブユニットからなる。筋線維芽細胞選択的IKK β ノックアウトマウスは、強皮症モデルとして知られている（特許文献1）。恒常的にキナーゼ活性を示すIKK β の変異体が知られている（非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2014/069597号パンフレット

非特許文献

[0005] 非特許文献1: Qi Xiao, et al., A p53-based genetic tracing system to follow postnatal cardiomyocyte expansion in heart regeneration, Development (2017) 144, 580-589

非特許文献2: Vanessa Hertig, et al., p38 α MAPK inhibition translates to cell cycle re-entry of neonatal rat ventricular cardiomyocytes and de novo nestin expression in response to thrombin and after apex resection, Scientific Reports (2019) 9:8203

非特許文献3: Mercurio F, et al. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappaB kinases essential for NF-kappaB activation. Science. 1997 Oct 31;278(5339):860-6.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本開示の目的は、心筋再生、心筋線維化の抑制または心疾患の処置用の医薬組成物を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、恒常的にキナーゼ活性を示す I K K β (恒常的活性型 I K K β) が心筋線維化の抑制および心筋再生を導き、心疾患の処置に有効であることを見出した。

従って、ある態様では、本開示は、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心疾患の処置用の医薬組成物を提供する。

ある態様では、本開示は、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋を再生するための医薬組成物を提供する。

ある態様では、本開示は、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋の線維化を抑制するための医薬組成物を提供する。

発明の効果

[0008] 本開示により、心筋再生、心筋線維化の抑制または心疾患の処置に新たな

手段が提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] 図1は、筋線維芽細胞が恒常的活性型 $IKK\beta$ を発現する $CAIKK\beta$ マウスの作製方法を示す。

[図2] 図2は、対照マウスおよび $CAIKK\beta$ マウスに心筋梗塞術を行い、14日後に心臓の切片をマッソントリクローム染色した代表的な像である。

[図3] 図3は、対照マウスおよび $CAIKK\beta$ マウスに心筋梗塞術を行い、14日後に心臓の切片をトロポニンT抗体で免疫染色した代表的な像である。

[図4] 図4は、 $pAAV-SM22\alpha-mIKK\beta-CA-WPRE$ のベクターマップである。

[図5] 図5は、心筋梗塞術の2日後に $SM22\alpha-mIKK\beta CA-AAV9$ を投与したマウスの心エコー画像および左室収縮率の推移を示す。

[図6] 図6は、心筋梗塞術の2日後に高用量または低用量の $SM22\alpha-mIKK\beta CA-AAV9$ を投与したマウスおよび対照マウスの生存率を示す。

Logrank検定：3群間 $p=0.000168$ 、投与有無 $p=0.0000658$ 、投与量 $2 \times 10^{11} \text{vg}$ vs 5×10^{11} : $p=0.0499$

[図7] 図7は、マウスに心筋梗塞術を行い、2日後に $SM22\alpha-mIKK\beta CA-AAV9$ を投与し、142日後に心臓の切片をマッソントリクローム染色した代表的な像である。

[図8] 図8は、マウスに心筋梗塞術を行い、2日後に $SM22\alpha-mIKK\beta CA-AAV9$ を投与し、176日後に心臓の切片をマッソントリクローム染色した代表的な像である。

[図9] 図9は、マウスに心筋梗塞術を行い、2日後に $SM22\alpha-mIKK\beta CA-AAV9$ を投与し、142日後に心臓の切片をマッソントリクローム染色した代表的な像である。

[図10] 図10は、マウスに心筋梗塞術を行い、14日後に心臓の切片をマッソントリクローム染色した代表的な像（左）、および、マウスに心筋梗塞術を行い、2日後に $SM22\alpha-mIKK\beta CA-AAV9$ を投与し、142

日後に心臓の切片をマッソントリクローム染色した代表的な像（右）である。

[図11]図11は、図10の枠内の拡大図である。

発明を実施するための形態

- [0010] 特に具体的な定めのない限り、本明細書で使用される用語は、有機化学、医学、薬学、分子生物学、微生物学等の分野における当業者に一般に理解されるとおりの意味を有する。以下にいくつかの本明細書で使用される用語についての定義を記載するが、これらの定義は、本明細書において、一般的な理解に優先する。
- [0011] 本明細書では、数値が「約」の用語を伴う場合、その値の±10%の範囲を含むことを意図する。例えば、「約20」は、「18～22」を含むものとする。数値の範囲は、両端点の間のすべての数値および両端点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。従って、例えば、「約20～30」は、「18～33」を含むものとする。
- [0012] IKK β は、NF- κ Bを活性化するIKK β キナーゼ複合体を構成するサブユニットの1つである。IKK β キナーゼ複合体は、IKK α 、IKK β およびIKK γ を含み、各種サイトカインの刺激を受けてIKK β キナーゼ複合体のキナーゼ活性が生じる。ヒトおよびマウスのIKK β のアミノ酸配列は、例えば、GenBankアクセッション番号NP_001547.1（配列番号1）およびNP_001153246.1（配列番号2）として各々登録されている。本開示において、IKK β は、その天然に存在する対立遺伝子の産物を含む。
- [0013] 本開示において、恒常的活性型IKK β は、サイトカイン刺激がない状態でキナーゼ活性を示すIKK β を意味する。例えば、恒常的活性型IKK β は、サイトカインで刺激されたIKK β と比較して、少なくとも約10%のキナーゼ活性、例えば、約20%以上、約30%以上、約40%以上、約50%以上、約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、約97%、約98%、約99%または約100%以上のキナー

ゼ活性を示す。キナーゼ活性は、公知のキナーゼアッセイ、例えば、非特許文献3に記載の方法により測定できる。

[0014] 恒常的活性型 I K K β の例として、配列番号1の177位および181位のセリンがグルタミン酸に置換された変異型 I K K β (配列番号3) および配列番号2の177位および181位のセリンがグルタミン酸に置換された変異型 I K K β (配列番号4) が挙げられる。ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β は、配列番号3または4のアミノ酸配列と、B L A S T等を用いて計算したときに(例えば、B L A S Tのデフォルト、即ち初期条件のパラメーターを用いた場合に)、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約97%、約98%もしくは約99%以上の同一性を有し、配列番号3または4の177位および181位に相当するアミノ酸がグルタミン酸であるアミノ酸配列を含むか、または当該アミノ酸配列からなる。

[0015] ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β は、配列番号3または4の177位および181位に相当するアミノ酸がグルタミン酸である限り、配列番号3または4のアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が欠失、置換あるいは付加した配列を含んでいてもよい。「数個」とは、好ましくは2~7個、より好ましくは2~5個、最も好ましくは2~3個のアミノ酸を意味する。アミノ酸置換は、類似するアミノ酸残基間の保存的置換が好ましい。

[0016] 第1のアミノ酸配列におけるあるアミノ酸位置に相当する第2のアミノ酸配列におけるアミノ酸位置とは、第1のアミノ酸配列と第2のアミノ酸配列を、アミノ酸の一致が最大となる状態にアラインメントしたときに、第1のアミノ酸配列の当該位置と一致する第2のアミノ酸配列における位置を意味する。

[0017] ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β は、配列番号3または4のアミノ酸配列を含む。ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β は、配列番号3

または4のアミノ酸配列からなる。

[0018] ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、配列番号3のアミノ酸配列をコードする配列番号5のヌクレオチド配列を含むか、または当該ヌクレオチド配列からなる。ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、配列番号4のアミノ酸配列をコードする配列番号6のヌクレオチド配列を含むか、または当該ヌクレオチド配列からなる。

[0019] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、配列番号5または6のヌクレオチド配列と、BLAST等を用いて計算したときに（例えば、BLASTのデフォルト、即ち初期条件のパラメーターを用いた場合に）、約60%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、特に好ましくは約95%以上、最も好ましくは約97%、約98%もしくは約99%以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含むか、または当該ヌクレオチド配列からなり、配列番号3または4の177位および181位に相当するアミノ酸がグルタミン酸である恒常的活性型 I K K β をコードするものであってもよい。

[0020] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、配列番号5または6のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号3または4の177位および181位に相当するアミノ酸がグルタミン酸である恒常的活性型 I K K β をコードするヌクレオチド配列を有してもよい。「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」に関して、ここで使用されるハイブリダイゼーションは、例えば、Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983) 等に記載される通常の方法に準じて行うことができる。また「ストリンジェントな条件下」とは、例えば、6×SSC (1.5 M NaCl、0.15 M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を10×SSCとする)、50%ホルムアミドを含む溶液中で45℃にてハイブリッドを形成させた後、2×SSCで50℃にて洗浄するような条件 (Molecular Biology,

John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6)、および、それと同等のストリンジェンシーをもたらす条件を挙げることができる。

- [0021] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、プロモーターに作動可能に連結されていてもよい。本開示において、「作動可能に連結した」とは、プロモーターなどの調節配列エレメントと、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドが、恒常的活性型 I K K β の発現を可能とする様式で連結されていることを意味し、これらは直接連結していてもよく、その間に任意のヌクレオチド配列が存在してもよい。
- [0022] プロモーターは、構成的プロモーター、誘導性プロモーター、または組織もしくは細胞特異的プロモーターであり得る。構成的プロモーターとしては、CMV (Cytomegalovirus) プロモーター、P G K (Phosphoglycerate kinase) プロモーター、E F 1 α (Elongation factor 1- α) プロモーター、C A G プロモーター、S V 4 0 プロモーター、M S C V プロモーターが挙げられる。ある実施態様では、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、筋線維芽細胞特異的プロモーターに作動可能に連結されている。筋線維芽細胞特異的プロモーターとしては、S M 2 2 α 、コラーゲン、 α S M A、デスミン、オステオポンチン、F S P - 1、H S P 4 7 などのプロモーターが挙げられる。
- [0023] ヒトおよびマウスの S M 2 2 α プロモーターとして、各々、例えば配列番号 7 および 8 のヌクレオチド配列からなるプロモーターが挙げられる。ある実施態様では、S M 2 2 α プロモーターとして、配列番号 7 または 8 のヌクレオチド配列と約 6 0 % 以上、好ましくは約 7 0 % 以上、より好ましくは約 8 0 % 以上、さらに好ましくは約 9 0 % 以上、特に好ましくは約 9 5 % 以上、最も好ましくは約 9 7 %、約 9 8 % もしくは約 9 9 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む S M 2 2 α プロモーターを使用し得る。ある実施態様では、S M 2 2 α プロモーターは配列番号 7 または 8 のヌクレオチド配列を含む。ある実施態様では、S M 2 2 α プロモーターは配列番号 7 または 8 のヌクレオチド配列からなる。

- [0024] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、DNA または RNA であってよく、1 つ以上の非天然のヌクレオチドを含んでもよい。
- [0025] ある実施形態において、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、RNA である。本実施形態において、ポリヌクレオチドは、5' キャップ構造、5' 非翻訳領域 (UTR)、恒常的活性型 I K K β コード配列、3' UTR、およびポリ A 配列を含み得る。かかるポリヌクレオチドは、例えばプラスミド DNA を鋳型としたインビトロ転写により製造することができる。細胞内への送達のため、ポリヌクレオチドは脂質粒子やポリマー粒子に封入して投与され得る。
- [0026] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、ベクターに含まれていてもよい。ベクターは、所望の配列のポリヌクレオチドを細胞内に送達することができるものであり、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであり得る。ウイルスベクターとしては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、単純ヘルペスウイルス (HSV)、ワクシニアウイルス、センダイウイルス、または麻疹ウイルスベクターなどが挙げられる。非ウイルスベクターとしては、プラスミドベクター、リポソームベクターおよび人工染色体 (例えば、YAC、BAC、PAC) が挙げられる。各ベクターは常法に従い作製することができる。
- [0027] ベクターは、恒常的活性型 I K K β の発現を調節する 1 以上の調節配列を含んでもよい。調節配列としては、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、転写後調節因子 (post-transcriptional regulatory element, PRE) などの他の発現制御エレメントが挙げられる。
- [0028] ベクターは、その複製のため、複製開始点 (ori) を含んでもよい。また、ベクターを含む細胞の選択のためのマーカーを含んでもよい。選択マーカーとしては、ネオマイシン、カナマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ゼオシン、アンピシリンなどの薬剤に対する耐性を付与する遺伝子が挙げられる。
- [0029] ある実施形態において、ベクターは、AAV ベクターである。AAV には

多数の血清型が存在し、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV-rh10、AAV-DJ、およびAAVanc80が挙げられる。ある実施形態において、ベクターはAAV9ベクターである。AAVベクターは、天然形態であっても、キャプシドタンパク質などを改変した組換え形態であってもよい。

[0030] AAVベクターは、例えば、恒常的活性型IKK β をコードする配列（またはプロモーターの下流に配置した恒常的活性型IKK β をコードする配列）およびその両端のITR（inverted terminal repeats）を含むAAVベクタープラスミドを、AAVの複製や粒子形成に必要とされるRep遺伝子およびCap遺伝子を含むAAVヘルパープラスミドおよびAAVの増殖に必要とされるアデノウイルスのヘルパー遺伝子を有するアデノウイルスヘルパープラスミドとともにパッケージング細胞に導入することにより、作製することができる。パッケージング細胞としては、293T細胞、293細胞、HeLa細胞、COS1細胞、COS7細胞などが挙げられる。パッケージング細胞から放出されたウイルス粒子は、パッケージング細胞の培養上清から、遠心分離、フィルターろ過、カラム精製などの精製方法により回収することができる。

[0031] 後述する実施例において、筋線維芽細胞に恒常的活性型IKK β を発現させたマウスに心筋梗塞術を行ったところ、対照と比較して、心筋梗塞範囲と心筋線維化の抑制が観察された。また、野生型マウスに心筋梗塞術を行い、恒常的活性型IKK β をコードするポリヌクレオチドを投与したところ、左室収縮率の改善および生存期間の延長が見られ、心筋線維化の抑制および心筋壁の増生・肥厚が認められた。従って、恒常的活性型IKK β を心疾患の処置に使用し得る。理論により限定されないが、恒常的活性型IKK β の発現は心筋線維化の抑制および心筋の再生を導くと考えられる。

[0032] 処置される心疾患の例には、心筋の障害を特徴とする心疾患、例えば、心筋梗塞、拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋炎、高血圧性心筋症および特定

心筋症、特に心筋梗塞が含まれる。

[0033] 本開示において、「処置する」または「処置」は、疾患に罹患している対象において、疾患の原因を軽減または除去すること、その進行を遅延または停止させること、および／または、その症状を軽減、緩和、改善または除去することを意味する。

[0034] 心疾患の処置の対象はいかなる種であってもよく、典型的には哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル）、特にヒトである。

[0035] 医薬組成物の投与方法は特に限定されないが、経冠動脈投与、心筋内直接注入、経口投与、非経腸投与、注射、輸液、注入等の一般的な投与経路を経ることができ、組成物は、各投与経路に適する剤形であり得る。ある実施態様では、医薬組成物は静脈内投与される。ある実施態様では、医薬組成物は経冠動脈投与される。ある実施態様では、医薬組成物は心筋内直接注入される。

[0036] 経口投与の剤形としては、顆粒剤、細粒剤、粉剤、被覆錠剤、錠剤、散剤、カプセル剤、マイクロカプセル剤、チュアブル剤、液剤、懸濁剤、乳濁液などが挙げられる。また注射による投与の剤形としては、経冠動脈投与用、心筋内直接注入用、静脈注射用、点滴投与用、活性物質の放出を延長する製剤等などの医薬製剤一般の剤形を採用することができる。経冠動脈投与用、心筋内直接注入用、静脈注射用または点滴投与用の剤形としては、水性および非水性の注射溶液（抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、等張化剤等を含んでもよい）；ならびに水性および非水性の注射懸濁液（懸濁剤、増粘剤等を含んでもよい）が挙げられる。注射用の投与形は、密閉したアンプルやバイアル中に提供されてもよく、使用直前に滅菌液体（例えば、注射用水）を加えるだけでよい凍結乾燥物として提供されてもよい。注射溶液または懸濁液を、粉末、顆粒または錠剤から調製してもよい。

[0037] これらの剤形は、常法により製剤化することによって製造される。さらに製剤上の必要に応じて、医薬的に許容し得る各種の製剤用物質を配合するこ

とができる。製剤用物質は製剤の剤形により適宜選択することができるが、例えば、緩衝化剤、界面活性剤、安定化剤、防腐剤、賦形剤、希釈剤、添加剤、崩壊剤、結合剤、被覆剤、潤滑剤、滑沢剤、風味剤、甘味剤、可溶化剤等が挙げられる。

[0038] 医薬組成物の投与量および投与回数は、有効量の恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドが対象に投与されるように、投与対象の動物種、投与対象の健康状態、年齢、体重、投与経路、投与形態等に応じて当業者が適宜設定できる。ある状況での有効量は、日常的な実験によって容易に決定することができ、通常の臨床医の技術および判断の範囲内である。例えば、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む A A V ベクターをマウスに投与する場合、約 $1 \times 10^{11} \text{ v g}$ ~ $1 \times 10^{12} \text{ v g}$ 、約 $2 \times 10^{11} \text{ v g}$ ~ $1 \times 10^{12} \text{ v g}$ 、約 $2 \times 10^{11} \text{ v g}$ ~ $5 \times 10^{11} \text{ v g}$ 、約 $3 \times 10^{11} \text{ v g}$ ~ $7 \times 10^{11} \text{ v g}$ または約 $4 \times 10^{11} \text{ v g}$ ~ $6 \times 10^{11} \text{ v g}$ 、例えば、約 $2 \times 10^{11} \text{ v g}$ または約 $5 \times 10^{11} \text{ v g}$ の A A V ベクターを投与し得る。例えば、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む A A V ベクターをヒトに投与する場合、約 $1 \times 10^{12} \text{ v g}$ ~ $1 \times 10^{16} \text{ v g}$ 、約 $1 \times 10^{13} \text{ v g}$ ~ $1 \times 10^{15} \text{ v g}$ または約 $1 \times 10^{14} \text{ v g}$ ~ $5 \times 10^{14} \text{ v g}$ 、例えば、約 $3 \times 10^{14} \text{ v g}$ の A A V ベクターを投与し得る。医薬組成物は単回投与してもよく、複数回投与してもよく、持続投与してもよい。複数回投与する場合、例えば、1日1回~数回、例えば、1日1回、2回または3回の投与頻度で、連日または数日おきに、例えば、1日、2日、3日または7日おきに、投与し得る。投与期間は制限されず、休業期間を設けてもよい。ある実施態様では、医薬組成物は単回投与される。ある実施態様では、医薬組成物は心筋梗塞後1週間、6日、5日、4日、3日、2日または1日以内に、例えば2日以内に投与される。ある実施態様では、医薬組成物は、心筋梗塞後の血行再建と同時に、またはその直前もしくは直後に投与される。

[0039] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドは、単独で、または

、1種またはそれ以上のさらなる有効成分、特に、心疾患の処置または予防のための有効成分と併用できる。例えば、医薬組成物は、恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドに加えて、1種またはそれ以上のさらなる有効成分を含み得る。

[0040] 成分を「併用する」ことは、全成分を含有する投与剤形の使用および各成分を別個に含有する投与剤形の組合せの使用のみならず、それらが心疾患の処置のために使用される限り、各成分を同時に、または、いずれかの成分を遅延して投与することも意味する。2種またはそれ以上のさらなる有効成分を併用することも可能である。併用に適する有効成分には、例えば、抗炎症剤、血管拡張剤、血栓溶解剤、抗血小板薬、抗凝固薬、スタチン系薬剤、利尿剤、強心剤、心不全治療剤等が含まれる。

[0041] 恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドの投与に加えて、薬物療法以外の治療法を実施することもできる。適する治療法には、例えば、バルーンカテーテル、ステントまたは薬剤溶出性ステント（DES）等を用いた冠動脈インターベンション（PCI）および血栓吸引法等の外科手術、遺伝子治療、再生医療等が含まれる。

[0042] ある態様では、心疾患の処置を必要としている対象に恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、心疾患の処置方法が提供される。

ある態様では、心疾患の処置用の恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドが提供される。

ある態様では、心疾患を処置するための恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

ある態様では、心疾患の処置用の医薬組成物の製造における、恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

[0043] 別の態様では、恒常的活性型ⅠKK β をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋を再生するための医薬組成物が提供される。本開示において、「心筋を再生する」または「心筋再生」は、心筋の少なくとも一部に障害を受け

た対象、例えば、上記の心疾患に罹患している対象において、心筋細胞を増殖させることを意味する。この医薬組成物は、上記の心疾患の処置用の医薬組成物に準じて使用し得る。

[0044] ある態様では、心筋を再生することを必要としている対象に恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、心筋を再生する方法が提供される。

ある態様では、心筋を再生するための恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドが提供される。

ある態様では、心筋を再生するための恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

ある態様では、心筋を再生するための医薬組成物の製造における、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

[0045] 別の態様では、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋の線維化を抑制するための医薬組成物が提供される。本開示において、「心筋の線維化を抑制する」または「心筋線維化の抑制」は、心筋線維化のリスクがあるか、または、心筋の一部が線維化している対象、例えば、上記の心疾患に罹患している対象において、心筋線維化の発生を防止すること、心筋線維化の進行を遅延または停止させること、または心筋線維化を消退または軽減させること、を意味する。この医薬組成物は、上記の心疾患の処置用の医薬組成物に準じて使用し得る。

[0046] ある態様では、心筋の線維化を抑制することを必要としている対象に恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを投与することを含む、心筋の線維化を抑制する方法が提供される。

ある態様では、心筋の線維化を抑制するための恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドが提供される。

ある態様では、心筋の線維化を抑制するための恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

ある態様では、心筋の線維化を抑制するための医薬組成物の製造における

、恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドの使用が提供される。

[0047] 例えば、下記の実施態様が提供される。

[1] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心疾患の処置用の医薬組成物。

[2] 心疾患が、心筋梗塞、拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋炎、高圧性心筋症、特定心筋症である、前記 1 に記載の医薬組成物。

[3] 心疾患が心筋梗塞である、前記 1 または 2 に記載の医薬組成物。

[4] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋を再生するための医薬組成物。

[5] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋の線維化を抑制するための医薬組成物。

[6] 恒常的活性型 I K K β が、
配列番号 3 のアミノ酸配列と約 90% 以上の同一性を有し、配列番号 3 の 177 位および 181 位に相当するアミノ酸がグルタミン酸であるアミノ酸配列、または、

配列番号 4 のアミノ酸配列と約 90% 以上の同一性を有し、配列番号 4 の 177 位および 181 位に相当するアミノ酸がグルタミン酸であるアミノ酸配列、

を含む、前記 1 ～ 5 のいずれかに記載の医薬組成物。

[7] 恒常的活性型 I K K β が配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列を含む、前記 1 ～ 6 のいずれかに記載の医薬組成物。

[8] 恒常的活性型 I K K β が配列番号 3 または 4 のアミノ酸配列からなる、前記 1 ～ 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

[9] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドが、筋線維芽細胞特異的プロモーターに作動可能に連結されている、前記 1 ～ 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

[10] 筋線維芽細胞特異的プロモーターが SM22 α プロモーターである

、前記 9 に記載の医薬組成物。

[11] SM22 α プロモーターが、配列番号 7 または 8 と約 90% 以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む、前記 10 に記載の医薬組成物。

[12] SM22 α プロモーターが配列番号 7 または 8 のヌクレオチド配列を含む、前記 10 または 11 に記載の医薬組成物。

[13] SM22 α プロモーターが配列番号 7 または 8 のヌクレオチド配列からなる、前記 10 ～ 12 のいずれかに記載の医薬組成物。

[14] 恒常的活性型 IKK β をコードするポリヌクレオチドがベクターに含まれている、前記 1 ～ 13 のいずれかに記載の医薬組成物。

[15] ベクターがウイルスベクターである、前記 14 に記載の医薬組成物。

[16] ベクターがアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターである、前記 14 または 15 に記載の医薬組成物。

[17] AAV が AAV9 である、前記 16 に記載の医薬組成物。

[18] 心筋梗塞後 2 日以内に投与される、前記 1 ～ 17 のいずれかに記載の医薬組成物。

[19] 単回投与される、前記 1 ～ 18 のいずれかに記載の医薬組成物。

[20] 静脈内投与される、前記 1 ～ 19 のいずれかに記載の医薬組成物。

[21] 経冠動脈投与される、前記 1 ～ 19 のいずれかに記載の医薬組成物。

[22] 心筋内直接注入される、前記 1 ～ 19 のいずれかに記載の医薬組成物。

[23] 心筋梗塞後の血行再建と同時に、またはその直前もしくは直後に投与される、前記 1 ～ 22 のいずれかに記載の医薬組成物。

[0048] 本明細書で引用するすべての文献は、出典明示により本明細書の一部とする。

上記の説明は、すべて非限定的なものであり、本発明は添付の特許請求の範囲において定義され、その技術的思想を逸脱しない範囲で種々の変更が可能

能である。以下、実施例にて、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されない。

実施例

[0049] 筋線維芽細胞に恒常的活性型 I K K β を発現させたマウス (S M 2 2 α C r e - C A (Constitutive Active) I K K β マウス) の作製

STOCK Tg(Tagln-cre)1Her/J (Jackson Lab. strain# 004746、Boucher P., et al., LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. Science 300(5617):329-32) と B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm4(Ikbb)Rsky/J (Jackson Lab. strain# 008242、Sasaki Y., et al., Canonical NF- κ B activity, dispensable for B cell development, replaces BAFF-receptor signals and promotes B cell proliferation upon activation. Immunity 24(6):729-39) を交配させ、その第一世代より C r e (+) のマウスをジェノタイピング P C R (フォワードプライマー: GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC (配列番号 9) ; リバースプライマー: GTG AAA CAG CAT TGC TG T CAC TT (配列番号 10)) により同定し、S M 2 2 α C r e - C A I K K β f l o x / w t マウス (以下、C A I K K β マウスと称する) を得た (図 1) 。C r e (-) のマウスを対照として得た。

[0050] マウス心筋梗塞モデルの作製

8 - 12 週齢の雄マウスを全身麻酔後、気管挿管にて呼吸器管理下とした。肋骨間切開にて胸腔を露出し、心外膜を切開したのちに左冠動脈を直視下に同定し、7.0 monofilament thread (PROLENE, ETHICON) にて結紮した。心筋の色調と心筋運動が変化することを確認し、閉胸した。

[0051] マウス心エコー

Vevo2100 (富士フィルム) を用いて、無麻酔の状態で心筋梗塞後の心機能の評価した。

[0052] 組織染色

マウス心臓を冠動脈結紮レベルにて短軸方向に切断し、4 %パラホルムアルデヒドで固定したのちにパラフィンまたは O C T に包埋した。包埋したブ

ロックから10 μ m (パラフィンブロック) または6 μ m (OCTブロック) 厚にてスライドを作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE) またはマッソントリクローム染色を行った。

[0053] 免疫染色

マウス心臓を冠動脈結紮レベルにて短軸方向に切断し、4%パラホルムアルデヒドで固定したのちにOCTに包埋した。包埋したブロックから6 μ m (OCTブロック) 厚にてスライドを作製し、ThermoFisher Cardiac Troponin Monoclonal antibody (#MA512960)を用いて免疫染色を行った。

[0054] SM22 α -mIKK β CA-AAV9、SM22 α -tdTomato-AAV9の作製

プロモーター／エンハンサー配列及び導入遺伝子配列の遺伝子合成

マウスSM22 α プロモーター／エンハンサー (546 nt) およびFLAGタグ付きマウスIKK β キナーゼ活性型 (S177E/S181E、CAIKK β と同義) (2,319 nt) の遺伝子を合成した。

[0055] シスプラスミドベクターへの合成遺伝子挿入

(1) シスプラスミド: pAAV-SM22 α -tdTOMATO-WPRE

遺伝子合成したマウスSM22 α プロモーター／エンハンサーDNA断片を、MluI及びEcoRI部位で制限酵素切断後、SignaGen社保有のpAAV-CMV-WPREのMluI、EcoRI部位に挿入して、CMVプロモーターDNA配列と置換し、pAAV-SM22 α -WPREを構築した。次に、SignaGen社保有のpAAV-CMV-tdTOMATO-WPREをNheI及びPmeI部位で制限酵素切断してtdTOMATO配列を含むDNA断片を取得し、構築したpAAV-SM22 α -WPREのNheI、PmeI部位に挿入し、pAAV-SM22 α -tdTOMATO-WPREを構築した。

[0056] (2) シスプラスミド: pAAV-SM22 α -mIKK β -CA-WPRE

(1) で構築した pAAV-SM22 α -WPRE を EcoRV 部位で制限酵素切断して平滑末端を産生し、遺伝子合成した FLAG-マウス I K K 2 C A (S 1 7 7 E - S 1 8 1 E) DNA断片の平滑末端を pAAV-SM22 α -WPRE の EcoRV 部位に連結して挿入し、pAAV-SM22 α -m I K K β -C A -WPRE (配列番号 1 1) を構築した。配列番号 1 1 の 1 5 6 ~ 6 6 5 位がマウス SM22 α プロモーター／エンハンサー、6 9 8 ~ 3 0 1 0 位が FLAG-マウス I K K 2 C A である。

[0057] AAV へのパッケージング及び精製

以下の内容で AAV9 をパッケージング及び精製した。

(1) SM22 α -t d T O M A T O - A A V 9

シスプラスミド: pAAV-SM22 α -t d T O M A T O

(2) SM22 α -m I K K β C A - A A V 9

シスプラスミド: pAAV-SM22 α -m I K K β -C A

[0058] SM22 α -m I K K β C A - A A V 9 の投与

心筋梗塞術の 2 日後に、尾静脈より 2×10^{11} v g または 5×10^{11} v g の SM22 α -m I K K β C A - A A V 9 を投与した。対照としては、SM22 α -t d T o m a t o - A A V 9 を投与したか、または、AAV を投与しなかった。

[0059] 結果

試験 1 : C A I K K β マウスにおける心筋梗塞

対照マウスおよび C A I K K β マウスに心筋梗塞術を行い、14 日後に安楽死させ、心臓をマッソントリクローム染色した。代表的な結果を図 2 に示す。C A I K K β マウス (下段) では、対照マウス (上段) と比較して、線維化を示す青色で染色された領域が小さく、心筋の線維化が抑制されたことが示唆される。

[0060] 対照マウスおよび C A I K K β マウスに心筋梗塞術を行い、14 日後に安楽死させ、心臓をトロポニン T 抗体で免疫染色した。代表的な結果を図 3 に示す。C A I K K β マウス (右) の心筋細胞では、トロポニン T の細胞表面

局在が認められたが、対照マウス（左）では認められなかった。トロポニン T の細胞表面局在は、心筋が再生される魚類や生後まもないマウスの心臓など、細胞周期にある心筋細胞において報告されている（非特許文献 1、2）。従って、CAIKK β マウスでは、心筋梗塞後に心筋細胞が増殖し、心筋が再生されたことが示唆される。

[0061] 試験 2：心筋梗塞後の筋線維芽細胞特異的 CAIKK β 発現の効果

野生型マウス（C57BL/6J、8-12 週齢、雄）に心筋梗塞術を行い、2 日後に、SM22 α -mIKK β CA-AAV9（ 5×10^{11} vg）を尾静脈より投与した。心筋梗塞術後 1 週間より経時的に心エコーで心臓を観察した。投与群では、対照と比較して拍動の改善が認められた。客観的評価のために、左心室短軸画像における左室収縮率（EF）を梗塞範囲中心部において Teichholz 法により算出した。結果を図 5 に示す。拍動の観察と一致して、EF の経時的な改善が認められた。

[0062] 心筋梗塞術後の生存率を図 6 に示す。生存期間は高用量の SM22 α -mIKK β CA-AAV9 を投与したマウスで最も長く、次いで低用量の SM22 α -mIKK β CA-AAV9 を投与したマウスで長く、対照マウスで短かった（Logrank 検定：3 群間 $p = 0.000168$ 、投与有無 $p = 0.0000658$ 、投与量 2×10^{11} vg vs 5×10^{11} : $p = 0.0499$ ）。高用量の SM22 α -mIKK β CA-AAV9 を投与したマウス 6 例のうち、2 例は観察期間中に死亡せず、150 日間以上生存した。4 例は実験開始が遅かったため、術後 36 日で観察を終了した（打ち切りヒゲにて表記）。対照マウスの殆どが 10 日以内に死亡したことから、生存率の改善は明らかであった。

[0063] 心筋梗塞術後にマウスを安楽死させ、心臓をマッソントリクローム染色した。心筋梗塞術後 142 日および 176 日の代表的な結果をそれぞれ図 7 および 8 に示す。SM22 α -mIKK β CA-AAV9（ 5×10^{11} vg）を投与したマウスにおいて心筋線維化の抑制を認め、心筋が増生していることを示唆する所見（矢印）を観察した。また、心筋梗塞術後 142 日のマウ

スにおいて、心筋壁の肥厚を認めた（図9：左室中隔の右室接合部と中央部に矢印）。

[0064] 対照マウスを心筋梗塞術後14日に、SM22 α -mIKK β CA-AAV9（5×10¹¹vg）を投与したマウスを心筋梗塞術後142日に安楽死させ、心臓をマッソントリクローム染色した。代表的な結果を図10および11に示す。線維化を示す青色で染色された領域（図10および11では黒色）は、対照マウスよりもSM22 α -mIKK β CA-AAV9を投与したマウスで小さかった。

[0065] これらの結果は、恒常的活性型IKK β が心筋梗塞後の心筋線維化を抑制し、心筋の再生を促すことを示す。従って、恒常的活性型IKK β は、心筋梗塞などの心筋の障害を特徴とする心疾患の処置に有効である。

産業上の利用可能性

[0066] 本開示は、医療の分野で利用され得る。

請求の範囲

- [請求項1] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドを含む、心疾患の処置用の医薬組成物。
- [請求項2] 恒常的活性型 I K K β が、
配列番号 3 のアミノ酸配列と約 90% 以上の同一性を有し、配列番号 3 の 177 位および 181 位に相当するアミノ酸がグルタミン酸であるアミノ酸配列、または、
配列番号 4 のアミノ酸配列と約 90% 以上の同一性を有し、配列番号 4 の 177 位および 181 位に相当するアミノ酸がグルタミン酸であるアミノ酸配列、
を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 恒常的活性型 I K K β が配列番号 3 または配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドが、筋線維芽細胞特異的プロモーターに作動可能に連結されている、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の医薬組成物。
- [請求項5] 筋線維芽細胞特異的プロモーターが S M 2 2 α プロモーターである、請求項 4 に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 恒常的活性型 I K K β をコードするポリヌクレオチドがベクターに含まれている、請求項 1 に記載の医薬組成物。
- [請求項7] ベクターがウイルスベクターである、請求項 6 に記載の医薬組成物。
- [請求項8] ベクターがアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターである、請求項 6 に記載の医薬組成物。
- [請求項9] A A V が A A V 9 である、請求項 8 に記載の医薬組成物。
- [請求項10] 心疾患が、心筋梗塞、拡張型心筋症、肥大型心筋症、心筋炎、高血圧性心筋症、特定心筋症である、請求項 1 に記載の医薬組成物。
- [請求項11] 心疾患が心筋梗塞である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

- [請求項12] 心筋梗塞後2日以内に投与される、請求項11に記載の医薬組成物
。
- [請求項13] 恒常的活性型 $IKK\beta$ をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋を再生するための医薬組成物。
- [請求項14] 恒常的活性型 $IKK\beta$ をコードするポリヌクレオチドを含む、心筋の線維化を抑制するための医薬組成物。