

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12) 公開特許公報 ( A )

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 201142

(P2002 - 201142A)

(43)公開日 平成14年7月16日(2002.7.16)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
38/00		39/395	D 4 B 0 2 4
39/395		A 6 1 P 25/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 25/00		37/02	4 C 0 8 4
37/02		C 1 2 Q 1/02	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 16数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001 - 46046(P2001 - 46046)

(22)出願日 平成13年2月22日(2001.2.22)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 323985(P2000 - 323985)

(32)優先日 平成12年10月24日(2000.10.24)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)発明者 生嶋 秀人

大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友

製薬株式会社内

(74)代理人 100107629

弁理士 中村 敏夫

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レプチンを標的とした新規な自己免疫疾患治療剤

(57)【要約】

【課題】 自己免疫疾患の新規な治療及び/又は予防剤、及び当該治療及び/又は予防剤の探索のための新規なスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 レプチン阻害剤を有効成分として含有する自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤、レプチン阻害剤を探索することを指標とした自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法により得られる自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 レプチン阻害剤を有効成分として含有する、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤。

【請求項2】 自己免疫疾患が多発性硬化症である、請求項1記載の治療及び/又は予防剤。

【請求項3】 レプチン阻害剤が、レプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害するものである、請求項1又は2記載の治療及び/又は予防剤。

【請求項4】 レプチン阻害剤が、レプチン-レプチン受容体間の結合を阻害するものである、請求項3記載の10 治療及び/又は予防剤。

【請求項5】 レプチン阻害剤が可溶性レプチン受容体である、請求項4記載の治療及び/又は予防剤。

【請求項6】 レプチン阻害剤が抗レプチン抗体である、請求項4記載の治療及び/又は予防剤。

【請求項7】 レプチン阻害剤が、レプチンの発現又は分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害するものである、請求項1又は2記載の治療及び/又は予防剤。

【請求項8】 レプチン阻害剤を探索することを指標とした、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリー20 ニング方法。

【請求項9】 自己免疫疾患が多発性硬化症である、請求項8記載のスクリーニング方法。

【請求項10】 被験物質がレプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害するか否かを評価することを含む、請求項8又は9記載のスクリーニング方法。

【請求項11】 被験物質がレプチン-レプチン受容体間の結合を阻害するか否かを評価することを含む、請求項8～10いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項12】 (i)レプチン受容体にレプチンを接30 触させた場合と、(ii)レプチン受容体にレプチン及び被験物質を接触させた場合とを比較・評価することを含む、請求項8～11いずれか記載のスクリーニング方法。

【請求項13】 被験物質がレプチンの発現又は分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害するか否かを評価することを含む、請求項8又は9記載のスクリーニング方法。

【請求項14】 被験物質の存在下、レプチンを発現する細胞をインビトロで培養し、該細胞におけるレプチン40 の発現量又は分泌量を測定・評価することを含む、請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項15】 被験物質の存在下、レプチン受容体を発現する細胞をインビトロで培養し、該細胞におけるレプチン受容体の発現量を測定・評価することを含む、請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項16】 請求項8～15いずれか記載のスクリーニング方法により得られる自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体内のレプチンの作用を阻害することにより、自己免疫疾患の発症抑制、発症遅延、あるいは症状の軽減等の効果の生じることを初めて見出したことに基づくものであり、具体的には、レプチン阻害剤を有効成分として含有する自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤、及びレプチン阻害剤を探索することを指標とした自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

【従来技術】慢性関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどは一見異なった病態を示す疾患であるが、いずれも病変部位に炎症所見が認められる。これらの疾患は、本来自己以外の外来異物を認識するはずの免疫反応が、自己の組織や細胞の抗原、すなわち自己抗原と反応する自己免疫現象が病因を形成する、自己免疫疾患であると考えられている。

【0003】自己抗原に対する抗体や自己反応性T細胞は通常健康人にもみられることが知られており、これらが存在するだけでは自己免疫疾患に至らない。通常自己抗原に対する免疫反応には免疫学的寛容(トレランス)の状態が成立しているため病的反応には至らないのに対し、自己免疫疾患においては自己抗原に対するトレランスが何らかの原因で破綻しているものと考えられている。その要因については抗原に関与するもの、抗原提示機能に関与するもの、トレランスの制御に関与するものなどが考えられているが、不明な点が多く、未だそのメカニズムは解明されていない。

【0004】ところで、栄養的な欠乏状態、すなわち飢餓状態が免疫機能を抑制することが知られている(J.Clin.Nutr.53,1087-1101(1991)、Clin.Exp.Immunol.,64,370-375(1986)、J.Clin.Immunol.,13,445-451(1993))。そして、obese遺伝子の発現産物であるレプチンの血中濃度の減少が、前記免疫抑制に関与していると考えられている(Nature,394,897-901(1998)、J.Clin.Invest.,104,1051-1059(1999))。

【0005】レプチンは、もともと体重、節食を負に制御するホルモンとして単離・同定されたものである(Nature,372,425-432(1994)、Science,269,543-546(1995)、Eur.J.Med.Res.,2,7-13(1997))。最近になって、レプチンの血中濃度が絶食により速やかに減少すること(J.Clin.Endocrinol.Metab.,81,3419-3423(1996)、Nature,382,250-252(1996))、レプチンがTリンパ球の増殖や胸腺の細胞充実性(thymic cellularity)に関与していること(Nature,394,897-901(1998)、J.Clin.Invest.,104,1051-1059(1999)、そして飢餓状態のマウスにレプチンを投与することにより免疫抑制状態から回復したことなどが報告され(Nature,394,897-901(1998)、J.Clin.Invest.,104,1051-1059(1999))、前述のように飢餓50 による血中レプチンの減少が、免疫機能の抑制に関与し

ていると考えられるようになった。

【0006】このように、レプチンの減少と免疫抑制作用との関連は示されているものの、レプチンと自己免疫疾患との関連については何ら明らかにされていない。自己免疫疾患は、自己抗原に対する免疫学的寛容（トレランス）の破綻によって起こる疾患であるため、免疫抑制が自己抗原に対する免疫反応を抑制して自己免疫疾患の発症抑制や症状の改善効果をもたらす可能性がある一方、自己抗原に対する免疫学的寛容（トレランス）の誘導が抑制されて自己免疫現象の発症促進や症状の悪化を

もたらす可能性もある。  
【0007】例えばインターロイキン2（IL-2）はリンパ球を活性化するサイトカインであるが、IL-2のノックアウトマウスはT細胞のマイトジェン刺激に対する応答の低下がみられる（Nature, 352,621(1991)）一方、自己免疫疾患であるヒト潰瘍性大腸炎に類似した腸炎を発症し、9週齢までに50%が、10-25週齢までに殆どが死亡することが示されている（Cell, 75,253 (1993)）。

【0008】このような背景から、レプチンの減少による免疫抑制は報告されているものの、レプチンの減少や阻害により、実際に自己免疫疾患の発症抑制や症状の改善効果を示した報告は、現在まで何らなされておらず、レプチンと自己免疫疾患の関連は明らかではなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、レプチン阻害剤を有効成分として含有する自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤、及びレプチン阻害剤の探索を指標とした自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者は、代謝の変化が自己免疫疾患の発症に与える影響を検討するために、自己免疫疾患の代表的なモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）の発症に対して、絶食が影響を与えるか否かを検討した。その結果、絶食によりEAEの発症が遅延され、症状が軽減されることが明らかとなった。さらに、絶食中にレプチンを腹腔内投与すると前記絶食の効果が打ち消されたことから、レプチンがEAEの発症に関与していることが初めて明らかとなった。

【0011】次に本発明者は、レプチン欠損マウス（obマウス）及びレプチン受容体欠損マウス（dbマウス）に対してEAEを誘導した結果、これらいずれのマウスにおいてもEAEの発症は著しく軽度であった。以上の知見により、レプチンの作用を阻害することによって、自己免疫疾患の発症抑制、発症遅延、あるいは症状の軽減等の治療及び予防効果の得られることが、初めて明らかとなった。さらに本発明者は、実際に抗レプチン抗体をEAEマウスに投与してレプチンの作用を阻害した結果、まさしくEAEの発症遅延が認められたことから、上記知見が確かであることが確認された。本発明は、以上のような

知見に基づき完成するに至ったものである。

【0012】即ち本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) レプチン阻害剤を有効成分として含有する、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤、(2) 自己免疫疾患が多発性硬化症である、前記(1)記載の治療及び/又は予防剤、(3) レプチン阻害剤が、レプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害するものである、前記(1)又は(2)記載の治療及び/又は予防剤、

(4) レプチン阻害剤が、レプチン-レプチン受容体間の結合を阻害するものである、前記(3)記載の治療及び/又は予防剤、(5) レプチン阻害剤が可溶性レプチン受容体である、前記(4)記載の治療及び/又は予防剤、(6) レプチン阻害剤が抗レプチン抗体である、前記(4)記載の治療及び/又は予防剤、(7) レプチン阻害剤が、レプチンの発現又は分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害するものである、前記

(1)又は(2)記載の治療及び/又は予防剤、(8) レプチン阻害剤を探索することを指標とした、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法、

(9) 自己免疫疾患が多発性硬化症である、前記

(8)記載のスクリーニング方法、(10) 被験物質がレプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害するか否かを評価することを含む、前記(8)又は(9)記載のスクリーニング方法、(11) 被験物質がレプチン-レプチン受容体間の結合を阻害するか否かを評価することを含む、前記(8)～(10)いずれか記載のスクリーニング方法、(12) (i)レプチン受容体にレプチンを接触させた場合と、(ii)レプチン受容体にレプチン及び被験物質を接触させた場合とを比較・評価

30 することを含む、前記(8)～(11)いずれか記載のスクリーニング方法、(13) 被験物質がレプチンの

発現又は分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害するか否かを評価することを含む、前記(8)又は(9)記載のスクリーニング方法、(14) 被験物質の存在下、レプチンを発現する細胞をインビトロで培養し、該細胞におけるレプチンの発現量又は分泌量を測定・評価

40 することを含む、前記(13)記載のスクリーニング方法、(15) 被験物質の存在下、レプチン受容体を発現する細胞をインビトロで培養し、該細胞におけるレプチン受容体の発現量を測定・評価することを含む、前記

(13)記載のスクリーニング方法、(16) 前記

(8)～(15)いずれか記載のスクリーニング方法により得られる自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤。

【0013】  
【発明の実施の形態】本発明においては、生体内のレプチンの作用を阻害することにより、自己免疫疾患の発症抑制、発症遅延、あるいは症状の軽減等の治療及び予防効果の得られることを明らかにした。従って本発明は、レプチン阻害剤を有効成分として含有する自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤を提供するものである。

【0014】ここで「レプチン」とは、obese遺伝子の発現産物を指し、その塩基配列及びアミノ酸配列は、Nature, 372, 425-432(1994)に記載されている。本発明において「レプチン阻害剤」とは、レプチンの作用を阻害する物質を指し、当該阻害作用を有する物質であれば、如何なる形態・性状の物質であっても本発明のレプチン阻害剤の範疇に含まれる。具体的には、1)レプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害する物質や、2)レプチンの発現又は分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害する物質などが、本発明のレプチン阻害剤として挙げられる。以下、当該レプチン阻害剤について具体的に説明する。

#### 【0015】1)レプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害する物質

本発明により、生体内のレプチン又はレプチン受容体を減少、又は欠損させた場合に、自己免疫疾患の発症の抑制されることが示された。また、抗レプチン抗体を投与してレプチンの作用を抑えることにより、自己免疫疾患の発症遅延効果が認められた。これらの知見により、レプチン受容体を介したレプチンの作用、すなわちレプチンのシグナル伝達経路を阻害する物質であれば、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤となり得ることが明らかとなった。ここでレプチンのシグナル伝達経路を阻害する物質としては、具体的に以下の(1)及び(2)の物質が例示される。

#### 【0016】(1)レプチン-レプチン受容体間の結合を阻害する物質

レプチンとレプチン受容体との結合を阻害することにより、レプチンの作用を阻害することができる。具体的には、レプチン受容体に結合することによりレプチン-レプチン受容体間の結合を阻害し、その結果、レプチンのシグナル伝達系を阻害する物質、及び、レプチンに直接結合してレプチン-レプチン受容体間の結合を阻害し、その結果、レプチンの作用を阻害する物質などが挙げられる。

【0017】ここで前記の具体例としては、レプチン受容体への結合ドメイン(J.Biol.Chem., 273, 35245-35249(1998))のみを有し、レプチンの機能を損なわせたレプチン改変体や、抗レプチン受容体抗体が挙げられる。ここで抗レプチン受容体抗体としては、具体的にはレプチン受容体の細胞外ドメイン(Nature, 395, 763-770(1998))に対する抗体などが挙げられる。これらの物質は、当業者に知られた手法により作製することが可能であり、例えばタンパクの改変については Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等の基本書を参考にして、また抗体の作製については Antibodies; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書を参考にして当業者ならば容易に作製することができる。

【0018】さらに前記の具体例として、レプチン受

容体に結合することによりレプチンのシグナル伝達系を阻害するタンパク性因子やペプチド、又は低分子化合物などが挙げられる。このうち、レプチンのレプチン受容体への結合ドメインをミミックしたペプチドや低分子化合物については、文献(Science, 249, 400-406(1990)、Science, 249, 386-390(1990)、US 4,833,092号公報)等を参考にして作製することができる。また、低分子化合物ライブラリー等を後述の本発明のスクリーニング系に供することによっても、前記阻害活性を有する物質を得ることができる。

【0019】また前記の具体例としては、レプチン受容体の細胞外ドメインを有する可溶性レプチン受容体や、抗レプチン抗体が挙げられる。ここで抗レプチン抗体としては、具体的にはレプチンのレプチン受容体への結合ドメイン(J.Biol.Chem., 273, 35245-35249(1998))に対する抗体が挙げられる。さらには、レプチンに結合することでレプチンの受容体への結合を阻害するタンパク性因子やペプチド、又は低分子化合物などが挙げられる。ここで可溶性受容体に関しては、TNFに対する可溶性受容体(可溶性TNF受容体)の投与により、実際に生体内でTNFの作用の阻害されたことが知られており(J.Immunol., 151, 6602-6607(1993))、本発明においても可溶性レプチン受容体が同様の阻害効果を有するものと考えられる。可溶性レプチン受容体の一例としては、レプチン受容体の細胞外ドメイン(リガンド結合ドメイン)のみを有するレプチン受容体アイソフォーム:Ob-Re(Nature, 395, 763-770(1998))などが具体的に挙げられる。なお、これらの各物質の作製及び入手方法については、前記を参照されたい。

#### 【0020】(2)レプチンの下流のシグナル伝達系に作用する物質

レプチンの下流のシグナル伝達に關与する幾つかの因子が同定されている(Nat.Genetics, 14, 95-97(1996)、Mol.Cell, 1, 619-625(1998)、J.Biol.Chem., 274, 30059-30065(1999))。これらのシグナル伝達関連因子の発現や作用を阻害又は促進することにより、結果的にレプチンの作用を阻害する物質も、本発明のレプチン阻害剤の範疇に含まれる。具体的には、例えばレプチン受容体のリン酸化を阻害するタンパク性因子やペプチド、低分子化合物や、レプチンの下流のシグナル伝達に關与することが知られているSTAT-3(Nat.Genetics, 14, 95-97(1996))の発現や作用を抑制するようなタンパク性因子やペプチド、低分子化合物、さらにはレプチンの下流のシグナル伝達を抑制することが知られているSOCS-3(Mol.Cell, 1, 619-625(1998)、J.Biol.Chem., 274, 30059-30065(1999))の発現や作用を促進するタンパク性因子やペプチド、又は低分子化合物などが挙げられる。これらの物質の作製及び入手法については、前記(1)のを参照されたい。

【0021】2)レプチンの発現又は分泌、あるいはレ

レプチン受容体の発現を阻害する物質

本発明において、レプチンやレプチン受容体の欠損に伴い、自己免疫疾患の発症の抑制効果が認められた。またレプチンの血中濃度の減少に伴い、自己免疫疾患の発症の遅延や症状の軽減等の効果が認められた。当該知見は、レプチンの発現や分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害する物質であれば、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤となることを十分に裏付けるものである。レプチン又はレプチン受容体の発現等を阻害する物質として、具体的に以下の(1)及び(2)の物質が例示される。

【0022】(1)レプチンの発現又は分泌を阻害する物質

レプチン遺伝子又はタンパクの発現、あるいはレプチンの分泌を阻害することにより、レプチンの作用を阻害することができる。具体的には、レプチン遺伝子(Nature, 372, 425-432(1994))に相補的なアンチセンスポリヌクレオチドが挙げられる。さらに、レプチン遺伝子やタンパクの発現、あるいはレプチンの分泌を阻害するタンパク性因子やペプチド、低分子化合物等が挙げられる。これらの物質の製造及び入手法については、前記1)の(1)を参照されたい。

【0023】(2)レプチン受容体の発現を阻害する物質

レプチン受容体の遺伝子又はタンパクの発現を阻害することにより、レプチンの作用を阻害することができる。具体的には、レプチン受容体遺伝子(Cell, 83, 1263-1271(1995))に相補的なアンチセンスポリヌクレオチドが挙げられる。さらに、レプチン受容体遺伝子やタンパクの発現を阻害するタンパク性因子やペプチド、低分子化合物等が挙げられる。これらの物質の製造及び入手法については、前記1)の(1)を参照されたい。

【0024】以上のようなレプチン阻害剤を有効成分として含有するものが、本発明の自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤である。ここで「自己免疫疾患」とは、自己の組織や細胞の抗原、すなわち自己抗原と反応する自己免疫現象が病因を形成する疾患であり、具体的には、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、全身性エリテマトーデスなどの疾患が挙げられる。本発明のレプチン阻害剤はこれら自己免疫疾患に適用可能であるが、好ましくは多発性硬化症に適用される。

【0025】本発明のレプチン阻害剤は、自己免疫疾患の発症遅延、発症抑制、及び症状軽減等の効果を有するものであるため、自己免疫疾患の治療及び予防のいずれにおいても用いることが可能である。

【0026】以下、本発明のレプチン阻害剤を有効成分とする自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤の投与方法、投与形態及び投与量等につき記述する。

【0027】1)レプチン阻害剤が低分子化合物、ペプチド又はタンパク性因子の形態である場合

レプチン阻害剤が低分子化合物やタンパク質、抗体、又はペプチドである場合は、通常知られている一般的な医薬組成物の形態とし、経口または非経口的に投与される。一般的には以下のような投与形態、投与方法が挙げられる。

【0028】すなわち、経口的に投与する場合、通常当分野で用いられる投与形態で投与することができる。非経口的に投与する場合には、局所投与剤(経皮剤等)、直腸投与剤、注射剤、経鼻剤等の投与形態で投与することができる。経口剤又は直腸投与剤としては、例えばカプセル、錠剤、ピル、散剤、ドロップ、座剤、液剤等が挙げられる。注射剤としては、例えば無菌の溶液又は懸濁液、乳剤等が挙げられ、具体的には水、水-プロピレングリコール溶液、緩衝化液、0.4%の生理食塩水等が挙げられる。さらに液状製剤とした場合は凍結保存、又は凍結乾燥等により水分を除去して保存することができる。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。局所投与剤としては、例えばクリーム、軟膏、ローション、経皮剤等が挙げられる。

【0029】以上の剤形は通常当分野で行われている手法により、薬学的に許容される賦形剤、添加剤と共に製剤化される。薬学的に許容される賦形剤、添加剤としては、担体、結合剤、香料、緩衝剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤、pH調節剤、張度調節剤、浸潤剤等が挙げられる。また、薬学的に許容される担体としては、例えば炭酸マグネシウム、ラクトース、ペクチン、澱粉、メチルセルロース等が挙げられる。

【0030】このような医薬組成物は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内などに投与するか、又は病変の認められる組織そのものに直接局所投与することができる。また経口投与や坐薬としての投与も可能である。

【0031】投与量、投与回数は症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、通常は成人に対し1日あたり約0.0001~約500mgの範囲、好ましくは約0.001~約100mgの範囲を1回または数回に分けて投与することができる。

【0032】2)レプチン阻害剤がポリヌクレオチドの形態である場合

レプチン阻害剤が、レプチンやレプチン受容体に相補的なアンチセンスポリヌクレオチド等のポリヌクレオチドである場合は、遺伝子治療剤の形態をとる必要がある。近年、種々の遺伝子を用いた遺伝子治療の報告がなされており、また当該遺伝子治療は技術的にも確立された技術となっている。当該遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与方法が詳しく解説

されている（別冊実験医学，遺伝子治療の基礎技術，羊土社，1996、別冊実験医学，遺伝子導入&発現解析実験法，羊土社，1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック，エヌ・ティー・エス，1999）。以下、具体的に説明する。

【0033】A．非ウイルスベクターを用いる場合慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入することができる。細胞への遺伝子導入法としては、リン酸-カルシウム共沈法や、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法などが挙げられる。

【0034】また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム（internal type liposome）による遺伝子導入法、静電気型リポソーム（electrostatic type liposome）による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法（HVJ-AVEリポソーム法）、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体（金属粒子）とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等の何れかの方法に供することにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

【0035】ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えばpCAGGS（Gene 108,193-200(1991)）や、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoSV（インビトロゲン社、ストラタジーン社）などが挙げられる。

【0036】B．ウイルスベクターを用いる場合ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等が挙げられる。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンピスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルス又はRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

【0037】本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入するin vivo法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すex vivo法がある（日経サイエンス，1994年4月号，20-45頁、月刊薬事，36(1)，23-48，1994、実験医学増

刊，12(15)，1994、日本遺伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック，エヌ・ティー・エス，1999）。本発明では、全身性自己免疫疾患の場合は特に、in vivo法が好ましい。in vivo法により投与する場合は、治療目的の疾患、標的臓器等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内などに投与するか、又は病変の認められる組織そのものに直接局所投与することができる。

【0038】製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態（例えば液剤など）をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤（PBS等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等）に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリポソーム製剤の形態とすることができる。また、疾患部位の周囲に遺伝子を存在し易くするために、徐放性の製剤（ミニペレット製剤等）を調製し患部近くに埋め込むことも可能であり、あるいはオスモチックポンプなどを用いて患部に連続的に徐々に投与することも可能である。

【0039】製剤中の遺伝子の含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、各々の遺伝子として0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

【0040】前記したように本発明においては、生体内のレプチンの作用を阻害することにより、自己免疫疾患の治療及び予防効果の得られることを初めて見出した。すなわち、レプチン阻害作用と自己免疫疾患との関連について初めて知見を得た。従って本発明は、当該新たな知見に基づき、レプチン阻害剤を探索することを指標とした、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法をも提供するものである。

【0041】本発明において「レプチン阻害剤の探索」とは、レプチン阻害作用を指標とした探索のみならず、レプチン-レプチン受容体間の結合阻害活性を指標とした探索なども含めて、レプチン阻害剤の候補物質の絞り込みを目的とするものである。また「自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法」とは、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤の選別を目的とするスクリーニング方法を指すものであり、自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤となり得る候補物質のスクリーニングをも含むものである。当該スクリーニングにより、前述のレプチン阻害作用に基づく自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤を選択することができる。以下、本発明のスクリーニング方法につき具体的に記述する。

【0042】本発明の自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法の1つの態様として、被験物質がレプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害するか否かを評価することを含むスクリーニング方法が挙げられる。当該スクリーニングにより、レプチンのシグナル伝達系を阻害する物質、すなわちレプチン及び/又はレプチン受容体に結合して、あるいは下流のシグナル伝達分子に作用して、レプチンの作用を阻害する物質を選択することができる。当該スクリーニング方法は当業者の常識の範囲で適宜構築することができる。以下、当該スクリーニングに用いられるスクリーニングツールにつ

【0043】当該スクリーニングに用いられる「レプチン受容体」は、天然物であっても組換え体であっても良い。また当該レプチン受容体はヒト型であることが好ましいが、マウス型など他の種由来のレプチン受容体も同様の目的に使用できる。レプチン受容体の塩基配列及びアミノ酸配列は、文献(Cell, 83, 1263-1271(1995))において公開されている。従って当該配列情報をもとに、適当なDNA部分をハイブリダイゼーションのプロープ又はPCRのプライマーとし、例えばヒト又は動物の視床下部由来のcDNAライブラリー等を用いることによりクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えば Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)などの基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。また、そのアミノ酸配列の一部が置換、欠失及び/又は付加されているものであっても、レプチンとの結合性が保たれている限り、本発明のレプチン受容体の範疇に含まれる。当該置換等の改変も、前記Molecular Cloning等に基づき容易に行う

【0044】前記スクリーニングに使用されるレプチン受容体は、必ずしもその全アミノ酸配列を保持する必要はなく、当該レプチン受容体の細胞外ドメインを少なくとも有していれば良い。本発明においては、このようなレプチン受容体の細胞外ドメインを少なくとも有するものを含めて「レプチン受容体」と称することとする。ここでレプチン受容体の「細胞外ドメイン」とは、レプチン受容体のアミノ酸配列の第1位～第840位までの部分(Cell, 83, 1263-1271(1995))、又はこの部分を含み前後10

【0045】以上のようにして得られたレプチン受容体のDNAからタンパクを発現させる手法としては、以下のような方法が挙げられる。すなわちまず、先に調製したレプチン受容体のcDNAを、pCAGGS (Gene 108, 193-199(1991))やpcDNA1.1、pcDNA3.1誘導体(インビトロジェン社)などの公知の発現ベクターに挿入する。その後適当

な宿主に導入し培養することにより、導入したレプチン受容体のDNAに対応するレプチン受容体のタンパク質を細胞表面に発現させた形質転換細胞を作製することができる。また用いたレプチン受容体のDNAの種類によっては(例えば細胞外ドメインのみをコードするDNAを用いた場合)、培養上清中に当該レプチン受容体タンパクを分泌させることができる。宿主としては、一般的に広く普及している哺乳動物細胞株であるL細胞、CHO細胞、C127細胞、BHK21細胞、BALB/c3T3細胞(ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む)や、COS細胞などが好ましいが、これに限定されることなく、昆虫細胞、酵母、細菌などを用いることも可能である。

【0046】前記レプチン受容体発現ベクターの宿主細胞への導入方法としては、公知の発現ベクターの宿主細胞への導入方法であればどのような導入方法でもよく、例えばリン酸カルシウム法(J. Virol., 52, 456-467 (1973))、LT-1 (Panvera社製)を用いる方法、遺伝子導入用リピッド(Lipofectamine、Lipofectin; Gibco-BRL社製)を用いる方法などが挙げられる。

【0047】以上のようにして得られた細胞表面にレプチン受容体を発現させた形質転換細胞は、後述のようにそのまま本発明のスクリーニング系に用いることができるが、当該形質転換細胞の細胞膜をスクリーニングに用いる場合は、例えば以下のようにして細胞膜を調製することができる。すなわちまず、細胞に低張ホモジネートバッファー(10 mMのトリス-塩酸緩衝液、1 mMのEDTA、0.5 mMのPMSF若しくは1 mMのAEBSF、5 µg/mlのアプロチニン、5 µg/mlのロイペプチン; pH 7.4)を添加し、4 で30分間程度静置して細胞を低張破壊した後、ピペティングでホモジナイズし、4 で50,000 × g、30分間遠心分離することにより、細胞膜画分の沈殿物を得る。そして、この沈殿物をトリス-塩酸緩衝生理食塩水(トリス-塩酸緩衝液、154 mMの塩化ナトリウム; pH 7.4)に懸濁することにより、本発明の細胞膜画分を得ることができる。その他、例えば F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179(1997))らの方法などにより、本発明の細胞膜画分を得ることができる。

【0048】さらに、後述するように単離したレプチン受容体そのものをスクリーニングに使用する場合もあり、その場合は、上記で得られた形質転換細胞又はその細胞膜画分から単離されたレプチン受容体を使用することができる。具体的には、例えば R. G. Shorrら(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2778-2782 (1982))、J. Biol. Chem. 257, 12341-12350(1982))などに記載の方法により、レプチン受容体を含む粗抽出液を得ることができ、また、該粗抽出液からレプチン受容体を精製する方法としては、例えばJ. L. Benovicら(Biochem., 23, 4510-4518 (1984))の方法などが挙げられる。

【0049】さらに、前記したようにレプチン受容体（例えばレプチン受容体の細胞外ドメイン）を形質転換細胞から分泌させた場合は、培養上清から、例えば抗レプチン受容体抗体を結合させたカラムを用いて、あるいはレプチン受容体の細胞外ドメインに通常のペプチドタグを付加した場合はこのタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いて、常法によりレプチン受容体を精製することができる。

【0050】本発明のスクリーニングに用いられる「レプチン」は、レプチン受容体と同様に天然物であっても組織換え体であっても良い。また当該レプチンはヒト型であることが好ましいが、マウス型など他の種由来のレプチンも同様の目的に使用できる。レプチンの塩基配列及びアミノ酸配列は、文献（Nature, 372, 425-432(1994)）において公開されている。従って当該配列情報をもとに、適当なDNA部分をハイブリダイゼーションのプロープ又はPCRのプライマーとし、例えばヒト又は動物の脂肪細胞由来のcDNAライブラリー等を用いることにより、常法によりクローニングすることができる。また、そのアミノ酸配列の一部が置換、欠失及び/又は付加されているものであっても、レプチン受容体との結合性が保たれている限り、本発明のレプチンの範疇に含まれる。これら遺伝子のクローニング及び改変等は、前述のMolecular Cloning等に基づき容易に行うことができる。

【0051】スクリーニングに使用されるレプチンは、必ずしもその全アミノ酸配列を保持する必要はなく、レプチン受容体への結合活性を少なくとも有していれば良い。本発明においては、このようなレプチン受容体への結合活性を少なくとも有するものを含めて「レプチン」と称することとする。

【0052】以上のようにして得られたレプチンのDNAからタンパクを発現させる手法としては、前記のレプチン受容体と同様の手法が用いられる。なおレプチンはテクネ社（ジェンザイム・テクネ）等から市販されているため、これらを直接スクリーニングに用いることもできる。

【0053】このようなスクリーニングツールを用いて、被験物質がレプチン受容体を介したレプチンの作用を阻害するか否かを評価するスクリーニング方法としては、当業者の常識の範囲より適宜選択されるが、一例としては、(i)レプチン受容体にレプチンを接触させた場合と、(ii)レプチン受容体にレプチン及び被験物質を接触させた場合とを比較・評価することを含むスクリーニング方法が挙げられる。そして、その具体的な態様として、以下の1)～3)の方法を例示することができる。

【0054】1)レプチン受容体を発現させた細胞を用いる方法  
レプチン受容体を細胞表面に発現させた細胞を用いて、本発明のスクリーニングを行うことができる。ここでレ

プチン受容体を細胞表面に発現させた細胞は、天然の細胞であっても、前記の記載に従いレプチン受容体のcDNAを導入し発現させた形質転換細胞であっても良い。当該細胞を用いて本発明のスクリーニングを行う手法としては、具体的には以下に例示される方法を挙げることができる。

【0055】まず、レプチン（テクネ社）を何らかの方法により標識する。標識としては、ビオチンによる標識、ラジオアイソトープ（<sup>125</sup>I）による標識、マーカートンパク質による標識、またはペプチドタグによる標識などが挙げられる。ここで「マーカートンパク質」とは、例えばアルカリフォスファターゼ（Cell 63, 185-194(1990)）、抗体のFc領域（Genbank accession number M87789）、HRPなどの従来よく知られたマーカートンパク質が挙げられる。また「ペプチドタグ」としては、例えばMycタグ（Glu-Gln-Lys-Lue-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Ile）、Hisタグ（His-His-His-His-His-His）、FLAGタグ（Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp）などの従来よく知られたペプチドタグが挙げられる。

【0056】他方、前記の記載に従いレプチン受容体タンパク質を細胞表面に発現した細胞を調製する。次にこの細胞に対して、(i)標識レプチンを添加した場合、及び(ii)標識レプチン及び被験物質を添加した場合の当該レプチンの細胞への結合性を、比較・検出する。(i)の場合と比して(ii)の場合の方が結合活性が低い、若しくは無い場合は、その被験物質がレプチン阻害剤の候補物質であることが示される。詳しくは実施例を参照されたい。

【0057】なお、このようなレプチン-レプチン受容体間の結合性を指標としたスクリーニング（すなわち被験物質がレプチン-レプチン受容体間の結合を阻害するか否かを評価するスクリーニング）は非常に簡便なスクリーニングであるが、当該スクリーニングによっては、レプチン阻害剤のみならず、レプチン受容体に結合してレプチンと同様の作用を示す物質等も選択されるため、当該スクリーニングによりレプチン阻害剤候補物質の選別を行った後、さらに別のレプチン阻害剤のスクリーニングを実施することが望ましい。

【0058】さらに、前記レプチンのレプチン受容体発現細胞への結合性を検出する代わりに、レプチン受容体の下流に位置するシグナル伝達物質の発現や作用に対する阻害又は促進活性を指標にすることや、レプチン受容体のリン酸化阻害活性を指標にすることも可能である。ここでレプチン受容体の下流に位置するシグナル伝達物質とは、例えばSTAT-3（Nat. Genetics, 14, 95-97(1996)）やSOCS-3（Mol. Cell, 1, 619-625(1998)、J. Biol. Chem., 274, 30059-30065(1999)）が例示される。しかしこれらに限定されるものではなく、レプチンとレプチン受容体との相互作用から生じるシグナルの有無を検出できる方法であれば特に制限されない。

【0059】2) レプチン受容体を発現させた細胞膜を用いる方法

前記のレプチン受容体を細胞表面に発現する細胞の代わりにその細胞より調製された細胞膜を用いても、前記1)と同様の手法により、本発明のスクリーニングを行うことができる。この場合は、レプチンのレプチン受容体への結合性が測定される。

【0060】3) 単離精製されたレプチン受容体を用いる方法

単離精製されたレプチン受容体を用いても、本発明のスクリーニングを行うことができる。この場合も、レプチンのレプチン受容体への結合性が測定される。

【0061】以上のようなスクリーニング方法により選別された被験物質を、さらに別のレプチン阻害剤のスクリーニング系に供することにより、あるいは自己免疫疾患の動物モデルを用いた *in vivo* 評価系に供することにより、最終的に、レプチン阻害作用を有する自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤を選択することができる。

【0062】本発明の自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤のスクリーニング方法の別の態様として、被験物質がレプチンの発現又は分泌、あるいはレプチン受容体の発現を阻害するか否かを評価することを含むスクリーニング方法が挙げられる。具体的に、被験物質がレプチンの発現又は分泌を阻害するか否かを評価する方法としては、被験物質の存在下、レプチンを発現する細胞をインビトロで培養し、該細胞におけるレプチンの発現量又は分泌量を測定・評価する手法が挙げられる。またレプチン受容体の発現を阻害するか否かを評価する方法としては、被験物質の存在下、レプチン受容体を発現する細胞をインビトロで培養し、該細胞におけるレプチン受容体の発現量を測定・評価する手法が挙げられる。ここで、レプチン及びレプチン受容体の発現量の測定とは、その遺伝子又はタンパクの発現量の測定を意味する。

【0063】前記においてレプチンの分泌量を測定・評価するスクリーニング方法としては、レプチン発現細胞（例えば脂肪細胞や、レプチンのcDNA発現ベクターを導入した形質転換細胞など）に対して被験物質を添加して一定期間培養した後、培養上清中に分泌されるレプチンのタンパク量を、被験物質無添加群と比較する方法が挙げられる。ここでレプチンのタンパク量は、抗レプチン抗体を用いて免疫化学的に検出することができる。

【0064】また、前記においてレプチン受容体の発現量を測定・評価するスクリーニング方法としては、レプチン受容体発現細胞を被験物質の存在下で培養し、一定時間培養後、細胞膜表面に発現されたレプチン受容体が減少したことを免疫化学的に検出して、あるいはmRNAの発現が減少したことを指標として評価することができる。このときのmRNAの検出方法は、DNAチップ、ノーザンハイブリダイゼーション等の方法で行うことができる。その他、レプチン受容体のプロモーターの下流

にルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をつないだ遺伝子を導入した細胞を用いることにより、被験物質によるレプチン受容体遺伝子の発現抑制を当該レポーター遺伝子の活性を指標に検出することができる。なお、レプチンの発現量の測定・評価も、同様の手法により行うことができる。

【0065】以上のような本発明のスクリーニング方法を用いて選択されたレプチン阻害剤は、前述の如き自己免疫疾患の治療及び/又は予防剤として使用され得る。特に、多発性硬化症の治療及び/又は予防剤として有効に使用され得る。

【0066】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0067】実施例1

絶食およびレプチンの投与が実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)発症に与える影響の検討

絶食およびレプチンの投与が自己免疫疾患の発症に与える影響を検討するため、ヒトの多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて検討を行なった。実験方法と結果を以下に示す。

【0068】実験に用いたPLSJLF1/JマウスはThe Jackson Laboratoryより購入した。マウスは5週齢で購入し、毎日午前8時から午後8時まで照明を点灯し、絶食期間中以外は水および固形飼料(CE-2)(日本クレア)を自由に摂取できるようにして飼育した。EAEの惹起は、このマウスにPBSに溶解した2mg/mlのウサギミエリン塩基性タンパク質(MBP)(シグマ社)と完全フロイントアジュバント(CFA)(ディフコ社)を1:1に混合したエマルジョンを、100 $\mu$ lずつ大腿部皮下に感作し、感作の直後および2日後に生理食塩水(大塚生食注)(大塚製薬)に溶解した200ngの百日咳毒素(リスト・バイオロジカル・ラボラトリーズ社)を腹腔内投与することによって行なった。

【0069】絶食および絶食中のレプチンの投与は以下の手順に従って行なった。EAEを惹起するためにMBPの感作と百日咳毒素の投与を行なったマウスを3群に分け、1群は対照群として飼料を自由に節取出来るようにした。残り2群のマウスは感作後8日目の午前8時から感作後10日目の午前8時までの48時間固形飼料を摂取できなくし、その期間中に1群は絶食前の体重1gあたり1 $\mu$ gの組換えマウスレプチン(テクネ社)を生理食塩水(大塚生食注)(大塚製薬)に溶解したもの(200 $\mu$ g/ml)を午前10時と午後7時の1日2回、腹腔内投与した。ここで用いた組み換えレプチンはエンドトキシンのレベルが1 $\mu$ gあたり0.1ng以下であることが確認されたものである。もう1群は対照として0.2mlの生理食塩水(大塚生食注)(大塚製薬)を同様に腹腔内投与した。すべてのマウスは水を自由に節取できるようにした。

【0070】免疫後毎日本体重の測定およびEAE症状の観察を行ない、以下に基づいてEAEの症状のスコアを記録した。0, 無症状; 1, 尾の麻痺; 2, 弱い後ろ足の麻痺; 3, 中程度から強度の後ろ足の麻痺あるいは弱い前足の麻痺、またはその両方; 4, 完全な後ろ足の麻痺あるいは中程度から強度の前足の麻痺、またはその両方; 5, 四肢の麻痺あるいは死戦期にある; 6, 死亡。結果を図1に示す。

【0071】絶食を行なったマウスでは、絶食を行なわなかったマウスと比較して、EAEスコアの平均の推移および発症率の推移の両方に関して絶食によってEAE発症の遅延効果がみられた。またEAE発症に伴って体重の減少がみられることが知られているが、EAE発症の遅延は体重の減少の遅延によっても確認された。絶食中のレプチンの投与の効果を検討したところ、絶食中のレプチンの投与によって絶食によるEAEの発症の遅延効果はみられなくなった。また体重の平均値の推移によっても絶食によるEAE発症の遅延、および絶食中のレプチン投与により絶食によるEAE発症の遅延効果が見られなくなることが確認された。

#### 【0072】実施例2

##### レプチン欠損マウスのEAE発症の検討

レプチンがEAE発症に及ぼす影響を検討するため、レプチンが欠損している変異マウスであるB6.V-Lep<sup>ob</sup>マウス(以前の名称はC57BL/6J-Lep<sup>ob</sup>) (以後obマウス)、および遺伝的背景が同一であるC57BL/6Jマウス(以後野性型マウス)のEAE発症を比較した。実験方法と結果を以下に示す。

【0073】実験に用いた野性型マウス、obマウスはThe Jackson Laboratoryより購入した。マウスは5週齢で購入し、毎日午前8時から午後8時まで照明を点灯し、水および固形飼料(CE-2)(日本クレア)を自由に摂取できるようにして飼育した。野性型マウス、obマウスのEAEの誘導は生理食塩水(大塚生食注)(大塚製薬)に溶解したミエリンオリゴデンドロサイトグリコプロテイン(MOG) 35-55合成ペプチド(アミノ酸配列はアミノ末端からMet-Glu-Val-Gly-Trp-Tyr-Arg-Ser-Pro-Phe-Ser-Arg-Val-Val-His-Leu-Tyr-Arg-Asn-Gly-Lys)(アコード社)の溶液(4mg/ml)とフロイントの完全アジュバント(ディフコ社)を1:1で混和してエマルジョンを作製し、100μlのエマルジョンをマウス大腿部皮下に感作し、感作の直後と2日後に200ngの百日咳毒素(リスト・バイオロジカル・ラボラトリーズ社)を腹腔内投与することによって行なった。感作したマウスは以後毎日、体重の測定とEAE症状の観察を行なった。EAE症状のスコア化はPLSJLF1/Jマウスと同じ方法によった。結果を図2に示す。

【0074】野性型マウスの発症率は感作後17日目の時点で100%となった(10匹のマウスを用いた実験の結果)。一方、obマウスは感作後30日を経過した時点での発症率が33%(9匹のマウスを用いた実験の結果)にとど

まった。また発症の見られたマウスに関しても発症に要した日数は野性型マウスに比べて長く、またそれぞれのマウスのEAEスコアの最大値の平均に関してもobマウスで低かった。この結果からレプチンを欠損したobマウスがEAEの発症に対して抵抗性であることが示された。

#### 【0075】実施例3

##### レプチンレセプター欠損マウスのEAE発症の検討

レプチンがEAE発症に及ぼす影響が、これまでに知られているレプチンレセプターを介した作用であるかを検討するため、レプチンレセプターを欠損している変異マウスであるB6.Cg-m +/- Lep<sup>db</sup>マウス(以前の名称はC57BL/6J-m +/- Lep<sup>db</sup>) (以後dbマウス)、および遺伝的背景が同一である野性型マウス(C57BL/6Jマウス、以後野性型マウス)のEAE発症を比較した。実験方法と結果を以下に示す。

【0076】実験に用いた野性型マウス、dbマウスはThe Jackson Laboratoryより購入した。マウスは5週齢で購入し、毎日午前8時から午後8時まで照明を点灯し、水および固形飼料(CE-2)(日本クレア)を自由に摂取できるようにして飼育した。野性型マウス、dbマウスのEAEの誘導はobマウスと同じ方法によって行なった。感作したマウスは以後毎日、体重の測定とEAE症状の観察を行なった。EAE症状のスコア化はPLSJLF1/Jマウスと同じ方法によった。結果を図3に示す。

【0077】野性型マウスの発症率は感作後25日目の時点で100%となった(8匹のマウスを用いた実験の結果)。一方、dbマウスは感作後30日を経過した時点で全く発症が見られなかった(発症率0%)(8匹のマウスを用いた実験の結果)。この結果からレプチンレセプターを欠損しているdbマウスがEAEの発症に対して抵抗性であることが示された。

#### 【0078】実施例4

##### 抗レプチン抗体の投与が実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症に与える影響の検討

抗レプチン抗体の投与が自己免疫疾患の発症に与える影響を検討するため、ヒトの多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いて検討を行なった。実験方法と結果を以下に示す。

【0079】実験に用いたPLSJLF1/JマウスはThe Jackson Laboratoryより購入した。マウスは5週齢で購入し、毎日午前8時から午後8時まで照明を点灯し、水および固形飼料(CE-2)(日本クレア)を自由に摂取できるようにして飼育した。EAEの惹起は、このマウスに生理食塩水(大塚生食注)(大塚製薬)に溶解した2mg/mlのウサギミエリン塩基性タンパク質(MBP)(シグマ社)と完全フロイントアジュバント(CFA)(ディフコ社)を1:1に混合したエマルジョンを、100μlずつ大腿部皮下に感作し、感作の直後および2日後に生理食塩水に溶解した200ngの百日咳毒素(リスト・バイオロジカル・ラボラトリーズ社)を腹腔内投与することによって行なった。

【0080】抗レプチン抗体の投与は以下の手順に従って行なった。EAEを惹起するためにMBPの感作と百日咳毒素の投与を行なったマウスを3群に分け(各々の群はそれぞれ5匹のマウスより成る)、1群はマウス1匹あたり30 $\mu$ gのヤギ抗レプチン抗体(米国ジェンザイム・テクネ)を生理食塩水に溶解したものを感作後8日目、10日目の2回、腹腔内に投与した(300 $\mu$ g/mlの溶液をマウス1匹あたり100 $\mu$ l投与した)。もう一群は対照として同量のヤギ抗体(米国ジェンザイム・テクネ)を同様に腹腔内に投与した。さらにもう一群は同量の生理食塩水(大塚製薬)を同様に腹腔内に投与した。すべてのマウスは全飼育期間を通じて飼料と水を自由に節取出来るようにした。

【0081】免疫後毎日体重の測定およびEAE症状の観察を行ない、以下に基づいてEAEの症状のスコアを記録した。0, 無症状; 1, 尾の麻痺; 2, 弱い後ろ足の麻痺; 3, 中程度から強度の後ろ足の麻痺あるいは弱い前足の麻痺、またはその両方; 4, 完全な後ろ足の麻痺あるいは中程度から強度の前足の麻痺、またはその両方; 5, 四肢の麻痺あるいは死戦期にある; 6, 死亡。結果を図4に示す。図中にはEAEスコアの平均値の推移を示した。抗レプチン抗体投与群では、コントロール抗体投与群、生理食塩水投与群と比較してEAEの発症の遅延が認められた。以上の結果より、レプチンの作用を阻害することによって、EAEの治療/予防効果の得られることが確認された。

#### 【0082】実施例5

##### レプチン受容体発現細胞を用いた自己免疫疾患治療剤のスクリーニング

レプチン受容体のcDNA(Cell, 83, 1263-1271(1995))を含有する発現ベクターを用いて、常法によりCHO細胞やCOS細胞を形質転換し、レプチン受容体を細胞表面に安定に発現する形質転換細胞を取得する。他方、レプチン(テクネ社)を常法によりピオチンやラジオアイソトープ( $^{125}$ I)などで標識する。次に、前記レプチン受容体発現細胞に対して、(i)標識レプチン、又は(i i)標識レプチン及び被験物質を添加し、これら(i)及び(i i)の場合における標識レプチンのレプチン受容体発現細胞への結合性を比較する。(i)の場合と比較して(i i)の場合のほうが結合性が低い、あるいは結合性が無い被験物質を、自己免疫疾患治療剤の候補物質として選択する。当該候補物質を、さらにレプチン阻害作用を検出する別のスクリーニング系や、EAEモデルに対する投与実験などに供することにより、前記候補物質が自己免疫疾患治療剤となり得ることが示される。

#### 【0083】実施例6

##### レプチン発現細胞を用いた自己免疫疾患治療剤のスクリーニング

レプチンを天然に発現している脂肪細胞に対し、(i)被験物質を添加した群と、(i i)被験物質を添加しな

い群を準備する。一定期間培養後、細胞を回収して常法により溶解し、ノーザンブロット解析によりレプチンmRNAの発現量を比較する。あるいは、細胞培養液を回収し、ウエスタンブロット解析により、分泌されたレプチンのタンパク量を比較する。これらのスクリーニングにより、(i i)の場合と比較して(i)の場合のほうがシグナルが弱い、あるいはシグナルが検出されない被験物質を、自己免疫疾患治療剤の候補物質として選択する。

#### 10 【0084】

【発明の効果】本発明により、レプチン阻害作用という従来にない性質を有する、新規な自己免疫疾患治療剤及び予防剤が提供される。さらに本発明により、レプチン阻害作用に着目した新規な自己免疫疾患治療剤及び予防剤のスクリーニング方法が提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、PLSJLF1マウスにMBPの感作と百日咳毒素の投与によりEAE発症を誘導し、絶食、および絶食中のレプチン投与のEAE発症に対する影響を検討した結果を示したグラフである。図中(A)の図ではEAEスコアの平均値の推移を示した。自由節食・生理食塩水投与群では感作後13日目にEAEスコアはピークに達した。一方絶食・生理食塩水投与群ではEAEスコアがピークに達したのは感作後15日目であり、絶食によりEAEの発症が遅延する傾向が見られた。絶食時に血中のレプチンのレベルが低下することが知られているため、絶食によるEAE発症に対するレプチンの関与を検討するため、絶食中にレプチンを投与し、EAEの発症に与える影響を検討した。絶食・レプチン投与群ではEAEスコアがピークに達したのは自由節食・生理食塩水投与群と同じく感作後13日目であり、絶食によるEAE発症の遅延がレプチン投与により絶食を行なわない場合と同様の発症を示し、レプチンがEAEの発症に関与することが示された。図中(B)の図では発症率の推移を示した。スコアの平均値の推移と同様に、絶食によってEAEの発症が遅延すること、絶食中のレプチンの投与によりEAEの発症は絶食を行なわない場合と同様になることが確認され、レプチンがEAEの発症に関与することが示された。図中(C)の図では体重の平均値の推移を示した。EAEの発症に伴って体重の減少が見られることが知られているが、EAEスコアの平均値の推移、発症率の推移を示した図と同様に、絶食によってEAEの発症が遅延すること、絶食中のレプチンの投与によりEAEの発症は絶食を行なわない場合と同様になることが確認され、レプチンがEAEの発症に関与することが示された。

【図2】図2は、obマウスおよび対照の野性型マウスにMOGペプチドの感作と百日咳毒素の投与によりEAE発症を誘導し、経過を観察した結果を示したグラフである。図中(A)の図ではEAEスコアの平均値の推移を示した。野性型マウスでは感作後9日目からEAE発症がみられ始め、17

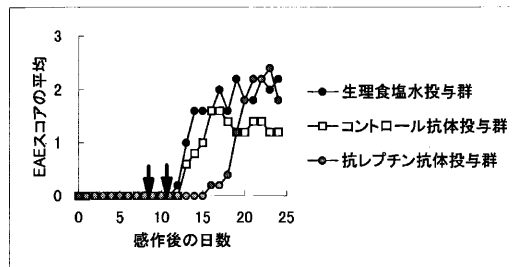
-18日目に平均スコアが最大の3.2になった。その後寛解期となって平均スコアは低下し、感作後22日目以後は平均スコアは約2.3前後でほぼ一定となった。一方obマウスではEAEの発症は感作後20日目までは全く見られず、平均スコアは観察期間中最大でも0.3(感作後24日目)であり、野生型マウスと比較して活性型レプチンを産生できないlobマウスのEAE発症は著しく弱いことが示された。図中(B)の図では発症率の推移を示した。野生型マウスでは感作後8日目からEAE発症がみられ始め、17日目に感作したすべてのマウスがEAEを発症した(発症率100%)。一方obマウスでは感作後18日目まではEAEの発症は全く見られず、観察を終了した感作後30日目でも発症率は33%であり、野生型マウスと比較してobマウスではEAEの発症率が低く、さらにEAEを発症したマウスに関しても発症は遅延することが示された。図中(C)の図ではEAEを誘導した野生型マウスの体重の平均値の推移を示した。EAEの発症にともなって体重が減少することが知られているが、感作後10日目以後のEAEの発症が体重の減少によっても確認された。図中(D)の図ではEAEを誘導したobマウスの体重の平均値の推移を示した。観察期間中を通じて体重の平均値の大きな減少はみられず、obマウスのEAE発症が野生型マウスと比較して著しく弱いことが、体重の推移によっても確認された。

【図3】図3は、dbマウスおよび対照の野生型マウスにMOGペプチドの感作と百日咳毒素の投与によりEAE発症を誘導し、経過を観察した結果を示したグラフである。図中(A)の図ではEAEスコアの平均値の推移を示した。野生型マウスでは感作後8日目からEAE発症がみられ始め、15日目に平均スコアが最大の3.0になった。その後寛解期となって平均スコアは低下し、感作後20日目以後は平均スコアは約2前後でほぼ一定となった。一方dbマウスで \*

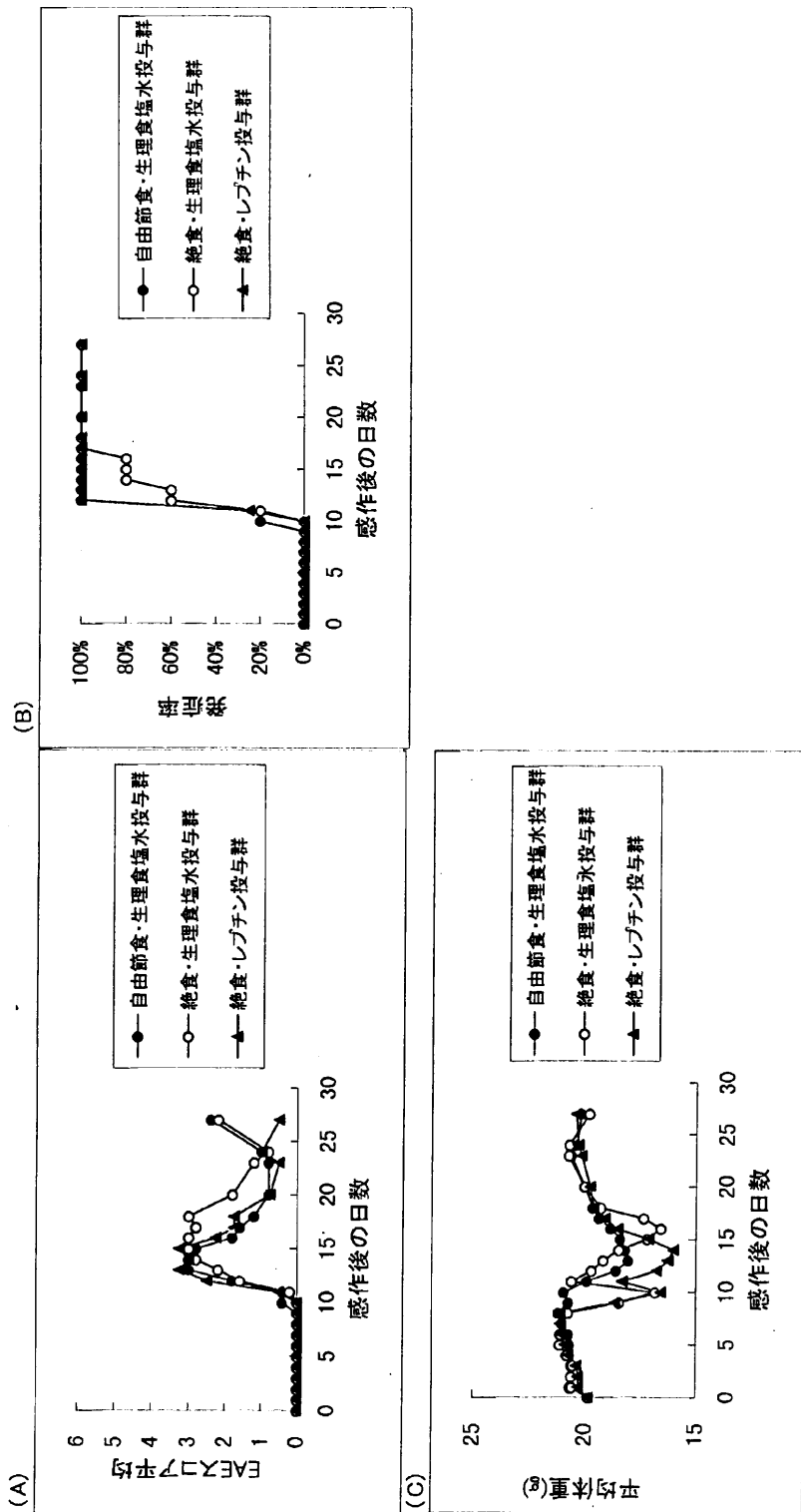
\*はEAEの発症は観察した期間(30日間)中全く見られず、野生型マウスと比較して活性型レプチンレセプターを産生できないdbマウスのEAE発症は著しく弱いことが示された。図中(B)の図では発症率の推移を示した。野生型マウスでは感作後7日目からEAE発症がみられ始め、感作後13日目には88%のマウスがEAEを発症した。感作後25日目には感作したすべてのマウスがEAEを発症した(発症率100%)。一方dbマウスでは感作を続けた30日の間にEAEの発症は全く見られず、野生型マウスと比較してdbマウスではEAEの発症率が低く、さらにEAEを発症したマウスに関しても発症は遅延することが示された。図中(C)の図ではEAEを誘導した野生型マウスの体重の平均値の推移を示した。EAEの発症にともなって体重が減少することが知られているが、感作後10日目以後のEAEの発症が体重の減少によっても確認された。図中(D)の図ではEAEを誘導したdbマウスの体重の平均値の推移を示した。観察期間中を通じて体重の平均値の大きな減少はみられず、dbマウスのEAE発症が野生型マウスと比較して著しく弱いことが、体重の推移によっても確認された。

【図4】図4は、PLSJLF1マウスにMBPの感作と百日咳毒素の投与によりEAE発症を誘導し、抗レプチン抗体投与のEAE発症に対する影響を検討した結果を示したグラフである。抗レプチン抗体、コントロール抗体または生理食塩水を投与した日を矢印で示した。図中にはEAEスコアの平均の推移を示した。コントロール抗体を投与した群、および生理食塩水を投与した群ではそれぞれ感作後12日目、13日目にEAEの発症が始まり、それぞれ感作後14日目、16日目には平均スコアが1.8に達した。一方抗レプチン抗体投与群では感作後15日目まで発症が認められなかった。

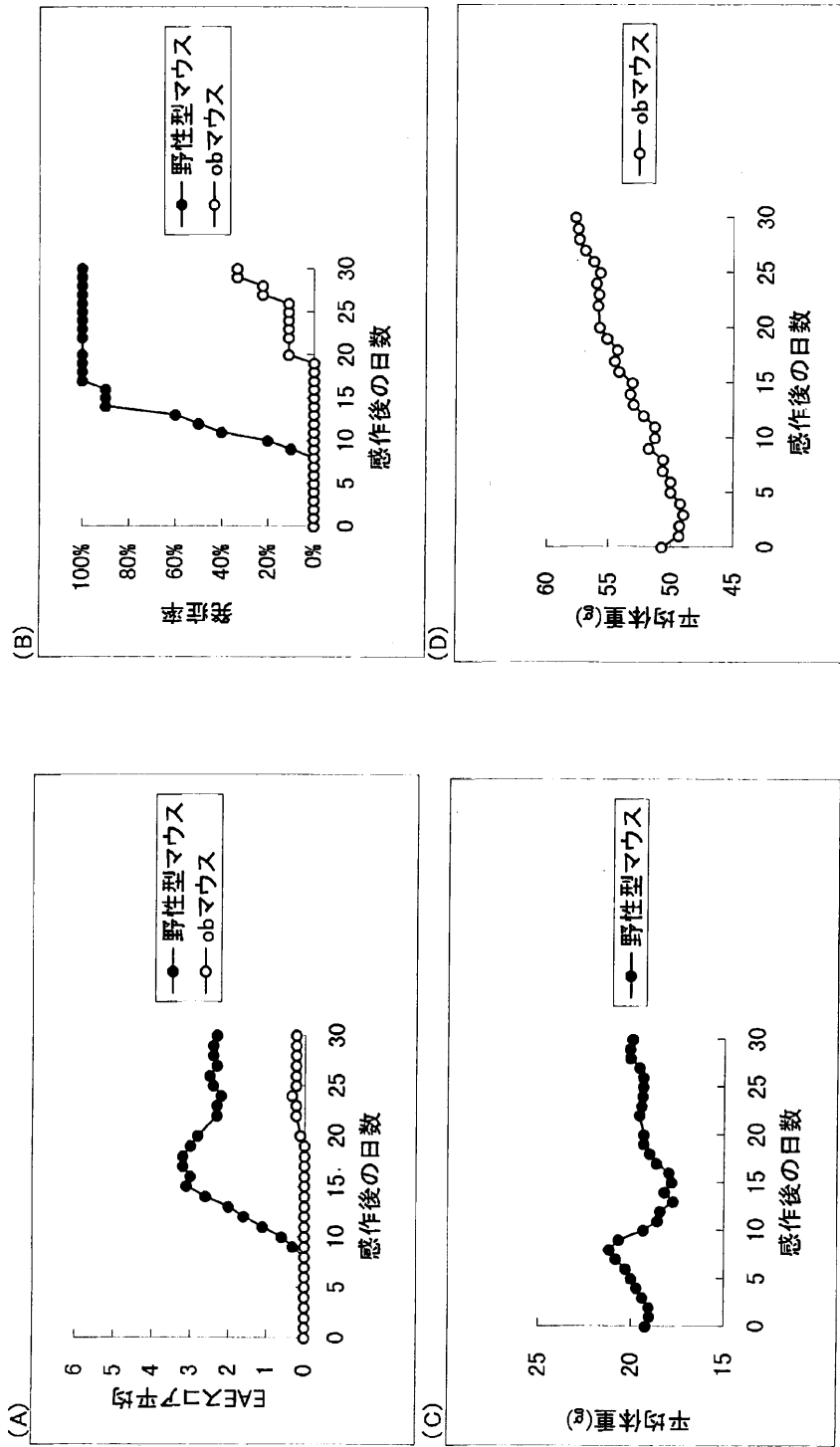
【図4】



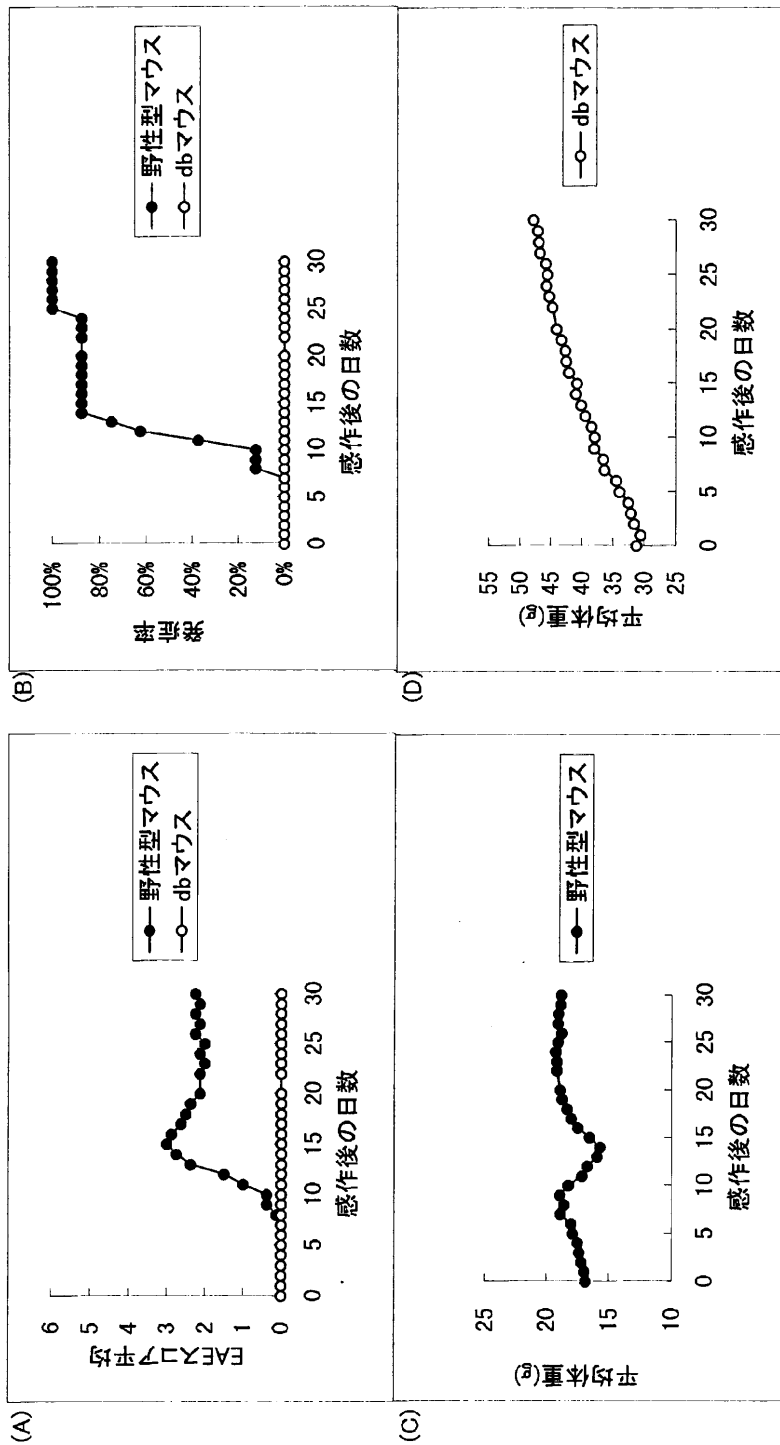
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/02  
 G 0 1 N 33/15  
 33/50

識別記号

F I

G 0 1 N 33/15  
 33/50  
 33/53

テ-マコード(参考)

Z  
 Z  
 F

	33/53			33/566		
	33/566			C 1 2 Q	1/68	A
//	C 1 2 N	15/09	Z N A	G 0 1 N	33/564	Z
	C 1 2 Q	1/68		A 6 1 K	37/02	
	G 0 1 N	33/564		C 1 2 N	15/00	Z N A A

Fターム(参考) 2G045 AA40 FB02 FB03  
 4B024 AA01 AA11 BA63 BA80 CA04  
 DA02 EA04 GA11 HA14 HA15  
 4B063 QA01 QA20 QQ08 QQ13 QQ53  
 QR08 QR33 QR35 QR42 QR56  
 QS25 QS34 QX02 QX07  
 4C084 AA02 AA17 DB63 ZA022  
 ZB072  
 4C085 AA13 BB07 DD88

专利名称(译)	用于靶向瘦蛋白的自身免疫疾病的新型治疗剂		
公开(公告)号	<a href="#">JP2002201142A</a>	公开(公告)日	2002-07-16
申请号	JP2001046046	申请日	2001-02-22
申请(专利权)人(译)	住友制药有限公司		
[标]发明人	生嶋秀人		
发明人	生嶋 秀人		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P25/00 A61P37/02 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/564 G01N33/566		
FI分类号	A61K45/00 A61K39/395.D A61P25/00 A61P37/02 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.F G01N33/566 C12Q1/68.A G01N33/564.Z A61K37/02 C12N15/00.ZNA.A A61K38/00 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA20 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/DB63 4C084/ZA022 4C084/ZB072 4C085/AA13 4C085/BB07 4C085/DD88		
代理人(译)	中村俊夫		
优先权	2000323985 2000-10-24 JP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种用于自身免疫疾病的新型治疗和/或预防剂，以及寻找该治疗和/或预防剂的筛选方法。 解决方案：含有瘦素抑制剂作为有效成分的自身免疫性疾病的治疗和/或预防剂，自身免疫性疾病的治疗和/或预防剂的筛选方法，是寻找瘦素抑制剂的指标，通过筛选方法获得的自身免疫性疾病的治疗剂和/或预防剂。

