

(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2003 - 274956

(P2003 - 274956A)

(43)公開日 平成15年9月30日(2003.9.30)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 9/10	4 B 0 2 4
A 6 1 P 9/10		C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/02		1/44	4 C 0 8 4
1/44		1/48	Z

審査請求 未請求 請求項の数 30 O L (全 20数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2003 - 10495(P2003 - 10495)

(22)出願日 平成15年1月20日(2003.1.20)

(31)優先権主張番号 特願2002 - 12216(P2002 - 12216)

(32)優先日 平成14年1月21日(2002.1.21)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 布施 広光

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日

ハイツ1404号

(72)発明者 谷山 佳央

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日

ハイツ501号

(72)発明者 里見 朋子

大阪府高槻市日吉台一番町10 - 24

(74)代理人 100114041

弁理士 高橋 秀一 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 動脈硬化予防・治療薬のスクリーニング方法

(57)【要約】

【課題】動脈硬化予防・治療薬のスクリーニング方法の提供。

【解決手段】動脈硬化関連遺伝子を用いることを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、当該スクリーニング用キット、当該スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩、当該化合物またはその塩を含有してなる動脈硬化予防・治療剤など。

【特許請求の範囲】

【請求項1】動脈硬化関連遺伝子を用いることを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項2】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項3】発現変動が発現低下である請求項1または2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】動脈硬化関連遺伝子がレシチン：コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ遺伝子である請求項1～3記載のスクリーニング方法。

【請求項5】修飾LDLが酸化LDLまたは糖化LDLである請求項1～4記載のスクリーニング方法。

【請求項6】修飾LDLが酸化LDLである請求項1～4記載のスクリーニング方法。

【請求項7】酸化LDLが二価の金属イオンで酸化されたLDLである請求項6記載のスクリーニング方法。

【請求項8】二価金属イオンが銅である請求項7記載のスクリーニング方法。

【請求項9】酸化LDLが哺乳動物由来の細胞との接触により酸化されたLDLである請求項6記載のスクリーニング方法。

【請求項10】酸化LDLが二価の金属イオンおよび哺乳動物由来の細胞との接触により酸化されたLDLである請求項6記載のスクリーニング方法。

【請求項11】酸化LDLが哺乳動物由来の酸化酵素との接触により酸化されたLDLである請求項6記載のスクリーニング方法。

【請求項12】酸化酵素がリポキシゲナーゼである請求項11記載のスクリーニング方法。

【請求項13】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞が哺乳動物由来の細胞である請求項2記載のスクリーニング方法。

【請求項14】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞が哺乳動物由来の末梢血由来単球マクロファージ、哺乳動物由来の腹腔マクロファージ、哺乳動物由来の肺胞マクロファージ、哺乳動物由来の大動脈マクロファージ、哺乳動物由来の平滑筋細胞、哺乳動物由来の内皮細胞、哺乳動物由来の線維芽細胞、哺乳動物由来の肝細胞、哺乳動物由来の樹状細胞株、THP-1(ヒト)、U937(ヒト)、HepG2(ヒト)、J774A.1(マウス)、L-1(マウス)、RAW264.7(マウス)、WEHI(マウス)またはP388D1(マウス)である請求項2記載のスクリーニング方

法。

【請求項15】酸化LDLに含まれる低分子化合物が酸化コレステロール類、リゾリン脂質類、セラミド類およびスフィンゴミエリン類から選ばれる少なくとも1種である請求項1～14記載のスクリーニング方法。

【請求項16】酸化コレステロール類が25-ヒドロキシコレステロールまたは7-ケトコレステロールである請求項15記載のスクリーニング方法。

【請求項17】修飾LDLが糖化LDLである請求項1～4記載のスクリーニング方法。

【請求項18】糖化LDLがグルコースとの接触で糖化されたLDLである請求項17のスクリーニング方法。

【請求項19】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、当該動脈硬化関連遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれの場合における動脈硬化関連タンパク質をコードするmRNAの量を測定することを特徴とする請求項1～18記載のスクリーニング方法。

【請求項20】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、それぞれの場合における細胞内動脈硬化関連タンパク質または分泌された動脈硬化関連タンパク質の量を測定することを特徴とする請求項1～18記載のスクリーニング方法。

【請求項21】細胞内動脈硬化関連タンパク質または分泌された動脈硬化関連タンパク質の量を免疫学的測定法で測定する請求項20記載のスクリーニング方法。

【請求項22】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、それぞれの場合における動脈硬化関連タンパク質の活性を測定することを特徴とする請求項1～18記載のスクリーニング方法。

【請求項23】動脈硬化関連遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの場合における該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする修飾LDLまたは修飾LDLに含有される低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項24】動脈硬化関連遺伝子を含有することを特

徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項25】動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を含有することを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項26】動脈硬化関連遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞を含有することを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項27】請求項1～23のいずれかに記載のスクリーニング方法または請求項24～26のいずれかに記載のスクリーニング用キットを用いて得られる当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩。

【請求項28】請求項27記載の化合物またはその塩を含有してなる動脈硬化予防・治療剤。

【請求項29】哺乳動物に対して、請求項27記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法。

【請求項30】動脈硬化予防・治療剤を製造するための請求項27記載の化合物またはその塩の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動脈硬化抑制薬または退縮薬として有用な化合物の探索法、さらに詳しくは、死亡原因の最上位を占める狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患や脳梗塞の主要な原因となっている動脈硬化を予防・治療する化合物またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩、および該化合物の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】死亡原因の最上位を占める虚血性心疾患や脳血管障害などの虚血性臓器疾患発症の基礎には粥状動脈硬化の存在が重要である。動脈硬化病変の病理形態学的特徴は、内皮下にコレステロールエステルを蓄積した主にマクロファージからなる細胞（泡沫化細胞）が集積した脂肪線条（fatty streak）、さらに進行した状態である、平滑筋細胞、マクロファージ、T細胞などの浸潤と細胞壊死像と脂質蓄積が認められる繊維性硬斑（fibrous plaque）である。脂質蓄積した部位は構造的脆弱性を示し、血行力学的な力が引き金となり硬斑が破綻し（plaque rupture）、組織因子と血液凝固系因子との反

応により急激に血栓が形成する。冠動脈で硬斑が破綻し血栓性閉塞が起きることが急性心筋梗塞、不安定狭心症、心臓性突然死などのいわゆる急性冠症候群（acute coronary syndrome）の発症に密接に関係する事が明らかにされてきている（非特許文献1）。急性冠症候群発症の最も重要な危険因子は、いくつかの大規模疫学的調査（4S study, CARE studyなど）により、血清コレステロール値、特に低密度リポタンパク質-コレステロール値（LDL-C）であることが示されており、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチン系薬剤による血清コレステロール低下療法が心疾患イベントの発症率を低下させたエビデンスは危険因子としてのLDLの妥当性を証明するものである。細胞生物学的検討からマクロファージ細胞は血中の主要脂質担体であるLDLが修飾を受けた酸化LDLをスカベンジャー受容体ファミリーと呼ばれる受容体により細胞内に取り込むことが明らかとなった。この受容体は細胞内コレステロール量によるネガティブフィードバックを受けず、マクロファージはこの受容体を介して過剰の酸化LDLを取り込んで泡沫化細胞となる。高コレステロール血症患者では高LDL血症を示し、またLDLの易酸化性等が報告されている点、近年、酸化LDLの特異的抗体を用いた血中酸化LDLの定量系開発が行われ、心疾患のリスクが高い患者群での血中濃度が上昇し、さらに病変部位での酸化LDL陽性マクロファージ細胞数が増加しており（非特許文献2）、酸化LDLによるマクロファージの泡沫化を機序とした粥状動脈硬化病変形成が生体レベルで起きていることが強く示唆されてきた。酸化LDLはマクロファージ細胞を泡沫化させるだけではなく、血管内皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ細胞に対して、粥状動脈硬化動脈硬化惹起性の作用を示す。つまり、血管内皮細胞においては、ICAM-1やVCAM-1などの接着分子の発現誘導による単球の内皮下への浸潤の促進（非特許文献3）、平滑筋細胞においては、遊走、増殖による内膜肥厚の促進（非特許文献4）、マクロファージ細胞においては、TNF- α やIL-1などの炎症性サイトカインの発現誘導による内皮細胞、平滑筋細胞への傷害、それに続くそれら細胞の動脈硬化惹起性反応である（非特許文献5）。糖化LDLは後期反応生成物（AGE）のひとつでありヒト循環血中において高脂血症および糖尿病の患者で増加している生体内物質である（非特許文献6）。AGEと動脈硬化との関連性については、AGE受容体（RAGE）の細胞外AGE結合領域をApoE欠損マウスに投与することで動脈硬化病変形成を抑制した報告がある（非特許文献7）。AGEが動脈硬化惹起性である原因はいくつか想定されており、ヒト内皮細胞においてNF- κ Bの活性化、p21ras、MAPキナーゼおよびCD44/racを活性化することが報告されており（非特許文献8）、糖化LDLにおいても同様なシグナル伝達経路が活性化していることが報告されている（非特許文

献9)。つまり、糖化LDLはその受容体(RAGE)をトランスミッターとしてNF- κ Bなどの活性化を行い、炎症反応を惹起すると考えられる。また、内皮下の細胞外マトリックスにAGEの集積が観察されていることから、内皮下に浸透したLDLと架橋を形成し沈着すると考えられる(非特許文献10)。さらにマクロファージ(M ϕ)細胞においてAGEによりフリーラジカルの生成が起こるとの報告から(非特許文献11)、沈着した糖化LDLはM ϕ 細胞により酸化変成を受けスカベンジャーレセプター経路で取り込まれ動脈硬化形成に促進的に働くことが予想される。

【0003】

【非特許文献1】Fuster V et al., N. Engl. J. Med., 326, pp242-250, 1992

【非特許文献2】Ehara S et al., Circulation, 103, pp1955-1960, 2001

【非特許文献3】Khan BV et al., J Clin Invest, 95, pp1262-1270, 1995

【非特許文献4】森 聖二郎、Mebio, Vol.16 No.10, pp40-45, 1999

【非特許文献5】千葉等、Mebio, Vol.16 No.10, pp46-50, 1999

【非特許文献6】Akanji A0等、Clin.Chim.Acta., 317, pp171-176, 2002

【非特許文献7】Park L.等、Nat.Med., 4, pp1025-1031, 1998

【非特許文献8】Schmidt AM 等、Trends Endocrinol Metab, 11, pp368-375, 2000

【非特許文献9】Maria F. B. et al., Diabetes, 51, pp3311-3317, 2002

【非特許文献10】Browenlee M 等、Diabetes, 34, pp938-941, 1985

【非特許文献11】Schmidt AM.等、Diabetes, 45, pp77-88, 1996

【0004】

【発明が解決しようとする課題】酸化LDLの生理作用を抑制または阻害する薬剤は、粥状動脈硬化病変形成に伴う一連の細胞性傷害反応を断ち、その結果、病変形成抑制および病変部の安定化を機序とした、急性冠症候群発症予防や再発防止が期待できる新規な動脈硬化治療薬として有効であると考えられる。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意努力した結果、酸化LDLで発現変動する遺伝子の中に動脈硬化発症に関わる遺伝子(動脈硬化関連遺伝子)、例えば、LLPLは酸化LDLにより発現低下する遺伝子であり、LLPL-ノックアウトマウスは高脂血症を起こす遺伝子改変マウス、例えばアポリポロタンE(ApoE)-ノックアウトマウスとのダブルノックアウトマウスにおいて動脈硬化病変形

成が進行することから、動脈硬化形成に対して防御的に働くことを見出した(特願2001-152520号、特願2001-311971号、特願2002-145876号およびPCT/JP02/04876)。本発明者らは、これらの知見に基づいて、酸化LDLによるLLPLの発現低下を抑制する化合物は、動脈硬化形成を抑制する可能性があり、ひいては酸化LDLあるいは糖化LDLなどの修飾LDLによる動脈硬化関連遺伝子の変動を抑制する化合物は動脈硬化予防・治療薬となる可能性があると考え、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、(1)動脈硬化関連遺伝子を用いることを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(2)動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(3)発現変動が発現低下である上記(1)または(2)記載のスクリーニング方法、(4)動脈硬化関連遺伝子がレシチン:コレステロールアシルトランスフェラーゼ様リゾホスホリパーゼ遺伝子である上記(1)~(3)記載のスクリーニング方法、(5)修飾LDLが酸化LDLまたは糖化LDLである上記(1)~(4)記載のスクリーニング方法、(6)修飾LDLが酸化LDLである上記(1)~(4)記載のスクリーニング方法、(6a)修飾LDLが糖化LDLである上記(1)~(4)記載のスクリーニング方法、(6b)糖化LDLがグルコースとの接触で糖化されたLDLである上記(6a)記載のスクリーニング方法、(7)酸化LDLが二価の金属イオンで酸化されたLDLである上記(6)記載のスクリーニング方法、(8)二価金属イオンが銅である上記(7)記載のスクリーニング方法、(9)酸化LDLが哺乳動物由来の細胞との接触により酸化されたLDLである上記(6)記載のスクリーニング方法、(10)酸化LDLが二価の金属イオンおよび哺乳動物由来の細胞との接触により酸化されたLDLである上記(6)記載のスクリーニング方法、(11)酸化LDLが哺乳動物由来の酸化酵素との接触により酸化されたLDLである上記(6)記載のスクリーニング方法、(12)酸化酵素がリポキシゲナーゼである上記(11)記載のスクリーニング方法、(13)動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞が哺乳動物由来の細胞である上記(2)記載のスクリーニング方法、(14)動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞が哺乳動物由来の末梢血由来単球マクロファージ、哺乳動物由来の腹腔マクロファージ、哺乳動物由来の肺胞マクロファージ、哺乳動物由来の

乳動物由来の大動脈マクロファージ、哺乳動物由来の平滑筋細胞、哺乳動物由来の内皮細胞、哺乳動物由来の線維芽細胞、哺乳動物由来の肝細胞、哺乳動物由来の樹状細胞株、THP-1 (ヒト)、U937 (ヒト)、He p G 2 (ヒト)、J 7 7 4 A . 1 (マウス)、L - 1 (マウス)、RAW 2 6 4 . 7 (マウス)、WEHI (マウス) または P 3 8 8 D 1 (マウス) である上記 (2) 記載のスクリーニング方法、(1 5) 酸化LDL に含まれる低分子化合物が酸化コレステロール類、リゾリン脂質類、セラミド類およびスフィンゴミエリン類から選ばれる少なくとも1種以上である上記 (1) ~ (1 4) 記載のスクリーニング方法、(1 6) 酸化コレステロール類が25-ヒドロキシコレステロールまたは7-ケトコレステロールである上記 (1 5) 記載のスクリーニング方法、(1 7) 動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDL または修飾LDL に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、当該動脈硬化関連遺伝子DNAもしくはその相補DNA またはその部分DNA を用いてそれぞれの場合における動脈硬化関連タンパク質をコードするmRNAの量を測定することを特徴とする上記 (1) ~ (1 6) 記載のスクリーニング方法、(1 8) 動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDL または修飾LDL に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、それぞれの場合における細胞内動脈硬化関連タンパク質または分泌された動脈硬化関連タンパク質の量を測定することを特徴とする上記 (1) ~ (1 6) 記載のスクリーニング方法、(1 9) 細胞内動脈硬化関連タンパク質または分泌された動脈硬化関連タンパク質の量を免疫学的測定法で測定する上記 (1 8) 記載のスクリーニング方法、(2 0) 動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDL または修飾LDL に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、それぞれの場合における動脈硬化関連タンパク質の活性を測定することを特徴とする上記 (1) ~ (1 6) 記載のスクリーニング方法、(2 1) 動脈硬化関連遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNA で形質転換した細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDL または修飾LDL に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの場合における該レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする修飾LDL または修飾LDL に含有される低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(2 2) 動脈硬化関連遺伝子を含有することを特徴とする、修飾LDL または修飾LD

L に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(2 3) 動脈硬化関連遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を含有することを特徴とする、修飾LDL または修飾LDL に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(2 4) 動脈硬化関連遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNA で形質転換した細胞を含有することを特徴とする、修飾LDL または修飾LDL に含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(2 5) 上記 (1) ~ (2 1) のいずれかに記載のスクリーニング方法または上記 (2 2) ~ (2 4) のいずれかに記載のスクリーニング用キットを用いて得られる当該動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩、(2 6) 上記 (2 5) 記載の化合物またはその塩を含有してなる動脈硬化予防・治療剤、(2 7) 哺乳動物に対して、上記 (2 5) 記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする動脈硬化の予防・治療方法、(2 8) 動脈硬化予防・治療剤を製造するための上記 (2 5) 記載の化合物またはその塩の使用などを提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】本願明細書において、動脈硬化関連遺伝子 (Atherosclerosis Related 遺伝子: AR 遺伝子) とは、動脈硬化発症に関連する遺伝子を示す。例えば、ICAM-1、VCAM-1などの単球が内皮下に浸潤するために必要な接着分子 (Kume N et al., J Clin Invest, 90, pp1138-1144, 1992)、HB-EGF (Nishi et al., Circ Res, 80, pp668-644, 1997)、PDGF (Ochi et al., Circ Res, 77, pp530-535, 1995)、M-CSFおよびGM-CSF (Rajavashisth TB et al., Nature, 344, pp254-257, 1990) などの増殖因子、MCP-1などの遊走因子 (Yla-Herttuala et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 88, pp5252-5256, 1991)、IL-1、TNF- などの炎症性サイトカイン (Tipping PG et al., Am J Pathol, 142, pp1721-1728, 1993)、細胞間基質を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) (Galis ZS et al., Ann N Y Acad Sci, 748, pp501-507, 1995)、スカベンジャーレセプターA-1 (SRA-1) (Kodama T et al., Nature, 343, pp531-535, 1990)、CD-36 (Nicholson AC et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15, pp269-275, 1995)、LOX-1 (Hoshikawa H et al., Biochem Biophys Res Commun, 245, pp841-846, 1998) などの酸化LDL 受容体ファミリーなどを示す。さらに、AR 遺伝子は、上記の遺伝子産物に限定するものではなく、(1) 文献、特許情報で公知な遺伝子、(2) 上記遺伝子産物以外に生理

機能が未知であるが動脈硬化形成に関与することが報告されているLLPL (Taniyama; バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 257: 50-56 (1999)) などのAR遺伝子、(3) 将来見出される新規なAR遺伝子なども該当する。マウスLLPLのアミノ酸配列を配列番号: 1に、そのDNA塩基配列を配列番号: 2に示す。また、ヒトLLPLのアミノ酸配列を配列番号: 3に、そのDNA塩基配列を配列番号: 4に示す。より好ましくは、AR遺伝子としては、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスにおいて、動脈硬化病変形成に関与することが示された遺伝子、あるいは細胞生物学的に証明された病変形成に関わる内皮細胞、平滑筋細胞あるいはマクロファージ細胞における動脈硬化病変形成の機能に関与する遺伝子が用いられる。また、本発明で用いられるAR遺伝子は、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によって発現変動を受ける遺伝子である。発現変動には発現の増加と低下が含まれるが、本発明では修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によって発現が低下する遺伝子が好ましく用いられる。修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によって発現が低下する遺伝子としては、前記したLLPLなどが用いられる。本願明細書において、修飾LDLとは、酸化LDL、糖化LDLなど(好ましくは、酸化LDLなど)を示し、酸化LDLとは、例えば、(1) 哺乳動物(例、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の末梢血から調製して得られうるLDLと2価金属(例、銅、マグネシウム、カルシウム、鉄など、好ましくは銅)とを反応させて、(2) 当該LDLと哺乳動物由来細胞とを接触(例、培養)させて、(3) 当該LDLと、上記2価金属および哺乳動物由来細胞とを同時に反応させて、または(4) 当該LDLと哺乳動物由来の酸化酵素(例、リポキシゲナーゼなど)とを接触させて、調製したLDLなどを示す。糖化LDLとは、例えば、(1) 哺乳動物(例、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の末梢血から調製して得られうるLDLとグルコースとを接触させて、調製したLDLなどを示す。

【0008】本願明細書において、修飾LDLに含まれる低分子化合物とは、酸化LDLに含まれる低分子化合物、糖化LDLに含まれる低分子化合物など(好ましくは、酸化LDLに含まれる低分子化合物など)を示し、酸化LDLに含まれる低分子化合物とは、酸化コレステロール類、リゾリン脂質類、セラミド類あるいはそれらの合成類縁体などを示す。酸化コレステロール類としては、例えば25-ヒドロキシコレステロール、22-ヒドロキシコレステロール、7-ケトコレステロールなどが用いられ、前述以外にはヒドロキシ体、ケト体あるいは

エポキシ体コレステロールなどが用いられる。リゾリン脂質類としては、例えば、1-アシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンあるいは1-アシル-sn-グリセロ-3-ホスホセリン、2-アシル-sn-グリセロ-3-ホスホコリンあるいは2-アシル-sn-グリセロ-3-ホスホセリンなどが用いられる。セラミド類としては、例えば、N-アシルスフィンゴシン、セラミド-1-フォスフォコリンなどが用いられる。糖化LDLに含まれる低分子化合物とは、糖化リン脂質類などを示す。糖化リン脂質類としては、例えば、糖化フォスファチジルエタノールアミン、糖化フォスファチジルセリンおよび糖化フォスファチジルコリンなどが用いられる。本願明細書において、修飾LDLに含まれるタンパク質とは、酸化LDLに含まれるタンパク質、糖化LDLに含まれるタンパク質など(好ましくは、酸化LDLに含まれるタンパク質など)を示し、酸化LDLに含まれるタンパク質とは、酸化修飾を受けたアポリポプロテイン類などを示す。酸化アポリポプロテイン類としては、例えば、酸化アポリポプロテインBおよび酸化によって生じるそのペプチド断片などが用いられる。糖化LDLに含まれるタンパク質とは、糖化修飾を受けたアポリポプロテイン類などを示す。糖化アポリポプロテイン類としては、例えば、糖化アポリポプロテインA-I、A-II、B、C-I及びEなどが用いられる。

【0009】本発明のスクリーニング方法は、AR遺伝子を用いることを特徴とするAR遺伝子の発現を制御する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法であり、具体的には、AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を用いることを特徴とする、修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による当該AR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。さらに具体的には、本発明のスクリーニング方法は、(1) AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、当該AR遺伝子DNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAを用いてそれぞれの場合におけるARタンパク質をコードするmRNA(以下、ARmRNAと略称する場合がある。)の量を測定することを特徴とする、当該AR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法(以下、スクリーニング方法Aと略記する)、(2) AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、それぞれの場合における細胞内ARタンパク質または分泌されたARタンパク質(細胞外のARタンパク質)の量を測定することを特徴とする、当該AR遺伝子の発現変動を

抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法(以下、スクリーニング方法Bと略記する)、(3)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に接触させ、それぞれの場合におけるARタンパク質の活性を測定することを特徴とする、当該AR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法(以下、スクリーニング方法Cと略記する)、(4)AR遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーをレポーター遺伝子に連結させたDNAで形質転換した細胞、組織または非ヒト哺乳動物と修飾LDLまたは修飾LDLに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質とを試験化合物の存在下および非存在下に培養し、それぞれの場合における該レポーター遺伝子の発現または活性を検出することを特徴とする修飾LDLまたは修飾LDLに含有される低分子化合物あるいはタンパク質による当該AR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法(以下、スクリーニング方法Dと略記する)である。以下に、本発明のスクリーニング方法を詳細に説明する。

【0010】本発明のスクリーニング方法Aは、具体的には、(i)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質の存在下に培養した場合のARmRNAの量と、(ii)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質と試験化合物の存在下に培養した場合のARmRNAの量との比較を行うことを特徴とする、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるAR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

【0011】AR遺伝子を発現する能力を有する細胞として、例えば、ヒトを含む哺乳動物、植物、微生物のいずれの細胞でもよく、特に哺乳動物由来の細胞が好ましい。哺乳動物由来の細胞としては、例えば、哺乳動物由来(ヒト、サル、ブタ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスターなど)の末梢血由来単球マクロファージ、腹腔マクロファージ、肺泡マクロファージ、大動脈マクロファージ、平滑筋細胞、内皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、樹状細胞株などや、THP-1(ヒト)、U937(ヒト)、HepG2(ヒト)、J774(マウス)、L-1(マウス)、RAW264.7(マウス)、WEHI(マウス)、P388D1(マウス)などの細胞株などが挙げられる。AR遺伝子を発現する能力を有する細胞の培養は、公知の動物細胞培養法と同様に行われる。例えば、培地としては、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122

巻, 501(1952)]、DMEM培地〔ウイルス学(Virology), 8巻, 396(1959)]、RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)]、199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)]等が用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30~40で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加えてもよい。AR遺伝子を発現する能力を有する組織として、例えば、ヒトを含む哺乳動物または植物のいずれの組織でもよく、特に哺乳動物由来の組織が好ましい。哺乳動物由来の組織としては、例えば、脳、心臓、肺臓、脾臓、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、腸などが挙げられる。AR遺伝子を発現する能力を有する非ヒト哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなどが用いられる。

【0012】mRNAの発現量の比較をハイブリダイゼーション法によって行うには、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法等に従って行うことができる。具体的には、ARmRNAの量の測定は、公知の方法に従って細胞から抽出したRNAとAR遺伝子をコードするDNA(AR遺伝子DNA)もしくはその相補DNAまたはその部分DNAとを接触させ、AR遺伝子DNAまたはその相補DNAに結合したmRNAの量を測定することによって行われる。AR遺伝子DNAの相補DNAまたはその部分DNAを、例えば放射性同位元素、色素などで標識することによって、AR遺伝子DNAの相補DNAに結合したARmRNAの量が容易に測定できる。放射性同位元素としては、例えば³²P、³Hなどが用いられ、色素としては、例えばfluorescein、FAM(PE Biosystems社製)、JOE(PE Biosystems社製)、TAMRA(PE Biosystems社製)、ROX(PE Biosystems社製)、Cy5(Amersham社製)、Cy3(Amersham社製)などの蛍光色素が用いられる。また、ARmRNAの量は、細胞から抽出したRNAを逆転写酵素によってcDNAに変換した後、AR遺伝子をコードするDNAもしくはその相補DNAまたはその部分DNAをプライマーとして用いるPCRによって、増幅されるcDNAの量を測定することによって行うことができる。

【0013】ARmRNAの量の測定に用いられるAR遺伝子DNAの相補DNAとしては、AR遺伝子DNA(上鎖)に相補的な配列を有するDNA(下鎖)があげられる。AR遺伝子DNAの部分DNAとしては、例えばAR遺伝子DNAの塩基配列中、連続した10~10

00個程度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成される塩基配列があげられる。AR遺伝子DNAの相補DNAの部分DNAとしては、例えば前記したAR遺伝子DNAの部分DNAに相補的な配列を有するDNAがあげられる。即ち、例えばAR遺伝子DNAの塩基配列中、連続した10~1000個程度、好ましくは10~300個程度、さらに好ましくは10~30個程度の塩基から構成される塩基配列に相補的な配列を有するDNAがあげられる。

修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARmRNAの量の増加を抑制する試験化合物または修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARmRNAの量の低下を抑制する試験化合物を、好ましくは修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARmRNAの量の低下を抑制する試験化合物を、動脈硬化進展阻止または動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。ARタンパク質がLLPLである場合は、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるLLPLmRNAの量の低下を抑制する試験化合物を、動脈硬化進展阻止または動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。本発明のスクリーニング方法Aにおいて、試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0014】本発明のスクリーニング方法Bは、具体的には、(i)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質の存在下に培養した場合の細胞内または細胞外ARタンパク質の量と、(ii)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質と試験化合物の存在下に培養した場合の細胞内または細胞外ARタンパク質の量との比較を行うことを特徴とする、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるAR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

【0015】ARタンパク質の量は、例えば、ARタンパク質等に対する抗体を用いて測定することができる。測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量(例えば、タンパク質量)に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理

的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{131}\text{I}]$ 、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0016】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗体に被検液を反応させ(1次反応)、さらに標識化した抗体を反応させ(2次反応)た後、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序で行っても、また、同時に行ってもよいし時間をずらして行ってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。サンドイッチ法によるタンパク質等の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗体はタンパク質等の結合する部位が異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、タンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0017】サンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させた

後、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後、固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0018】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の方法、操作法に当業者の通常的方法的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。以上のように、ARタンパク質等を感度良く定量することができる。修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による細胞内または細胞外ARタンパク質の量の増加を抑制する試験化合物または 修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による細胞内または細胞外ARタンパク質の

量の低下を抑制する試験化合物を、好ましくは修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による細胞内または細胞外ARタンパク質の量の低下を抑制する試験化合物を動脈硬化進展阻止または動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。ARタンパク質がLLPLである場合は、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による細胞内または細胞外LLPLの量の低下を抑制する試験化合物を、動脈硬化進展阻止または動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。試験化合物としては、[0011]記載と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0019】本発明のスクリーニング方法Cは、具体的には、(i)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質の存在下に培養した場合のARタンパク質の活性と、(ii)AR遺伝子を発現する能力を有する細胞、組織または非ヒト哺乳動物を修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質と試験化合物の存在下に培養した場合のARタンパク質の活性との比較を行うことを特徴とする、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるAR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。ARタンパク質の活性は、ARタンパク質の種類によって異なるが、例えば、AR遺伝子がLLPLの場合は、ホスホオリピッド：コレステロールアシルトランスフェラーゼ活性、ホスホオリパーゼ活性、リゾホスホオリパーゼ活性、リゾホスファチジルコリンのホスファチジルコリンへのエステル化活性、ホスホオリピッド：セラミドアシルトランスフェラーゼ活性、PAFの加水分解活性、PAFのトランスエステル化活性、脂肪酸エステルの加水分解活性、酸化リン脂質の加水分解活性、酸化コレステロールのエステル化活性などが挙げられる。これらの活性は自体公知の方法に準じて、測定することができる。

修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARタンパク質の活性の増加を抑制する試験化合物または 修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARタンパク質の活性の低下を抑制する試験化合物を、好ましくは修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARタンパク質の活性の低下を抑制する試験化合物を動脈硬化進展阻止または動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。ARタンパク質がLLPLである場合は、修飾

LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるARタンパク質の活性の低下を抑制する試験化合物を動脈硬化進展阻止または動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。試験化合物としては、[0011]記載と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。

【0020】本発明のスクリーニング方法Dは、具体的には、AR遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー領域を、適当なレポーター遺伝子の上位に連結させたDNAで形質転換した細胞(例えば、軟骨細胞、繊維芽細胞(例、マウス繊維芽細胞株C3H10T1/2)、筋芽細胞(例、マウス筋芽細胞株C2C12)などを試験化合物の存在下で培養し、AR遺伝子の発現に代えてレポーター遺伝子の発現(例、発現量または活性)を検出することを特徴とする、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるレポーター遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法、ひいては修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるAR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩のスクリーニング方法である。AR遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー領域としては、公知のものであってもよいし、ゲノムDNAからクローニングしたものであってもよい。レポーター遺伝子としては、例えば、
 ・ガラクトシダーゼ遺伝子(lacZ)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子(cat)、ルシフェラーゼ遺伝子可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子など用いられる。レポーター遺伝子産物(例、mRNA、タンパク質)の発現量または活性を公知の方法を用いて測定することによって、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によって低下したレポーター遺伝子産物の発現量または活性を増加する試験化合物をAR遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーの活性を制御(特に促進)する作用を有する化合物、すなわちAR遺伝子の発現を促進する化合物として選択できる。逆に、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質で増加したレポーター遺伝子産物の量または活性を減少させる試験化合物をAR遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーの活性を制御(特に阻害)する作用を有する化合物、すなわちAR遺伝子の発現を抑制する化合物として選択することができる。ARタンパク質がLLPLである場合は、修飾LDLおよび(または)それに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質によるレポーター遺伝子産物の発現量または活性の低下を抑制する試験化合物を、AR遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーの活性を促進する作用を有する化合物、すなわちAR遺伝子の発現を促進し、動脈硬化進展阻止または

動脈硬化退縮作用を有する化合物として選択し、動脈硬化予防・治療薬として使用することができる。試験化合物としては、[0011]記載と同様のものが使用される。細胞の培養は、公知の動物細胞培養と同様に行うことができる。また、レポーター遺伝子の代わりに、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子を挿入し、細胞の生存数を指標として、スクリーニング方法Dを実施することもできる。

【0021】本発明のスクリーニング方法で選択される化合物、修飾LDLなどによるAR遺伝子の発現変動を抑制する化合物またはその塩(好ましくは、医薬上許容される塩)は、哺乳動物(ヒト、サル、ブタ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスターなど)に対する脱泡沫化促進作用、動脈硬化抑制作用、動脈硬化退縮作用などを有しているので、動脈硬化予防・治療薬、脱泡沫化促進剤、動脈硬化抑制剤、動脈硬化退縮剤などの医薬として使用することができる。さらに、これら化合物またはその塩は、リポド・リッチ・プラーク退縮作用を有するので、哺乳動物に対する急性心筋梗塞、不安定狭心症等の急性冠動脈症候群、末梢動脈閉塞症、および経皮的冠動脈形成術(PTCA)後の再狭窄の予防・治療薬としても有用である。本発明の医薬組成物は、自体公知の製剤化技術に従って、要すれば公知の賦形剤、担体を用い、例えば、経口投与用、非経口投与用の固体または液体の医薬組成物とし、哺乳動物に投与することができる。その投与量は、選択した個々の化合物に応じて、適宜選択することができる。より具体的には、選択された化合物またはその塩は、経口的に、または非経口的に、注射、点滴、吸入法、直腸投入または局所投与により用いることができ、そのまま、あるいは医薬品組成物の製剤(例えば、粉末、顆粒、錠剤、ピル剤、カプセル剤、注射剤、シロップ剤、エマルジョン剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤など)として用いることができる。すなわち化合物またはその塩を単独で、あるいは医薬として許容される担体(アジュバンド剤、賦形剤、補形剤及び/又は希釈剤など)と混合して用いることができる。

【0022】これら医薬組成物は通常の方法に従って製剤化することができる。かかる製剤は通常活性成分を賦型剤、希釈剤、担体等の添加剤と混合/練合することにより製造することができる。本明細書において、非経口とは、皮下注射、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射あるいは点滴法などを含むものである。注射用調剤、例えば、無菌注射用水性懸濁物または油性懸濁物は、適当な分散化剤または湿化剤及び懸濁化剤を用いて当該分野で知られた方法で調製される。その無菌注射用調剤は、また、例えば水溶液などの非毒性の非経口投与することのできる希釈剤あるいは溶剤中の無菌の注射のできる溶液または懸濁液であってよい。使用することのできるベヒクルあるいは溶剤として許されるものとしては、水、リンゲル液、等張食塩液などがあげられる。さら

に、通常溶剤または懸濁化溶媒として無菌の不揮発性油も用いられる。このためには、いかなる不揮発性油も脂肪酸も使用でき、天然または合成もしくは半合成の脂肪性油又は脂肪酸、そして天然または合成もしくは半合成のモノ、ジまたはトリグリセリド類も含まれる。直腸投与用の座剤は、その薬物と適当な非刺激性の補形剤、例えば、ココアバターやポリエチレングリコール類といった常温では固体であるが腸管の温度では液体で、直腸内で融解し、薬物を放出するものなどと混合して製造されることができる。また、適当な基剤（例、酪酸の重合体、グリコール酸の重合体、酪酸-グリコール酸の共重合体、酪酸の重合体とグリコール酸の重合体との混合物、ポリグリセロール脂肪酸エステル等）と組み合わせ徐放性製剤とすることも有効である。

【0023】経口投与用の固形投与剤型としては、粉剤、顆粒剤、錠剤、ピル剤、カプセル剤などの上記したものがあげられる。そのような剤型の製剤は、活性成分化合物と、少なくとも一つの添加物、例えば、ショ糖、乳糖（ラクトース）、セルロース糖、マンニトール（D-マンニトール）、マルチトール、デキストラン、デンプン類（例、コーンスターチ）、微結晶セルロース、寒天、アルギネート類、キチン類、キトサン類、ペクチン類、トラガントガム類、アラビアゴム類、ゼラチン類、コラーゲン類、カゼイン、アルブミン、合成又は半合成のポリマー類又はグリセリド類とを混合及び/又は練合することにより製造することができる。そのような剤型物はまた、通常の如く、さらなる添加物を含むことができ、例えば不活性希釈剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、パラベン類、ソルビン酸などの保存剤、アスコルビン酸、トコフェロール、システインなどの抗酸化剤、崩壊剤（例、クロスカルメロースナトリウム）、結合剤（例、ヒドロキシプロピルセルロース）、増粘剤、緩衝化剤、甘味付与剤、フレーバー付与剤、パーフェューム剤などがあげられる。錠剤及びピル剤はさらにエンテリックコーティングされて製造されることもできる。経口投与用の液剤は、医薬として許容されるエマルジョン剤、シロップ剤、エリキシル剤、懸濁剤、溶液剤などがあげられ、それらは当該分野で普通用いられる不活性希釈剤、例えば水及び必要により添加物を含んでいてよい。これら経口用液剤は、活性成分化合物と不活性希釈剤、及び必要により他の添加剤を混合する等慣用方法に従い製造することができる。経口投与剤では、剤形にもよるが、通常約0.01～99W%、好ましくは約0.1～90W%通常約0.5～50W%の活性成分化合物を配合するのがよい。ある特定の患者の投与量は、年令、体重、一般的健康状態、性別、食事、投与時間、投与方法、排泄速度、薬物の組み合わせ、患者のその時に治療を行っている病状の程度に応じ、それらあるいはその他の要因を考慮して決められる。これら医薬組成物の1日あたりの投与量は、患者の状態や体重、化合物の

種類、投与経路等によって異なるが、例えば、動脈硬化抑制薬として使用する場合、成人（体重約60kgとして）1日当たりの投与量は、経口剤の場合、有効成分として約1～500mg、好ましくは約10～200mgであり、非経口剤の場合、有効成分として約0.1～100mg、好ましくは約1～50mg、通常約1～20mgである。

【0024】これらの疾患の治療において、本発明のスクリーニング方法で選択選択される化合物またはその塩は単独で治療のために使用されてもよく、またはその他の脂質低下薬またはコレステロール低下薬、心筋保護薬、冠動脈疾患治療薬、糖尿病治療薬、甲状腺機能低下治療薬、ネフローゼ症候群治療薬または慢性腎不全治療薬を含む他の医薬成分と共に使用されてもよく、この場合、これらの化合物は経口製剤として投与されることが好ましく、また必要により直腸製剤として坐薬の形態で投与されてもよい。この場合の可能な組み合わせ成分は、例えばフィブレート類〔例、クロフィブレート、ベンザフィブレート、ジェムフィプロジル等〕；ニコチン酸、その誘導体および類縁体〔例、アシビモックスおよびプロブコール〕；胆汁酸結合樹脂〔例、コレステラミン、コレステポール等〕；コレステロール吸収を抑制する化合物〔例、シトステロールやネオマイシン等〕；コレステロール生合成を阻害する化合物〔例、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン等のHMG-CoA還元酵素阻害薬〕；スクアレン合成酵素阻害薬〔例、EP0567026公報、WO97/10224公報等に記載のベンゾオキサゼピン誘導体等〕スクアレンエポキシダーゼ阻害薬〔例、NB-598および類縁化合物等〕が挙げられる。更に別の可能な組み合わせ成分は、オキシドスクアレン-ラノステロールサイクラゼ、例えばデカリン誘導体、アザデカリン誘導体およびインダン誘導体である。

糖尿病治療薬：アクトス、ロジグリダソン、キネダック、ベンフィル、ヒューマリン、オイグルコン、グリミクロン、ダオニール、ノボリン、モノタード、インシュリン類、グルコバイ、ジメリン、ラスチノン、バシルコン、デアメリンS、イスジリン類；

甲状腺機能低下症治療薬：乾燥甲状腺（チレオイド）、レボチロキシンナトリウム（チラージンS）、リオチロニジンナトリウム（サイロニン、チロミン）；ネフローゼ症候群治療薬：プレドニゾン（プレドニン）、コハク酸プレドニゾンナトリウム（プレドニン）、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム（ソル・メドロール）、ベタメタゾン（リンデロン）；

抗凝固療法剤：ジピリダモール（ベルサンチン）、塩酸ジラゼプ（コメリアン）、チロピジン、クロピドグレル、Xa阻害剤；

慢性腎不全治療薬：利尿薬〔例、フロセミド（ラシックス）、ブメタニド（ルネトロン）、アゾセミド（ダイア

ート)」、降圧薬(例、ACE阻害薬、(マレイン酸エナラプリル(レニベース))及びCa拮抗薬(マニジピン)、受容体遮断薬、AII拮抗薬(カンデサルタン)などと組み合わせて、投与する際、好ましくは経口投与で使用し得る。

【0025】さらに、本発明のスクリーニング方法で選択される化合物またはその塩は、リポド・リッチ・ブランク退縮作用を有するので、血栓形成の予防・治療薬としても有用である。その際それらは単独で、または既知の下記治療薬と組み合わせて、好ましくは経口投与で使用し得る。

血栓形成予防治療薬：血液凝固阻止薬〔例、ヘパリンナトリウム、ヘパリンカルシウム、ワルファリンカルシウム(ワーファリン)、Xa阻害薬〕、血栓溶解薬〔例、tPA、ウロキナーゼ〕、抗血小板薬〔例、アスピリ *

DNA	: デオキシリボ核酸
cdNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン

【0027】本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕マウス由来LLPLのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕マウス由来LLPLをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕ヒト由来LLPLのアミノ酸配列を示 50

*ン、スルフィンピラゾロ(アンツール)、ジピリダモール(ペルサンチン)、チクロピジン(パナルジン)、シロスタゾール(プレタル)、GPIIb/IIIa拮抗薬(レオプロ)〕；

冠血管拡張薬：ニフェジピン、ジルチアゼム、ニコラジル、亜硝酸剤；

心筋保護薬：心臓ATP-K用口薬、エンドセリン拮抗薬、ウロテンシン拮抗薬。

【0026】本明細書において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

す。

〔配列番号：4〕ヒト由来LLPLをコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕実施例1で用いたマウス・プライマーを示す。

〔配列番号：6〕実施例1で用いたマウス・プライマーを示す。

〔配列番号：7〕実施例1で用いたマウス・プローブを示す。

〔配列番号：8〕実施例5で用いたマウス・プライマーを示す。

〔配列番号：9〕実施例5で用いたマウス・プライマーを示す。

〔配列番号：10〕実施例5で用いたマウス・プローブを示す。

【0028】

【実施例】以下に実施例および製剤例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0029】実施例1 酸化LDLによるLLPL発現低下の確認

袴田らの方法(実験医学別冊 vol.14, No. 12, 循環研究プロトコル, pp.49-52 (1996))に従い、チオグリコレート刺激後のC57BL/6Jマウスより腹腔マクロファージを調製した。LDLは山村らの方法(新生物化学実験講座4, pp.187-206 (1993))に従い、ウサギ血清より調整後、袴田らの方法(細胞工学別冊 医学実験 *20

*マニュアルシリーズ 2、動脈硬化+高脂血症研究ストラテジー、pp.36-41 (1996))に従い酸化LDLを調製した。腹腔マクロファージ細胞は酸化LDL含有DMEM 2.5mM HEPES (pH7)培地を用いて24時間培養した。所定時間培養した細胞からRNeasy Mini Kit (QIAGEN社)を用いてトータルRNAを調製後、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems社)を用いてcDNAを調製した。調製したcDNAを鋳型として、配列番号：5及び配列番号：6のオリゴマーをプライマーとして、また、配列番号：7のオリゴマーをプローブ(5'-FAM-TAATGATGCTGGCAGACCTGACGCTC-Tamra-3')として用いTaqMan PCR法によりLLPLのコピー数を求めた。また、TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents (VIC Probe) (Applied Biosystems社)を用いてTaqMan PCR法によりGAPDHのコピー数を求め、GAPDH比としてLLPLコピー数を補正しベヒクル添加と比較検討を行った。なお、ベヒクルはPBSを用いた。結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

		LLPL発現 (G3PDH*3比(%))		
		MEAN	SD	
	ベヒクル	3.6	0.5	
酸化LDL (µg/ml)	1	3.0	0.1	NS*1
	10	1.0	0.2	p<=0.025*2
	100	0.2	0.1	p<=0.025*2
LDL (µg/ml)	10	2.9	0.2	NS*1
	100	2.9	0.5	NS*1

*1, 有意差なし(ウィリアムズ検定結果)(n=3)

*2, 有意差あり(ウィリアムズ検定結果)(n=3)

*3, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

【0031】表1に示すように、LLPL発現量はLDLでは変動しないが、酸化LDLにより用量依存性の低下を示すことが明らかとなった。このことから、LLPLは酸化LDL特異的に発現変動する遺伝子であることが分かった。

【0032】実施例2 酸化コレステロール(25-ヒドロキシコレステロール)によるLLPL発現低下の確認

実施例1と同様に調製したマウス腹腔マクロファージ細胞を、被検化合物を含有するDMEM 2.5mM HEPES (pH7)培地を用いて24時間まで培養した。実施例1と同様にトータルRNA、cDNAを調製後、TaqMan PCR法にてLLPL発現量の定量を行い、GAPDH発現量により補正しベヒクル添加と比較検討した。なお、ベヒクルはエタノールを用いた。結果を表2に示す。

細胞を、被検化合物を含有するDMEM 2.5mM HEPES (pH7)培地を用いて24時間まで培養した。実施例1と同様にトータルRNA、cDNAを調製後、TaqMan PCR法にてLLPL発現量の定量を行い、GAPDH発現量により補正しベヒクル添加と比較検討した。なお、ベヒクルはエタノールを用いた。結果を表2に示す。

【0033】

【表2】

		LLPL発現 (GAPDH*3比(%))		
		MEAN	SD	
	ベヒクル	5.3	0.4	
25-ヒドロキシコレステロール (µg/ml)	0.1	3.9	1.7	NS*1
	1	3.5	0.6	p<=0.025*2
	10	1.9	0.2	p<=0.025*2

*1, 有意差なし(ウィリアムズ検定結果)(n=3)

*2, 有意差あり(ウィリアムズ検定結果)(n=3)

*3, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

【0034】表2に示すように、酸化LDLに含まれる代表的な酸化コレステロールである25-ヒドロキシコレステロールによりLLPL発現が用量依存的に低下することが明らかとなった。

【0035】実施例3 リゾリン脂質(L-β-パルミトイルリゾフォスファチジルコリン)によるLLPL発現低下の確認

実施例1と同様に調製したマウス腹腔マクロファージ細*

LPC*1 (μM)	LLPL発現 (G3PDH*2比(%))
ベヒクル	3.7
1	3.4
3	3.3
10	2.4
30	1.7
100	0.0

(n=2)

*1, L-パルミトイルリゾフォスファチジルコリン

*2, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

【0037】表3が示すように、酸化LDLに含まれる代表的なリゾリン脂質であるL-β-パルミトイルリゾフォスファチジルコリンによりLLPL発現が低下するこ

【0038】実施例4 酸化LDLによるLLPLタンパク質低下の確認

実施例1と同様に調製したマウス腹腔マクロファージ細胞を、被検物質を含有するDMEM 25mM HEPES (pH7)培地を用いて24時間培養した。さらに、新たな被検物質を含有するDMEM 25mM HEPES (pH7)培地に交換しさらに72時間培養した。i)遠心分離により細胞などを除いた培養上清にSDSを添加し最終濃度0.11%として100、2分処理したものを免沈サンプルとした。ii)また、細胞を溶解緩衝液(20mM Tris 150mM NaCl 0.1% SDS 0.1% NaN3、pH7.4)で溶解後、100、2分処理したものを免沈サンプルとした。免疫沈降、ウェスタン解析は定法に従って行った。LLPLの免疫沈降にはPCLO2ポリクローナル抗体、LLPLタンパクの検出にはm1G抗体を用いた。LLPLの定量はアルカリフォスファターゼで発色したLLPLのバンドをデンストメトリックに解析し、数値化し検討した。結果を表4に示す。

【0039】

【表4】

酸化LDL (μg/ml)	LLPLバンド強度(ベヒクル比)	
	培養上清	細胞溶解液
ベヒクル	1.0	1.0
1	1.1	0.9
3	1.1	0.8
10	0.7	0.4

(n=2)

*胞を、被検化合物を含有するDMEM 25mM HEPES (pH7)培地を用いて24時間まで培養した。実施例1と同様にトータルRNA、cDNAを調製後、TaqMan PCR法にてLLPL発現量の定量を行い、GAPDH発現量により補正しベヒクル添加と比較検討した。なお、ベヒクルはエタノールを用いた。結果を表3に示す。

【0036】

【表3】

*【0040】表4が示すように、酸化LDL特異的に細胞内LLPL及び分泌LLPLタンパク量が2分の1以下に低下することが明らかとなった。

【0041】実施例5 ヒト大動脈内皮細胞における酸化LDLによるLLPL発現低下の確認

Clonetics社が提供する正常ヒト大動脈血管内皮細胞を使用した。また、酸化LDLは実施例1と同様な方法で調製した。正常ヒト大動脈内皮細胞は酸化LDL含有EGM-2 SingleQuots添加EBM-2培地(Clonetics社)を用いて24時間培養した。所定時間培養した細胞からRNAeasy Mini Kit(QIAGEN社)を用いてトータルRNAを調製後、TaqMan Reverse Transcription Reagents(Applied Biosystems社)を用いてcDNAを調製した。調製したcDNAを鋳型として、配列番号:8及び配列番号:9のオリゴマーをプライマーとして、また、配列番号:10のオリゴマーをプローブ(5'-FAM-TGGAGTTCCTGGACCCCGC AAAA-Tamra-3')として用いTaqMan PCR法によりLLPLのコピー数を求めた。また、TaqMan GAPDH Control Reagents(Applied Biosystems社)を用いてTaqMan PCR法によりGAPDHのコピー数を求め、GAPDH比としてLLPLコピー数を補正しベヒクル添加と比較検討を行った。なお、ベヒクルはPBSを用いた。結果を表5に示す

【0042】

【表5】

*

	28 LLPL発現 (GAPDH ^{*2} 比(%))	
	MEAN	SD
	ベヒクル	6.3
10ug/ml 酸化LDL	4.3	0.5

*1, 有意差あり(ダンネット検定結果)(n=3)

*2, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

【0043】表5に示すように、LLPL発現量は酸化LDLにより低下を示すことが明らかとなった。このことから、ヒト大動脈内皮細胞においてもLLPLは酸化LDLにより発現変動する遺伝子であることが分かった。

【0044】実施例6 マウス腹腔マクロファージ細胞における糖化LDLによるLLPL発現低下の確認
実施例1と同様な手法でC57BL/6Jマウスから腹腔マクロファージを調製する。LDLは山村らの方法(新生化学実験講座4、pp.187-206(1993))に従い、ウサギ血清より調整後、袴田らの方法(細胞工学別冊医学実験マニュアルシリーズ2、動脈硬化+高脂血症研究ストラテジー、pp.36-41(1996))に従い糖化LDLを調製する。糖化LDL含有DMEM 25mM HEP*

製剤例1 カプセル剤

(1)化合物A	10mg
(2)ラクトース	90mg
(3)微結晶セルロース	70mg
(4)ステアリン酸マグネシウム	10mg

1カプセル 180mg

(1)、(2)および(3)の各全量ならびに(4)の1/2量を混和した後、顆粒化した。これに残りの(4)を加え、全体をゼラチンカプセルに封入してカプ*

製剤例2 錠剤

(1)化合物A	10mg
(2)ラクトース	35mg
(3)コーンスターチ	150mg
(4)微結晶セルロース	30mg
(5)ステアリン酸マグネシウム	5mg

1錠 230mg

(1)、(2)および(3)の各全量、(4)の2/3量ならびに(5)の1/2量を混和後、顆粒化した。残りの(4)および(5)をこの顆粒に加えて錠剤に加圧

製剤例3 注射剤

(1)化合物A	10mg
(2)イノシット	100mg
(3)ベンジルアルコール	20mg

1アンプル 130mg

(1)、(2)および(3)を全量2mlになるように、注射用蒸留水に溶かし、アンプルに封入した。全工程は無菌状態で行った。上記の製剤例1~3における化

*ES(pH7)培地を用いて24時間培養した腹腔マクロファージ細胞からRNeasy Mini Kit(QIAGEN社)を用いてトータルRNAを調製し、TaqMan Reverse Transcription Reagents(Applied Biosystems社)を用いてcDNAを調製する。調製したcDNAを鋳型として、TaqMan PCR法によりLLPLのコピー数を求める。また、TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents(VIC Probe)(Applied Biosystems社)を用いてTaqMan PCR法によりGAPDHのコピー数を求め、GAPDH比としてLLPLコピー数を補正しベヒクル添加と比較検討を行う。なお、ベヒクルはPBSを用いる。このような手法を用いることで、糖化LDLによるLLPL発現低下の確認を行う。

【0045】

*セル剤を得た。

【0046】

【0047】

化合物Aは、本発明のスクリーニング方法で選択される化合物またはその塩を指す。

【0048】

【発明の効果】本発明の修飾LDL及びそれに含まれる低分子化合物あるいはタンパク質による動脈硬化関連遺伝子の発現変動を抑制する化合物及びその塩のスクリーニング方法などにより、動脈硬化予防または動脈硬化治

療薬を効率良く選択することができる。

【0049】

【配列表】

[Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> A Screening for a medicine for preventing or treating arteriosclerosis

<130> B02399

<150> JP 2002-12216

<151> 2002-1-21

<160> 10

<210> 1

<211> 412

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

Met Asp Arg His Leu Cys Thr Cys Arg Glu
Thr Gln Leu Arg Ser Gly

5

10

15

Leu Leu Leu Pro Leu Phe Leu Leu Met Met
Leu Ala Asp Leu Thr Leu

20

25

30

Pro Ala Gln Arg His Pro Pro Val Val Leu
Val Pro Gly Asp Leu Gly

35

40

45

Asn Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro
Lys Val Val His Tyr Leu

50

55

60

Cys Ser Lys Lys Thr Asp Ser Tyr Phe Thr
Leu Trp Leu Asn Leu Glu

65

70

75

80

Leu Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp
Ile Asp Asn Ile Arg Leu

85

90

95

Val Tyr Asn Arg Thr Ser Arg Ala Thr Gln
Phe Pro Asp Gly Val Asp

100

105

110

Val Arg Val Pro Gly Phe Gly Glu Thr Phe
Ser Met Glu Phe Leu Asp

115

120

125

Pro Ser Lys Arg Asn Val Gly Ser Tyr Phe
Tyr Thr Met Val Glu Ser

130

135

140

Leu Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu
Asp Val Arg Gly Ala Pro

145

150

155

1

60

Tyr Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn

260 265 270
 Asn His Thr Trp Ser His Glu Lys Val Phe
 Val Tyr Thr Pro Thr Thr
 275 280 285
 Asn Tyr Thr Leu Arg Asp Tyr His Arg Phe
 Phe Arg Asp Ile Gly Phe
 290 295 300
 Glu Asp Gly Trp Phe Met Arg Gln Asp Thr
 Glu Gly Leu Val Glu Ala
 305 310 315 3
 20
 Met Thr Pro Pro Gly Val Glu Leu His Cys
 Leu Tyr Gly Thr Gly Val
 325 330 335
 Pro Thr Pro Asn Ser Phe Tyr Tyr Glu Ser
 Phe Pro Asp Arg Asp Pro
 340 345 350
 Lys Ile Cys Phe Gly Asp Gly Asp Gly Thr
 Val Asn Leu Glu Ser Val
 355 360 365
 Leu Gln Cys Gln Ala Trp Gln Ser Arg Gln
 Glu His Arg Val Ser Leu
 370 375 380
 Gln Glu Leu Pro Gly Ser Glu His Ile Glu
 Met Leu Ala Asn Ala Thr
 385 390 395 4
 00
 Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Arg Val Leu Leu
 Glu Pro
 405 410

<210> 2

<211> 1236

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

atggatcgcc atctctgcac ctgtcgcgag accc

agctcc ggagtggcct cctgttacct 60

ctgtttctac taatgatgct ggcagacctg acgc

tcccgg cccaacgtca cccccggtg 120

gtgctggc ctggtgattt ggtaaccag ttgg

aagcaa agctggataa gccaaagggt 180

gtacactacc ttgtctcaa gaagacggac agct

acttca cactctggct gaatctggaa 240

ctgcttctgc ctgttatcat tgactgctgg attg

acaata tcaggctggt ttacaacaga 300

acatctcggg ccaccagtt tccgatggt gtgg

acgtgc gtgtccctgg ctttggggaa 360

acattttcta tggaaattcct agaccccagc aaga

ggaatg tgggttccta tttctacact 420

atggtggaga gccttgctgg ctggggctac acac

ggggtg aagacgttcg aggtgctccc 480

tatgattggc ggcgagcccc aatgaaaac gggc

cctact tcttggccct gcgagagatg 540

Ala Gly Arg His Pro Pro Val Val Leu Val
 Pro Gly Asp Leu Gly Asn
 5 10 15
 Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Thr
 Val Val His Tyr Leu Cys
 20 25 30
 Ser Lys Lys Thr Glu Ser Tyr Phe Thr Ile
 Trp Leu Asn Leu Glu Leu
 35 40 45
 Leu Leu Pro Val Ile Ile Asp Cys Trp Ile
 Asp Asn Ile Arg Leu Val
 50 55 60
 Tyr Asn Lys Thr Ser Arg Ala Thr Gln Phe
 Pro Asp Gly Val Asp Val
 65 70 75 80
 Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Phe Ser
 Leu Glu Phe Leu Asp Pro
 85 90 95
 Ser Lys Ser Ser Val Gly Ser Tyr Phe His
 Thr Met Val Glu Ser Leu
 100 105 110
 Val Gly Trp Gly Tyr Thr Arg Gly Glu Asp
 Val Arg Gly Ala Pro Tyr
 115 120 125
 Asp Trp Arg Arg Ala Pro Asn Glu Asn Gly
 Pro Tyr Phe Leu Ala Leu
 130 135 140
 Arg Glu Met Ile Glu Glu Met Tyr Gln Leu
 Tyr Gly Gly Pro Val Val
 145 150 155 1
 60
 Leu Val Ala His Ser Met Gly Asn Met Tyr
 Thr Leu Tyr Phe Leu Gln
 165 170 175
 Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Lys Tyr
 Ile Arg Ala Phe Val Ser
 180 185 190
 Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Val Ala Lys
 Thr Leu Arg Val Leu Ala
 195 200 205
 Ser Gly Asp Asn Asn Arg Ile Pro Val Ile
 Gly Pro Leu Lys Ile Arg
 210 215 220
 Glu Gln Gln Arg Ser Ala Val Ser Thr Ser
 Trp Leu Leu Pro Tyr Asn

<212> DNA
 <213> Human
 <400> 4
 gccggacgtc accccccagt ggtgctggtc cctg
 gtgatt tgggtaacca actggaagcc 60
 aagctggaca agccgacagt ggtgactac ctct
 gctcca agaagaccga aagctacttc 120
 acaatctggc tgaacctgga actgctgctg cctg
 tcatca ttgactgctg gattgacaat 180
 atcaggctgg tttaacaaca aacatccagg gcc
 cccagt ttctgatgg tgtggatgta 240
 cgtgtccctg gctttggaa gaccttctca ctgg
 agttcc tggacccag caaagcagc 300
 gtgggttctt attccacac catggtggag agcc
 ttgtgg gctggggcta cacacgggt 360
 gaggatgtcc gaggggctcc ctatgactgg cgcc
 gagccc caaatgaaaa cgggccctac 420
 ttcttgccc tccgcgagat gatcgaggag atgt
 accagc tgtatggggg ccccggtgtg 480
 ctggttggcc acagtatgg caacatgtac acgc
 tctact ttctgcagcg gcagccgag 540
 gcctggaagg acaagtatat ccgggccttc gtgt
 cactgg gtgcgccctg gggggcgctg 600
 gccaaagacc tgcgcgtcct ggcttcagga gaca
 acaacc ggatcccagt catcgggccc 660
 ctgaagatcc gggagcagca gcggtcagct gtct
 ccacca gctggctgct gccctacaac 720
 tacacatggt cacctgagaa ggtgttcgtg caga
 caccca caatcaacta cacactgagg 780
 gactaccgca agttcttcca ggacatcggc ttg
 aagatg gctggctcat gcggcaggac 840
 acagaagggc tgggtgaagc cacgatgcca cctg
 gcgtgc agctgactg cctctatggc 900
 actggcgtcc ccacaccaga ctcttctac tatg
 agagct tcctgaccg tgaccctaaa 960
 atctgctttg gtgacggcga tggactgtg aact
 tgaaga gtgccctgca gtgccaggcc 1020
 tggcagagcc gccaggagca ccaagtgtg ctgc
 aggagc tgccaggcag cgagcacatc 1080
 gagatgctgg ccaacgccac caccctggcc tatic
 tgaaac gtgtgctcct tgggccc 1137

<210> 5

<211> 23

<212> Primer

<213> Mouse

<400> 5

ggcctcctgt tacctctgtt tct

23

<210> 6

<211> 19

<212> Primer

<213> Mouse

<400> 6

<400> 9
 tggaaatagt aggaaccac gctg
 24

<210> 10
 <211> 24
 <212> Probe
 <213> Human
 <400> 10
 tggagttcct ggaccccagc aaaa
 24

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト' (参考)
C 1 2 Q 1/48		C 1 2 Q 1/68	Z N A A
1/68	Z N A	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15		33/50	Z
33/50		33/53	D
33/53			M
		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	A

(72)発明者 里見 朋子
 大阪府高槻市日吉台一番町10 - 24

F タ-ム (参考) 2G045 CB01 DA13 DA14 DA36
 4B024 AA01 CA04 CA05 CA06 CA09
 CA10 CA12 DA02 EA04 FA02
 FA06 FA10 GA11 GA18 HA08
 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ26 QQ32
 QQ44 QQ53 QR07 QR08 QR32
 QR40 QR41 QR42 QR48 QR55
 QR57 QR59 QR62 QR63 QR66
 QR69 QR77 QR82 QS12 QS24
 QS25 QS28 QS34 QS39 QX02
 QX07
 4C084 AA17 NA14 ZA45

专利名称(译)	动脉硬化预防/治疗药物的筛选方法		
公开(公告)号	JP2003274956A	公开(公告)日	2003-09-30
申请号	JP2003010495	申请日	2003-01-20
申请(专利权)人(译)	武田化学工业有限公司		
[标]发明人	布施広光 谷山佳央 里見朋子		
发明人	布施 広光 谷山 佳央 里見 朋子		
IPC分类号	G01N33/50 A61K45/00 A61P9/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/44 C12Q1/48 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	A61K45/00 A61P9/10 C12Q1/02 C12Q1/44 C12Q1/48.Z C12Q1/68.ZNA.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 4B024/AA01 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA06 4B024/FA10 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ26 4B063/QQ32 4B063/QQ44 4B063/QQ53 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR57 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR63 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4B063/QX07 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA45		
优先权	2002012216 2002-01-21 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供动脉硬化预防/治疗药物的筛查方法。 种类代码：A1
一种筛选化合物或其盐的方法，所述化合物或其盐通过包含在修饰的LDL或修饰的LDL中的低分子量化合物或蛋白质抑制动脉硬化相关基因的表达变异，其特征在于使用动脉硬化 - 筛选试剂盒，抑制使用筛选方法或筛选试剂盒或其盐获得的动脉硬化相关基因的表达变异的化合物，用于预防/治疗动脉硬化的药剂，包含该化合物或其盐等。

細胞工学別冊 医学実験 *20 【表1】

		LLPL 発現 (G3PDH*3比(%))		
		MEAN	SD	
	ベヒクル	3.6	0.5	
酸化LDL ($\mu\text{g/ml}$)	1	3.0	0.1	NS*1
	10	1.0	0.2	$p < 0.025^*2$
	100	0.2	0.1	$p < 0.025^*2$
LDL ($\mu\text{g/ml}$)	10	2.9	0.2	NS*1
	100	2.9	0.5	NS*1