

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7699831号
(P7699831)

(45)発行日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(24)登録日 令和7年6月20日(2025.6.20)

(51)国際特許分類		F I	
A 6 1 K	31/428 (2006.01)	A 6 1 K	31/428
A 6 1 K	31/4439(2006.01)	A 6 1 K	31/4439
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	21/02 (2006.01)	A 6 1 P	21/02

請求項の数 16 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-512664(P2022-512664)
 (86)(22)出願日 令和3年3月31日(2021.3.31)
 (86)国際出願番号 PCT/JP2021/014030
 (87)国際公開番号 WO2021/201171
 (87)国際公開日 令和3年10月7日(2021.10.7)
 審査請求日 令和6年3月25日(2024.3.25)
 (31)優先権主張番号 特願2020-66150(P2020-66150)
 (32)優先日 令和2年4月1日(2020.4.1)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 日本国(JP)

(73)特許権者 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町3番地1
 (74)代理人 110000040
 弁理士法人池内アンドパートナーズ
 (72)発明者 萩原 正敏
 京都府京都市左京区吉田本町3番地1
 国立大学法人京都大学内
 (72)発明者 小林 亜希子
 京都府京都市左京区吉田本町3番地1
 国立大学法人京都大学内
 審査官 石井 裕美子

最終頁に続く

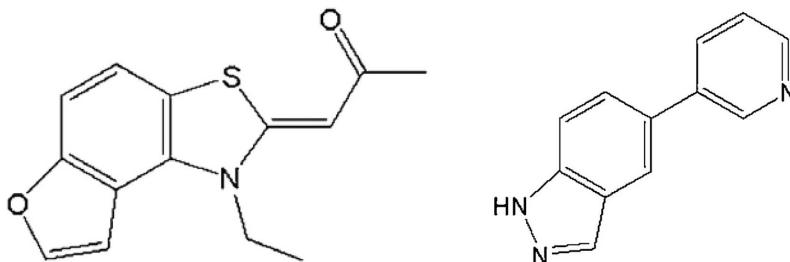
(54)【発明の名称】 神経炎症の抑制、そのための組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

神経炎症を抑制するための、医薬組成物であって、
D Y R K 1 Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有し、
 前記化合物が、下記化合物のいずれかである、医薬組成物。

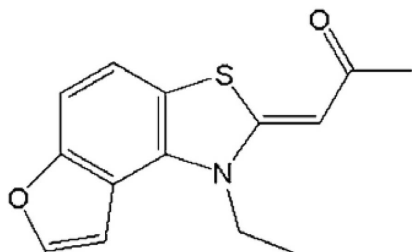
【化1】



【請求項2】

前記化合物が、下記化合物である、請求項1に記載の医薬組成物。

【化 2】



【請求項 3】

10

神経炎症を伴う疾患の改善、進行抑制、及び/又は、治療のための、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

アルツハイマー病を治療するための、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5】

経口投与用の、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 6】

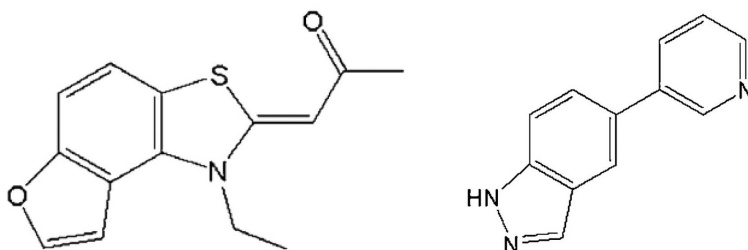
グリア細胞における Nrf2 タンパク質の安定化を促進して神経細胞を保護するための、医薬組成物であって、

DYRK1A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有し、

20

前記化合物が、下記化合物のいずれかである、医薬組成物。

【化 3】

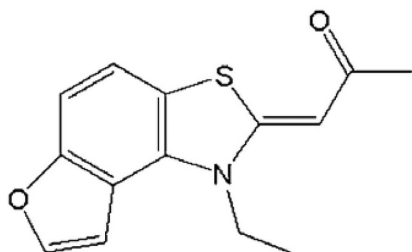


30

【請求項 7】

前記化合物が、下記化合物である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【化 4】



40

【請求項 8】

神経炎症を伴う疾患の改善、進行抑制、及び/又は、治療のための、請求項 6 又は 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記医薬組成物が、アルツハイマー病を治療するための医薬組成物である、請求項 6 から 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記医薬組成物が、経口投与用の医薬組成物である、請求項 6 から 9 のいずれかに記載

50

の医薬組成物。

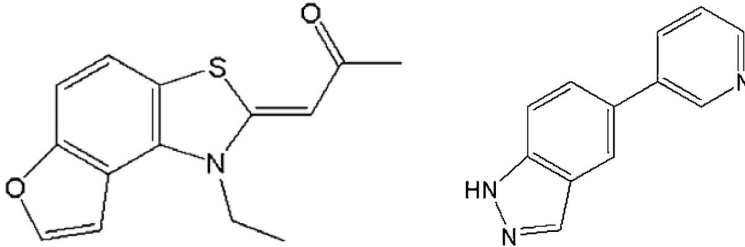
【請求項 1 1】

移植された細胞の移植後の定着率を向上するための、医薬組成物であって、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有し、

前記細胞は、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンであり、

前記化合物が、下記化合物のいずれかである、医薬組成物。

【化 5】

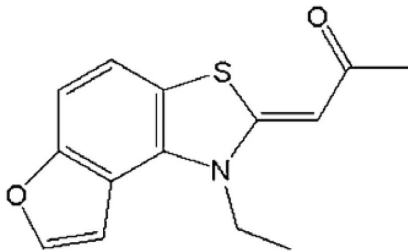


10

【請求項 1 2】

前記化合物が、下記化合物のいずれかである、請求項 1 1 に記載の医薬組成物。

【化 6】



20

【請求項 1 3】

神経疾患の手術（治療）における移植後の定着率を向上するための、請求項 1 1 又は 1 2 に記載の医薬組成物であって、

前記神経疾患は、脳梗塞、脊髄梗塞、脳出血、脊髄出血、顔面神経マヒ、四肢神経マヒ、レビー小体型認知症、ダウン症、うつ病、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病及びハンチントン病から選択される進行性神経脱落を示す神経変性疾患である、医薬組成物。

30

【請求項 1 4】

移植された細胞の移植後の生存率及び/又は残存率を向上するための、医薬組成物であって、

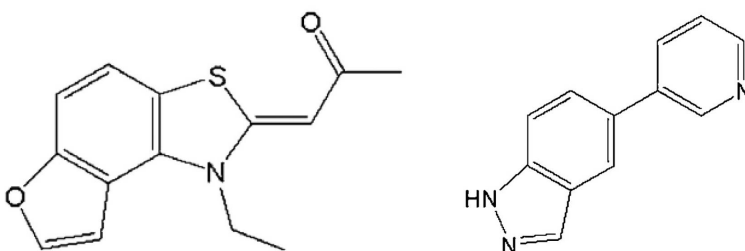
DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有し、

前記細胞は、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンであり、

前記化合物が、下記化合物のいずれかである医薬組成物。

40

【化 7】

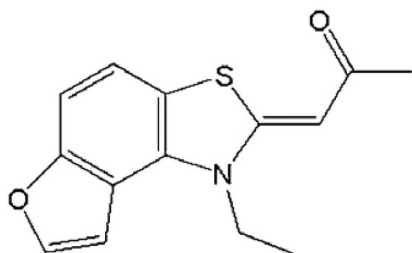


50

【請求項 15】

前記化合物が、下記化合物である、請求項 14 に記載の医薬組成物。

【化 8】



10

【請求項 16】

神経疾患の手術（治療）における移植後の定着率を向上するための、請求項 14 又は 15 に記載の医薬組成物であって、

前記神経疾患は、脳梗塞、脊髄梗塞、脳出血、脊髄出血、顔面神経マヒ、四肢神経マヒ、レビー小体型認知症、ダウン症、うつ病、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病及びハンチントン病から選択される進行性神経脱落を示す神経変性疾患である、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本開示は、神経炎症の抑制、そのための組成物及び方法に関する。本開示は、一又は複数の態様において、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植の補助、そのための組成物及び方法に関する。本開示は、一又は複数の態様において、グリア細胞における Nr f 2 (NF-E2-related factor 2) タンパク質の安定化の促進、そのための組成物及び方法に関する。本開示は、一又は複数の態様において、神経炎症から神経細胞の保護、そのための組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

パーキンソン病は、進行性の神経変性疾患であり、黒質線条体のドーパミン作動性神経（ドーパミン作動性ニューロン）の喪失を特徴とする。これまでの臨床研究から、胎生期中脳細胞の移植によって、パーキンソン病患者の運動症状の改善が確認されている。このような事実から、パーキンソン病の治療方法として細胞補充療法が考えられる。

30

多能性幹細胞、特に人工多能性幹細胞（iPS細胞又はiPSC）は、ドーパミン作動性神経を大量に供給できる可能性を有している。そのため多能性幹細胞は、新しいドナー細胞源として考えられる。しかしながら、iPS細胞等の幹細胞から分化した神経前駆細胞及びドーパミン作動性神経細胞は、脳内への移植後の残存率（生存率）が極めて低い（特許文献1）。

【0003】

ミクログリアは、中枢神経系（脳や脊髄）に存在するグリア細胞の一種である。ミクログリアは、小膠細胞やHortega細胞とも呼ばれる。

40

ミクログリアは、マクロファージのような免疫担当細胞であると考えられている。ミクログリアは、免疫反応の起点となる抗原提示作用、異物に対する自然免疫作用、異物や老廃物に対する食作用、神経回路の形成補助、周囲の細胞に影響を与える各種物質の産生といった様々な作用や役割を有する。

ミクログリアは、外的刺激やストレス等により活性状態となり、抗酸化物質や栄養因子等、有用な物質を産生する。しかし、ミクログリアは、病的な活性化により、炎症性サイトカインやケモカイン、核酸、グルタミン酸等の興奮性アミノ酸、活性酸素種、プロテアーゼ等を分泌し、周囲の細胞を傷害することで、神経炎症の起点となる。このため、ミクログリアは、中枢神経系の神経変性の原因にもなりうる（特許文献2）。

50

【0004】

タンパク質リン酸化酵素であるDYRK1Aタンパク質のリン酸化活性に対して阻害能を有する化合物は、神経新生又は神経細胞増殖に効果があることが報告されている（特許文献3及び4）。DYRKは、dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinaseを意味する酵素の総称である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】特開2018-76385号公報

【文献】WO2018/029793

【文献】WO2015/083750

【文献】WO2018/043674

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本開示は、一態様において、神経炎症を抑制するための医薬組成物を提供する。

本開示は、一態様において、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植を補助するための医薬組成物を提供する。

本開示は、一態様において、グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進するための医薬組成物を提供する。

本開示は、一態様において、神経炎症から神経細胞を保護するための医薬組成物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本開示は、一態様において、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経炎症を抑制するための医薬組成物に関する。

【0008】

本開示は、その他の態様において、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植を補助するための医薬組成物に関する。

【0009】

本開示は、その他の態様において、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進するための医薬組成物に関する。

【0010】

本開示は、その他の態様において、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経炎症から神経細胞を保護するための医薬組成物に関する。

【0011】

本開示は、その他の態様において、本開示に係る医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、神経炎症を抑制する方法に関する。

本開示は、その他の態様において、本開示に係る医薬組成物を、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植の前、同時、又は後にレシピエントに有効量投与することを含む、移植された前記細胞の生存率を向上させる方法に関する。

本開示は、その他の態様において、本開示に係る医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進し、神経炎症から神経細胞を保護する方法に関する。

本開示は、その他の態様において、本開示に係る医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、前頭側頭葉変性症、筋委縮性側索硬化症、及び多発性硬化症からなる群から

10

20

30

40

50

選択される神経炎症を伴う疾患の、改善、進行抑制、及び/又は、治療の方法に関する。

【発明の効果】

【0012】

本開示に係る医薬組成物によれば、一又は複数の実施形態において、神経炎症を抑制できる。

本開示に係る医薬組成物によれば、一又は複数の実施形態において、移植する神経前駆細胞、幹細胞、及び/又はニューロンの移植後の生存率を向上できる。

本開示に係る医薬組成物によれば、一又は複数の実施形態において、グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進向上できる。

本開示に係る医薬組成物によれば、一又は複数の実施形態において、神経炎症から神経細胞を保護できる。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、グリア細胞におけるp21とNrf2の誘導に関する。図1Aは、ミクログリア細胞を化合物1で処理したときのウエスタンブロット分析の結果である。図1Bは、化合物1及び2で処理されたグリア細胞の代表的な画像である。図1Cは、Cd11b陽性細胞の核におけるNrf2のシグナル強度の定量化の例である。

【図2】図2は、神経炎症（ミクログリアのサイトカイン産生）の抑制に関する。図2Aは、リポ多糖（LPS）処理時のサイトカイン、ケモカイン、及びiNOSのmRNAの産生をqPCRで評価した結果である。図2Bは、LPS刺激により産生されたサイトカインをELISAで定量化した結果である。図2Cは、Nrf2の存在下又は非存在下での示されたサイトカインの産生に関するqPCR分析の結果である。

20

【図3】図3は、ニューロンの移植効率の向上に関する。図3Aは、実験スキームである。図3Bは、マウスの線条体組織に移植されたiPSC由来ドーパミン作動性ニューロン（DAニューロン）の代表的な画像である。図3Cは、移植細胞の定量分析の結果を示す。

【図4】図4は、神経炎症に起因する神経変性の抑制に関する。図4Aは、実験スキームである。図4Bは、処理された動物の黒質の代表的な画像である。図4Cは、黒質緻密質（SNpc）のTH陽性細胞の数を定量化した結果である。図4Dは、最後のLPS注射から1日目の線条体組織のqPCRによるグリア活性化の定量分析の結果である。図4E及びFは、Day1の線条体組織から示されたサイトカインとケモカインのレベルをqPCR（E）とELISA（F）で分析した結果である。

30

【図5】図5は、神経保護機能（iPSC細胞由来ニューロンの移植効率向上及び細胞炎症による細胞変性の抑制効果）のメカニズムに関する。図5Aは、hiPSC由来ドーパミン作動性神経前駆細胞の代表的な画像である。図5Bは、hNucleiの数の定量分析である。図5Cは、PCRによる定量である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本開示は、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物が、神経炎症を抑制するという知見に基づく。

本開示は、また、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物が、脳に移植されるニューロンの定着率（生存率、残存率）を向上できるという知見に基づく。

40

本開示は、また、DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物が、グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進して、神経炎症から神経細胞を保護できるという知見に基づく。

【0015】

DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物が、神経炎症を抑制する効果を発揮するメカニズムは、詳細は明らかではないが、以下のように推察される。

通常時には、神経を支える役割を果たしているミクログリアは、損傷や神経炎症などのストレスを受けると、活性化し、炎症性サイトカインや活性酸素種を放出し、ニューロンを変性させる。このとき、DYRK1Aを阻害すると、サイクリンD1及びp21が安定

50

化され、Nrf2の分解が停止し、Nrf2が安定化する。このNrf2は炎症誘発性サイトカインを産生する遺伝子の発現を抑制し、ミクログリアの過剰な活性化が抑制される。神経炎症の起点となるミクログリアの活性化が抑制されることで、神経炎症が抑制され、移植効率の向上及び/又は神経細胞保護の効果が発揮されることが考えられる。

但し、本開示はこれらのメカニズムに限定して解釈されなくてもよい。

【0016】

[神経炎症抑制剤]

DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経炎症を抑制するための医薬組成物（以下、本開示に係る神経炎症抑制剤ともいう）に関する。

本開示に係る神経炎症抑制剤は、一又は複数の実施形態において、ミクログリアの過剰な活性化を抑制することで神経炎症を抑制できる。

本開示に係る神経炎症抑制剤は、一又は複数の実施形態において、グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進することでミクログリアの過剰な活性化を抑制し、神経炎症を抑制できる。

本開示においてグリア細胞とは、ニューロン（神経細胞）を支える非ニューロン細胞をいい、一又は複数の実施形態において、ミクログリア、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが挙げられ、好ましくはミクログリアである。

Nrf2は、生体の恒常性維持に重要な転写因子である。

本開示において、Nrf2タンパク質の安定化とは、一又は複数の実施形態において、Nrf2タンパク質の分解が抑制され、Nrf2タンパク質の細胞内量が増加することをいう。Nrf2の安定化は、一又は複数の実施形態において、実施例を参照して確認できる。

【0017】

本開示に係る神経炎症抑制剤は、一又は複数の実施形態において、周知の製剤技術を適用し、投与形態に適した剤形とすることができる。その投与形態としては、これらに限定されないが、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、丸剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤等の剤形による経口投与が挙げられる。或いは、注射剤、液剤、エアゾール剤、座剤、貼布剤、パップ剤、ローション剤、リニメント剤、軟膏剤、点眼剤等の剤形による非経口投与を挙げることができる。これらの製剤は、これらに限定されないが、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、安定化剤、矯味矯臭剤、及び希釈剤などの添加剤を用いて周知の方法で製造される。本開示の医薬組成物は、一又は複数の実施形態において、さらに、医薬的に許容される担体、防腐剤、界面活性剤、pH調整剤、希釈剤、上記の添加剤、又はその他の医薬的に許容される成分を含んでよい。

【0018】

前記賦形剤としては、これらに限定されないがデンプン、パレイショデンプン、トウモロコシデンプン等のデンプン、乳糖、結晶セルロース、リン酸水素カルシウム等を挙げることができる。前記滑沢剤としては、これらに限定されないが、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、セラック、タルク、カルナウバロウ、パラフィン等を挙げることができる。前記結合剤としては、これらに限定されないが、ポリビニルピロリドン、マクロゴール及び前記賦形剤と同様の化合物を挙げることができる。前記崩壊剤としては、これらに限定されないが、前記賦形剤と同様の化合物及びクロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類を挙げることができる。前記安定化剤としては、これらに限定されないが、メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェエノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及びソルビン酸を挙げることができる。前記矯味矯臭剤としては、これらに限定されないが、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等を挙げることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

液剤の製造には、溶媒として、これらに限定されないが、エタノール、フェノール、クロロクレゾール、精製水、蒸留水等を使用することができ、必要に応じて界面活性剤又は乳化剤等も使用できる。前記界面活性剤又は乳化剤としては、これらに限定されないが、ポリソルベート 8 0、ステアリン酸ポリオキシル 4 0、ラウロマクロゴール等を挙げるることができる。

【 0 0 2 0 】

本開示に係る神経炎症抑制剤は、神経炎症を伴う疾患に罹患した対象に投与することが挙げられる。神経炎症を伴う疾患としては、一又は複数の実施形態において、前頭側頭葉変性症、筋萎縮性側索硬化症、及び、多発性硬化症が挙げられる。

10

対象は、ヒト、ヒト以外の動物が挙げられる。前記動物としては、一又は複数の実施形態において、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル等の哺乳類が挙げられる。

【 0 0 2 1 】

本開示に係る神経炎症抑制剤の投与量は、症状、年齢、投与方法等により異なりうる。使用方法は、これらに限定されないが、有効成分の化合物の体内濃度が 1 0 0 n M ~ 1 m M の間のいずれかになるように、間欠的若しくは持続的に、経口、経皮、粘膜下、皮下、筋肉内、血管内、脳内、又は腹腔内に投与することができる。

限定されない実施形態として、経口投与の場合、対象（ヒトであれば成人）に対して 1 日あたり、有効成分の化合物に換算して、下限として 0 . 0 1 m g（好ましくは 0 . 1 m g）、上限として、2 0 0 0 m g（好ましくは 5 0 0 m g、より好ましくは 1 0 0 m g）を 1 回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが挙げられる。限定されない実施形態として、静脈内投与の場合には、対象（ヒトであれば成人）に対して 1 日当たり、下限として 0 . 0 0 1 m g（好ましくは 0 . 0 1 m g）、上限として、5 0 0 m g（好ましくは 5 0 m g）を 1 回又は数回に分けて、症状に応じて投与することが挙げられる。

20

【 0 0 2 2 】

よって、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経炎症抑制剤を対象に有効量投与することを含む、神経炎症を抑制する方法に関する。

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経炎症抑制剤を対象に有効量投与することを含む、ミクログリアの過剰な活性化を抑制し、神経炎症を抑制する方法に関する。

30

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経炎症抑制剤を対象に有効量投与することを含む、N r f 2 タンパク質の安定化を促進することでミクログリアの過剰な活性化を抑制し、神経炎症を抑制する方法に関する。

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経炎症抑制剤を対象に有効量投与することを含む、神経炎症を伴う疾患の改善、進行抑制、及び/又は、治療の方法に関する。

【 0 0 2 3 】

〔 移植補助剤 〕

本開示は、一態様において、D Y R K 1 A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植を補助するための医薬組成物（以下、本開示に係る移植補助剤ともいう）に関する。

40

本開示において、細胞の移植とは、一又は複数の実施形態において、移植対象（レシピエント）の特定部位に細胞を移植し、移植した部位及び/又はその周辺部位に生着（定着）させること、ならびに/あるいは、周辺環境に応じて適切に分化させるこという。

移植される特定部位としては、一又は複数の実施形態において、神経系、中枢神経系（例えば、脳、脊髄）、末梢神経系、又は、これらの組織が挙げられる。

本開示において、「移植の補助」とは、一又は複数の実施形態において、移植後の移植された細胞の生存率、定着率、及び/又は、残存率の向上をいう。細胞の生存率、定着率

50

、及び/又は、残存率の向上は、一又は複数の実施形態において、実施例を参照して確認できる。

本開示において、「神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植」は、一又は複数の実施形態において、これらの細胞そのものの移植であってもよく、他の細胞を含む形態で移植であってもよく、器官(臓器)、組織、集合体の一部に神経前駆細胞、幹細胞、及び/又はニューロンが含まれる形態の移植であってもよい。

【0024】

本開示において、「神経前駆細胞」とは、神経細胞に分化しうる細胞をいい、その分化段階は特に制限されない。

本開示で用いられる神経前駆細胞は、一又は複数の実施形態において、神経幹細胞であつてもよい。本開示で用いられる神経前駆細胞は、一又は複数の実施形態において、ヒト等の哺乳動物の脳組織から単離した細胞であってもよい。本開示で用いられる神経前駆細胞は、一又は複数の実施形態において、胚性幹細胞(ES細胞)及びヒト誘導多能性幹細胞(iPS細胞)等の多能性幹細胞から分化誘導させて得られた細胞(それぞれ、ES細胞由来の細胞、iPS細胞由来の細胞という場合がある。)であってもよい。

本開示で用いられる多能性幹細胞は、一又は複数の実施形態において、神経細胞に分化しうる多能性幹細胞、神経幹細胞が挙げられる。多能性幹細胞としては、一又は複数の実施形態において、ES細胞、iPS細胞、核移植によって得られるクローン胚由来の胚性幹(nteS)細胞、精子幹細胞(GS細胞)、胚性生殖細胞(EG細胞)、培養線維芽細胞及び骨髄幹細胞由来の多能性幹細胞(Muse細胞)等が含まれる。

ニューロン(神経細胞)としては、特に限定されないが、一又は複数の実施形態において、神経前駆細胞から分化誘導されたニューロンが挙げられる。

移植される神経前駆細胞及びニューロンとしては、一又は複数の実施形態において、多能性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性ニューロン前駆体細胞及び多能性幹細胞から分化誘導されたドーパミン作動性ニューロンが挙げられる。

【0025】

本開示に係る移植補助剤は、移植対象(レシピエント)に移植する前、移植と同時、又は、移植した後にレシピエントに投与されるように用いることができる。

あるいは、移植補助剤は、移植前に移植される細胞に添加されてもよい。

レシピエントとしては、ヒト又はヒト以外の動物が挙げられる。前記動物としては、一又は複数の実施形態において、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル等の哺乳類が挙げられる。

移植する細胞も、上述のヒト又はヒト以外の動物の細胞とすることができる。

レシピエントと移植する細胞の種は同じでもよく、異なってもよい。

【0026】

本開示に係る移植補助剤の投与量は、投与の目的、投与方法、投与対象の状況(性別、年齢、体重、病状等)によって異なるが、ヒトに対して投与される場合、一又は複数の実施形態において、有効成分が、1日当たり、10~1200mg、又は100~1200mg投与されるように用いられてもよい。あるいは、上述の本開示に係る神経炎症抑制剤と同様でもよい。

【0027】

本開示に係る移植補助剤の投与経路としては、移植部又は移植細胞に直接接触させる、あるいは、経口、経皮、粘膜下、皮下、筋肉内、血管内、脳内、又は腹腔内への投与とすることができる。通常用いられる投与形態としては、例えば、溶剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、舌下錠、シロップ剤、懸濁液等が挙げられる。液剤の形にした移植補助剤を注射剤として非経口的に投与してもよい。上記投与剤形は許容される通常の担体、賦形剤、結合剤、安定剤等に、本開示に係る有効成分を配合することによって製造することができる。本開示に係る移植補助剤を注射剤として用いる場合には、許容される緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等を添加することもできる。

【0028】

10

20

30

40

50

本開示に係る移植補助剤を用いると、一又は複数の実施形態において、移植後のニューロンの対象における生存率、定着率、及び/又は、残存率が向上しうる。

そのため、本開示に係る移植補助剤は、一又は複数の実施形態において、再生医療のための器官（臓器）、組織、又は細胞の移植に使用できる。

また、本開示に係る移植補助剤は、一又は複数の実施形態において、脳梗塞、脊髄梗塞、脳出血、脊髄出血、顔面神経マヒ、四肢神経マヒ、レビー小体型認知症、ダウン症、うつ病、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病及びハンチントン病等の進行性神経脱落を示す神経変性疾患といった神経疾患の手術（治療）における移植に使用できる。

【0029】

よって、本開示は、その他の態様において、本開示に係る移植補助剤を、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植の前、同時、又は後にレシピエントに有効量投与することを含む、移植された前記細胞の生存率を向上させる方法に関する。

10

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る移植補助剤を、移植の前、同時、又は後にレシピエントに有効量投与することを含む、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植方法に関する。

【0030】

[N r f 2 安定化剤]

本開示は、一態様において、D Y R K 1 A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、グリア細胞における N r f 2 タンパク質の安定化を促進するための医薬組成物（以下、本開示に係る N r f 2 安定化剤ともいう）に関する。

20

本開示に係る N r f 2 安定化剤は、一又は複数の実施形態において、グリア細胞における N r f 2 タンパク質の安定化を促進できる。本開示に係る N r f 2 安定化剤は、一又は複数の実施形態において、グリア細胞における N r f 2 タンパク質の安定化を促進することで、グリア細胞の過剰な活性化を抑制できる。ミクログリアの活性化は、神経炎症の起点となることから、本開示に係る N r f 2 安定化剤は、一又は複数の実施形態において、グリア細胞の活性化を抑制でき、神経炎症を抑制できる。

【0031】

本開示に係る N r f 2 安定化剤の投与形態、剤型、投与量等は、本開示に係る神経炎症抑制剤と同様とすることができる。

30

【0032】

本開示に係る N r f 2 安定化剤は、神経炎症を伴う疾患に罹患した対象に投与することが挙げられる。神経炎症を伴う疾患としては、一又は複数の実施形態において、前頭側頭葉変性症、筋萎縮性側索硬化症、及び、多発性硬化症が挙げられる。

対象は、ヒト、ヒト以外の動物が挙げられる。

【0033】

よって、本開示は、その他の態様において、本開示に係る N r f 2 安定化剤を対象に有効量投与することを含む、グリア細胞における N r f 2 タンパク質の安定化を促進する方法に関する。

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る N r f 2 安定化剤を対象に有効量投与することを含む、グリア細胞における N r f 2 タンパク質の安定化を促進し、神経炎症を抑制する方法に関する。

40

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る N r f 2 安定化剤を対象に有効量投与することを含む、神経炎症を伴う疾患の改善、進行抑制、及び/又は、治療の方法に関する。

【0034】

[神経細胞保護剤]

本開示は、一態様において、D Y R K 1 A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、神経炎症から神経細胞を保護するための医薬組成物（以下、本開示に係る神経細胞保護剤ともいう）に関する。

50

本開示に係る神経細胞保護剤は、一又は複数の実施形態において、グリア細胞における N r f 2 タンパク質の安定化を促進することで、グリア細胞の過剰な活性化を抑制できる。ミクログリアの活性化は、神経炎症の起点となることから、グリア細胞の活性化を抑制することで神経炎症を抑制し、神経細胞の保護が達成できる。

【 0 0 3 5 】

本開示に係る神経細胞保護剤の投与形態、剤型、投与量等は、本開示に係る神経炎症抑制剤と同様とすることができる。

【 0 0 3 6 】

本開示に係る神経細胞保護剤は、神経炎症を伴う疾患に罹患した対象に投与することが挙げられる。神経炎症を伴う疾患としては、一又は複数の実施形態において、前頭側頭葉変性症、筋萎縮性側索硬化症、及び、多発性硬化症が挙げられる。

対象は、ヒト、ヒト以外の動物が挙げられる。

【 0 0 3 7 】

よって、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経細胞保護剤を対象に有効量投与することを含む、神経炎症から神経細胞を保護する方法に関する。

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経細胞保護剤を対象に有効量投与することを含む、神経炎症を抑制することにより神経細胞を保護する方法に関する。

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経細胞保護剤を対象に有効量投与することを含む、グリア細胞の活性化を抑制して神経炎症を抑制することにより神経細胞を保護する方法に関する。

また、本開示は、その他の態様において、本開示に係る神経細胞保護剤を対象に有効量投与することを含む、神経炎症を伴う疾患の改善、進行抑制、及び/又は、治療の方法に関する。

【 0 0 3 8 】

[有効成分]

本開示に係る医薬組成物（神経炎症抑制剤、移植補助剤、N r f 2 安定化剤及び神経細胞保護剤）の有効成分（本開示に係る有効成分ともいう）は、D Y R K 1 A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩である。

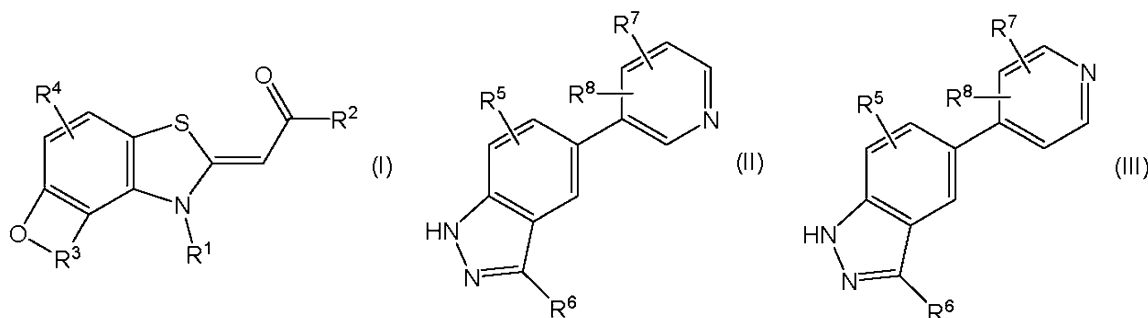
D Y R K 1 A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物は、一又は複数の実施形態において、W O 2 0 1 8 / 0 4 3 6 7 4 及び W O 2 0 1 5 / 1 0 7 9 4 5 に開示されているものが使用できる。これらの文献の内容は本開示の一部を構成するものとして援用される。

D Y R K 1 A は、サイクリン D 1 をリン酸化することで、サイクリン D 1 及び p 2 1 の分解を促進する。

【 0 0 3 9 】

本開示における D Y R K 1 A タンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物は、一又は複数の実施形態において、下記式 (I) から (I I I) で表される化合物からなる群から選択される少なくとも 1 つが挙げられる。

【 化 1 】



式 (I) において、R¹及びR²は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数 1 から 6 の炭化水素鎖であり、R³は、- C H₂ - C H₂ - 又は - C H = C H - であり、R⁴は、水素原

子、ハロゲン原子又は炭素数 1 から 6 のアルキル基であり、

式 (I I) 及び (I I I) において、 R^5 、 R^6 、 R^7 及び R^8 は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、カルボキシル基、アミノ基、水酸基、炭素数 1 から 4 のアルキル基、又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 から 4 のアルキル基である。

【 0 0 4 0 】

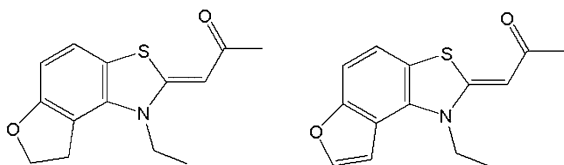
一般式 (I) 中、 R^1 は、一又は複数の実施形態において、炭素数 1 から 6 のアルキル基であり、さらなる一又は複数の実施形態において、メチル基、エチル基、又はプロピル基である。一般式 (I) 中、 R^2 は、一又は複数の実施形態において、炭素数 1 から 6 のアルキル基であり、さらなる一又は複数の実施形態において、メチル基である。一般式 (I) 中、 R^4 は、一又は複数の実施形態において、水素原子である。

10

【 0 0 4 1 】

前記一般式 (I) で表される化合物は、一又は複数の実施形態において、

【 化 2 】



で表される化合物である。

20

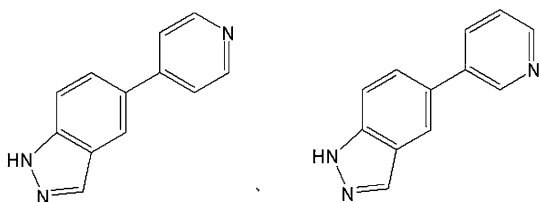
【 0 0 4 2 】

一般式 (I I) 及び (I I I) 中、 R^5 、 R^6 、 R^7 及び R^8 は、一又は複数の実施形態において、水素原子である。

【 0 0 4 3 】

前記一般式 (I I) 及び (I I I) で表される化合物は、一又は複数の実施形態において、

【 化 3 】



30

で表される化合物である。

【 0 0 4 4 】

本開示において「製薬上許容される塩」とは、薬理上及び/又は医薬上許容される塩を含有し、例えば、無機酸塩、有機酸塩、無機塩基塩、有機塩基塩、酸性又は塩基性アミノ酸塩などが挙げられる。

【 0 0 4 5 】

前記無機酸塩の好ましい例としては、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩などが挙げられ、有機酸塩の好ましい例としては、例えば酢酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、ステアリン酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩などが挙げられる。

40

【 0 0 4 6 】

前記無機塩基塩の好ましい例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。前記有機塩基塩の好ましい例としては、例えばジエチルアミン塩、ジエタノールアミン塩、メグルミン塩、*N*、*N'*-ジベンジルエチレンジアミン塩などが挙げられる。

【 0 0 4 7 】

50

前記酸性アミノ酸塩の好ましい例としては、例えばアスパラギン酸塩、グルタミン酸塩などが挙げられる。前記塩基性アミノ酸塩の好ましい例としては、例えばアルギニン塩、リジン塩、オルニチン塩などが挙げられる。

【0048】

本開示において「化合物の塩」には、化合物が大気中に放置されることにより、水分を吸収して形成されうる水和物が包含され得る。また、本開示において「化合物の塩」には、化合物が他のある種の溶媒を吸収して形成されうる溶媒和物も包含され得る。

【0049】

本開示においてアルキル基は、一又は複数の実施形態において、直鎖若しくは分枝若しくは環状のアルキル基が挙げられる。本開示において「炭素数1から4のアルキル基」とは、一又は複数の実施形態において、炭素数1、2、3又は4個の直鎖若しくは分枝若しくは、炭素数3又は4個の環状のアルキル基である。炭素数1、2、3又は4個の直鎖又は分枝のアルキル基としては、一又は複数の実施形態において、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基が挙げられる。炭素数3又は4個の環状のアルキル基としては、一又は複数の実施形態において、シクロプロピル基、シクロブチル基などが挙げられる。

【0050】

本開示において「炭素数1から6の炭化水素鎖」とは、炭素数1、2、3、4、5又は6個の脂肪族炭化水素から任意の水素原子を1個除いて誘導される一価の基をいう。炭化水素鎖は、一又は複数の実施形態において、直鎖構造でも分岐鎖構造でも環状構造でもよく、アルキル基、アルケニル基、フェニル基、又はシクロアルキル基が挙げられる。本開示において「炭素数1から6のアルキル基」は、一又は複数の実施形態において、メチル基、エチル基、1-プロピル基、2-プロピル基、2-メチル-1-プロピル基、2-メチル-2-プロピル基、1-ブチル基、2-ブチル基、1-ペンチル基、2-ペンチル基、3-ペンチル基、2-メチル-1-ブチル基、3-メチル-1-ブチル基、2-メチル-2-ブチル基、3-メチル-2-ブチル基、2,2-ジメチル-1-プロピル基、1-ヘキシル基、2-ヘキシル基、3-ヘキシル基、2-メチル-1-ペンチル基、3-メチル-1-ペンチル基、4-メチル-1-ペンチル基、2-メチル-2-ペンチル基、3-メチル-2-ペンチル基、4-メチル-2-ペンチル基、2-メチル-3-ペンチル基、3-メチル-3-ペンチル基、2,3-ジメチル-1-ブチル基、3,3-ジメチル-1-ブチル基、2,2-ジメチル-1-ブチル基、2-エチル-1-ブチル基、3,3-ジメチル-2-ブチル基、又は2,3-ジメチル-2-ブチル基等が挙げられる。

本開示においてハロゲン原子は、一又は複数の実施形態において、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子が挙げられる。

【0051】

本開示は以下の一又は複数の実施形態に関する；

[1] DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物又はその製薬上許容される塩を有効成分として含有する、

神経炎症を抑制するための医薬組成物。

[2] 神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び/又はニューロンの移植を補助するための、[1]に記載の医薬組成物。

[3] グリア細胞におけるNrf2タンパク質の安定化を促進するための、[1]に記載の医薬組成物。

[4] 神経炎症から神経細胞を保護するための、[1]に記載の医薬組成物。

[5] 前頭側頭葉変性症、筋委縮性側索硬化症、及び多発性硬化症からなる群から選択される神経炎症を伴う疾患の、改善、進行抑制、及び/又は、治療のための、[1]に記載の医薬組成物。

[6] DYRK1Aタンパク質のリン酸化活性の阻害能を有する化合物が、下記式(I)から(III)で表される化合物からなる群から選択される少なくとも1つであり、

10

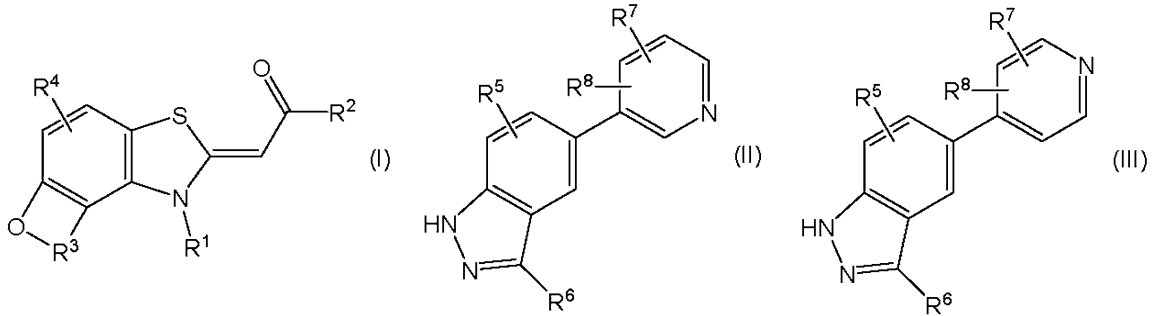
20

30

40

50

【化 4】



10

式 (I) において、R¹ 及び R² は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数 1 から 6 の炭化水素鎖であり、R³ は、-CH₂-CH₂- 又は -CH=CH- であり、R⁴ は、水素原子、ハロゲン原子又は炭素数 1 から 6 のアルキル基であり、

式 (II) 及び (III) において、R⁵、R⁶、R⁷ 及び R⁸ は、それぞれ独立して、水素原子、ハロゲン原子、カルボキシル基、アミノ基、水酸基、炭素数 1 から 4 のアルキル基、又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 から 4 のアルキル基である、

[1] から [5] のいずれかに記載の医薬組成物。

[7] [1] から [6] のいずれかに記載の医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、神経炎症を抑制する方法。

20

[8] [1] から [6] のいずれかに記載の医薬組成物を、神経前駆細胞、多能性幹細胞、及び / 又はニューロンの移植の前、同時、又は後にレシピエントに有効量投与することを含む、移植された前記細胞の生存率、定着率、及び / 又は、残存率を向上させる方法。

[9] [1] から [6] のいずれかに記載の医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、グリア細胞における Nrf 2 タンパク質の安定化を促進する方法。

[10] [1] から [6] のいずれかに記載の医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、神経炎症から神経細胞を保護する方法。

[11] [1] から [6] のいずれかに記載の医薬組成物を、対象に有効量投与することを含む、前頭側頭葉変性症、筋委縮性側索硬化症、及び多発性硬化症からなる群から選択される神経炎症を伴う疾患の、改善、進行抑制、及び / 又は、治療の方法。

30

【実施例】

【 0 0 5 2 】

以下、実施例により本開示をさらに詳細に説明するが、これらは例示的なものであって、本開示はこれら実施例に制限されるものではない。なお、本開示中に引用された文献は、すべて本開示の一部として組み入れられる。

【 0 0 5 3 】

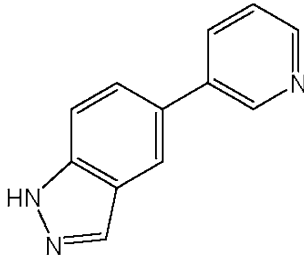
化合物 1

下記化合物 1 は、WO 2 0 1 8 / 0 4 3 6 7 4 に開示される方法で合成された。なお、DYRK 1 A に対する *in vitro* キナーゼ活性における化合物 1 の IC₅₀ は、7 6 . 9 5 n M である。

40

【化5】

化合物1



10

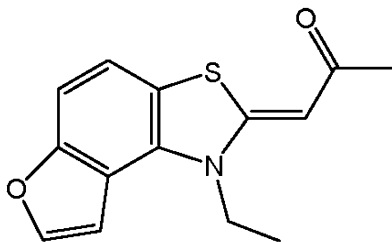
【0054】

化合物2

下記化合物2は、WO2015/083750に開示される方法で合成された。なお、DYRK1Aに対する*in vitro*キナーゼ活性における化合物2のIC₅₀は、32.95 nMである。

【化6】

化合物2



20

【0055】

統計

3回以上の実験から得られた結果は、平均値±SEMとして表される。統計的に有意な差は、両側の対応のないスチューデント検定又は一元配置分散分析(ANOVA)に続いて、Tukey-Kramer比較検定を使用して決定された。0.05未満のP値を有意差があるとみなし、単一のアスタリスク(*)で、0.01未満のP値は、二重アスタリスク(**)で示す。

30

【0056】

画像解析

細胞を96ウェルのピュアコートアミンコーティングプレートに播種し、特定の実験ごとに必要に応じて処理した。免疫標識が完了した後、Harmonyソフトウェアを備えたOpera Phenix(Perkin Elmer社製)を用いて自動で画像を取得し(対物レンズの20倍の倍率、2x2CCDピニング、ウェルあたり25フィールド)、分析した。画像取得には、蛍光顕微鏡(BZ-9000、Keyence社製)又は共焦点顕微鏡(SP-8、Leica社製)も使用した。

40

【0057】

動物モデル

8~9週齢のC57black/6Jマウスに、LPS(O55:B5)(Sigma社製、L2880)を1日1回、4日間1mg/kgで腹腔内注射した。hiPSC由来のドーパミン(DA)作動性神経前駆細胞は、4週齢のSCIDマウスの線条体に移植した。薬物処理は、LPS又はiPSC移植の1時間前に行われた。

【0058】

試薬

リポ多糖(LPS)はSigma-Aldrichから入手した。小分子化合物はジメチルスルホキシド(DMSO、ナカライテスク社製)に溶解して、*in vitro*アッセイ用に50mMのス

50

トック溶液とした。s i R N AはAmbion又はDharmaconから購入した。ウエスタンブロット用のウサギポリクローナル抗N r f 2 (MBL)、免疫細胞化学用のウサギポリクローナル抗N r f 2 (abcam)、マウスモノクローナル抗p 2 1 (abcam)及びウサギポリクローナル抗サイクリンD 1 (Cell Signaling)、ラット抗C d 1 1 b (abcam)、ニワトリポリクローナル抗T H (abcam)、ウサギポリクローナル抗I b a 1 (Wako)、ヤギポリクローナル抗G F A P (Millipore)、ラット抗N u r r 1 (KAN研究所から提供)、マウスモノクローナル抗h N u c l e i (abcam)、及びウサギポリクローナルH R P結合抗G A P D H (MBL)を使用した。

【 0 0 5 9 】

細胞培養

ミクログリア細胞株B V - 2は、1 0 %ウシ胎児血清(ニチレイバイオサイエンス)、1 0 0 U / m Lペニシリン、1 0 0 μ g / m Lストレプトマイシンを添加した高グルコースダルベッコ変法イーグル培地(D M E M) (ナカライテスク)で維持した。初代海馬及び皮質ニューロン培養物は、胎生1 8日マウスから調製し、2 % B 2 7サプリメント、1 0 0 U / m L、ペニシリン、1 0 0 μ g / m Lストレプトマイシン、及び0 . 5 m M L - グルタミンを補充したN e u r o b a s a l培地(Life Technologies)で維持した。ドーパミン作動性ニューロン培養は、胎生1 3日目マウスの腹側中脳から調製し、1 0 %ウシ胎児血清、2 % B 2 7サプリメント、1 0 n g / m L G D N F、1 0 0 U / m Lペニシリン、及び1 0 0 μ g / m Lストレプトマイシンを添加したN e u r o b a s a l培地(Life Technologies)で維持した。グリア細胞除去のため、5 μ Mシトシン - D - アラビノフラノシド、1 0 μ M 5 - フルオロウラシル、及び1 0 μ Mウリジン(すべてSigma-Aldrich製)を培養2日目に添加した。混合グリア培養物は、新生児マウス仔(P 1 ~ P 4)から得て、T 7 5又はT 1 7 5フラスコで維持した。細胞がコンフルエントになるまで、3 ~ 4日ごとに培地を交換した。ミクログリアは、激しく振盪するか、C d 1 1 b陽性選択(Invitrogen)のいずれかによって得られた。共培養実験のために、マウスのグリア細胞培養を胎生1 3日目のM G E (M e d i a l G a n g l i o n i c e m i n e n c e)から調製し、P L L被覆皿で培養した。培養物をトリプシンで2回継代し、i P S C由来ニューロンとの共培養アッセイに使用した。1 0 3 9 A 1 i P S細胞は、以前に記載されているように確立及び維持された(Nakagawa et al., Sci Rep 4, 3594, 2014)。ドーパミン作動性前駆細胞の誘導は、以前に説明されているように実行された(Doi et al., Stem Cell Reports 2, 337-350, 2014、Kikuchi et al., Nature 548, 592-596, 2017)。簡単には、h i P S細胞1 0 3 9 A 1は、L a m i n i n 5 1 1上に播種し、8 % K S R、Y 2 7 6 3 2 (Wako)、A - 8 3 - 0 1 (Wako)及びL D N 1 9 3 1 7 8 (STEMGENT)を含むG M E M培地中で分化させた。ブルモルファミン(Wako)、F G F 8 (Wako、1日目から7日目)、及びC H I R 9 9 0 2 1 (Wako、3日目から12日目)を添加した。C o r i n +細胞の細胞選別後、細胞をニューロスフェア培養用の低接着9 6ウェルプレートに再播種し、B 2 7サプリメント、2 m M L - グルタミン(Invitrogen)、1 0 n g / m L G D N F、2 0 0 μ Mアスコルビン酸、2 0 n g / m L B D N F (すべてWako製)、及び4 0 0 μ M d b c A M P (Sigma-Aldrich)を添加したn e u r o b a s a l培地でさらに2週間維持した。アポトーシスを避けるため

【 0 0 6 0 】

免疫細胞化学

細胞を4 %パラホルムアルデヒドで1 0分間固定した後、0 . 2 % T r i t o n X - 1 0 0で1 0分間透過処理した。P B Sで洗浄した後、細胞を5 %正常口バ血清(Jackson ImmunoResearch Laboratories) / 1 % B S A (SIGMA A7906) / P B Sでブロックし、各一次抗体で標識した。P B Sで洗浄した後、一次抗体を対応する蛍光標識二次抗体で標識した。H o e c h s t 3 3 3 4 2を使用して核を検出した。

【 0 0 6 1 】

R N A抽出及び定量的R T - P C R

10

20

30

40

50

R N e a s y キット (Qiagen) で全 RNA を抽出した後、i S c r i p t (Bio - Rad) を使用して c D N A を合成した。S Y B R g r e e n E x T a q (TaKaRa) を用いて定量 P C R を実施した。遺伝子のプライマーは、P r i m e r B a n k を使用して設計した (Wang et al., 2012)。

【 0 0 6 2 】

免疫ブロッティング

プロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) 及びホスファターゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク) を含む R I P A バッファー (和光) を使用して、細胞培養サンプルから総タンパク質を抽出した。4、15、000 rpm で 15 分間の遠心分離後、上清を収集し、P i e r c e 660 nm P r o t e i n A s s a y K i t (Thermo Scientific) を使用してタンパク質濃度を測定した。次に、タンパク質を 5 ~ 20 % 勾配 S D S / P A G E ゲル (ATTO) で分離し、エレクトロブロッティングによりポリフッ化ビニリデン膜 (Millipore) に転写した。膜は B l o c k i n g O n e (ナカライテスク) でブロックされ、その後、示された抗体でプローブされた。I m m u n o s t a r 化学発光 (Wako) 及び C h e m i D o c イメージングシステム (Bio - Rad) を使用して検出を行った。

10

【 0 0 6 3 】

インビトロ酵素活性アッセイ

インビトロキナーゼ活性アッセイは、以前に記載されたように実施された (Ogawa et al., Nat Commun 1, 86, 2010)。

20

【 0 0 6 4 】

薬物処理研究

化合物 1 は、最初に D M S O に 100 mg / m L の濃度で溶解し、生理食塩水中の 10 % T w e e n 80 (ポリソルベート 80 (H X 2)、HOF Corporation 社製) で所望の濃度に希釈し、0.05 mL / k g の量で皮下に送達された。化合物 2 は、0.5 % カルボキシメチルセルロース (ナカライテスク) に懸濁し、所望の濃度で 0.1 mL / k g の量で経口投与した。薬物処理動物を採血のためにイソフルランで麻酔し、その後生理食塩水で灌流した。脳ホモジネートは、5 倍量の生理食塩水で B e a d s C r u s h e r μ T - 12 システム (TAITEC) を使用して調製した。血清及び脳ホモジネート中の標的化合物、ドーパミンの濃度は、A g i l e n t 1290 ナノフロー H P L C システム (Agilent Technologies) を搭載した A g i l e n t 6420 Q - T O F 質量分析計を使用した L C / M S で分析した。ドーパミンの測定には、酸化を防ぐために 50 mg / m L アスコルビン酸を添加した。

30

【 0 0 6 5 】

免疫組織化学

成体マウスの脳を P B S で灌流し、4 % パラホルムアルデヒドで固定し、30 % スクロース / P B S で平衡化した後、40 μ m 切片をビブラトーム (ライカ) 又はクリオスタット (ライカ) で 20 μ m 切片に切断した。H i s t o O n e (ナカライテスク) を使用して抗原を回収した後、組織を指定の抗体で染色した。

【 0 0 6 6 】

[実験例 1 : p 2 1 と N r f 2 の誘導]

化合物 1 及び 2 は、グリア細胞において、p 2 1 と N r f 2 を誘導することを確認した。図 1 A は、ミクログリア系細胞 B V - 2 を化合物 1 で処理したときのウエスタンブロット分析の結果である。B V - 2 細胞を、指定濃度、指定期間、化合物 1 で処理した。処理後の試料を、示された抗体を用いてウエスタンブロット分析した。図 4 A に示すとおり、B V - 2 細胞において、化合物 1 により、時間依存的及び容量依存的に、サイクリン D 1、p 2 1、及び N r f 2 がアップレギュレートされていた。

図 1 B は、化合物 1 及び 2 で処理されたグリア細胞の代表的な画像である。細胞は、抗 N r f 2 (疑似色)、C d 1 1 b (マゼンタ、ミクログリア) 及び G F A P (緑、星状細胞) 抗体で視覚化された。スケールバー = 25 μ m。

40

50

図1Cは、Cd11b陽性細胞の核におけるNrf2のシグナル強度の定量化の例である。グリア細胞は、示された期間、濃度の化合物1、2で処理された。

図1B及びCから、化合物1又は2により、Cd11b陽性ミクログリア細胞でNrf2の発現が誘導されることが確認された。

さらに、p21 siRNAで処理した細胞では化合物1又は2で処理してもNrf2発現が増加しなかったが、コントロールsiRNAで処理した細胞では化合物1又は2で処理するとNrf2発現が増加した(データ示さず)。

これらのことから、化合物1又は2の処理は、サイクリンD1/p21複合体を安定化することでNrf2の誘導を媒介すると考えられる。

【0067】

[実験例2: 化合物1及び2は、Nrf2の安定化を通し、神経炎症を抑制する]

化合物1及び2がミクログリアのサイトカイン産生を抑制するかどうかを調べた。

図2Aは、LPS処理時のサイトカイン、ケモカイン、及びiNOSのmRNAの産生をqPCRで評価した結果である。*P<0.05。

図2Bは、LPS刺激により産生されたサイトカインをELISAで定量化した結果である。*P<0.05。

これらに示されるように、LPS刺激は炎症誘発性サイトカイン遺伝子発現を劇的に誘導するが、これらのアップレギュレーションは、化合物1又は2処理によって効果的に抑制された。さらに、いくつかのケモカイン及びiNOS mRNA発現の誘導も抑制された(図2A)。

図2Cは、化合物1による、Nrf2の存在下又は非存在下での示されたサイトカインの産生に関するqPCR分析の結果である。Nrf2 siRNAで処理した細胞では、サイトカイン産生抑制は観察されなかった。*P<0.05。

これらの結果は、化合物1又は2の処理が神経炎症を効果的に抑制できることを示している。

さらに、これらの結果は、化合物1及び2による神経炎症の抑制(サイトカイン産生の抑制)が、Nrf2を介して媒介されたことを強く示している。

【0068】

[実験例3: iPSC由来細胞の移植効率の向上効果(in vivo)]

ヒトiPSCからドーパミン作動性ニューロン(DAニューロン)を作製し、マウス脳に移植して、化合物2の処理によりiPSC由来DAニューロンの定着の効率が向上することを確認した。その概要を図3に示す。

図3Aは、実験スキームである。レシピエント(マウス)は、hiPSC由来DAニューロンの移植手術の1時間前に化合物2が投与された。薬物投与は、強力なグリアの活性化が予想される手術後4日後まで4日間連続して行われ、動物は4週間未処置のままにされた。

図3Bは、線条体組織に移植された細胞の代表的な画像である。矢印は、TH又はNurr1(いずれもドーパミン作動性マーカー)で共標識されたiPSC由来細胞を示す。スケールバー=50µm。移植されたDAニューロンはhNuclei染色により同定され、生存したiPSC由来DAニューロンはTH及びNurr1ドーパミン作動性マーカーの共染色で定量化された。

図3Cは、移植細胞の定量分析の結果を示す。hNucleiとTH又はNurr1との二重陽性細胞の数は、hNuclei陽性細胞の数に対して正規化された。各条件に対してN=7及び5。*P<0.05、**P<0.01。

図3の結果から、化合物2による処置は、4週間の移植後のiPSC由来DAニューロンの生存率を改善できることが示された。

【0069】

[実験例4: 神経炎症による神経変性を抑制する効果(in vivo)]

神経炎症によって引き起こされる神経変性を化合物2が低減できることを確認した。その概要を図4に示す。

10

20

30

40

50

図4Aは、実験スキームである。マウスにLPSを腹腔投与することで神経炎症を誘導する。マウスへのLPS注射の1時間前に薬物(化合物2)を投与した。薬物は指定された用量で1日1回経口投与された。

投与後1日目にグリアの活性化とサイトカイン産生を評価した。7日目と14日目にドーパミン作動性神経の変性を評価した(図4B及び4C)。

図4Bは、処理された動物の黒質の代表的な画像である。TH(緑)、Iba1(グレースケール)、及びGFAP(マゼンタ)は、それぞれDAニューロン、ミクログリア、及び星状細胞のマーカーとした。スケールバー=200µm。

図4Cは、黒質緻密質(SNpc)のTH陽性細胞の数を定量化した結果である。N=5~6匹の動物が各条件について分析された。エラーバーはSEMを表す。*P<0.05。

10

化合物2の投与により、グリアの活性化(図4D)及びサイトカイン産生(図4E及びF)が抑制されることが確認された。

図4Dは、最後のLPS注射から1日目の線条体組織のqPCRによるグリア活性化の定量分析の結果である。エラーバーはSEMを表す。*P<0.05。

図4E及びFは、Day1の線条体組織から示されたサイトカインとケモカインのレベルをqPCR(E)とELISA(F)で分析した結果である。エラーバーはSEMを表す。*P<0.05。

重要なことに、ドーパミン作動性ニューロンの損失は、化合物2の投与により救助された(図4B及びC)。すなわち、神経炎症によって引き起こされる神経変性を化合物2が低減できた。

20

【0070】

[実験例5:グリア細胞を介した神経保護メカニズム(in vitro)]

実験例1及び2で示した、神経保護機能(iPS細胞移植の効果向上及び細胞炎症による細胞変性の抑制効果)の作用点がグリア細胞であることを化合物2で確認した。

グリア細胞を介して神経を保護することを確認するため、共培養システムをセットアップした。hiPSC由来ドーパミン作動性神経前駆細胞と、13日胚のマウス脳から分離したグリア培養液とを混合して共培養した。混合グリア培養液には、GFAP陽性及びIba1陽性細胞が含まれていたが、TH陽性細胞は含まれていなかった。

混合グリア培養液に、H₂O₂処理によって酸化ストレスを誘導した(図5)。

30

神経細胞の生存を、免疫染色(図5A及びB)によってヒト核の数で評価した。

Nurr1及びTHのドーパミン作動性マーカーは、qPCRによって評価した(図5C)。

図5Aは、hiPSC由来ドーパミン作動性神経前駆細胞の代表的な画像である。hiPSC由来DAニューロンを、抗hNuclei(緑)、抗Nurr1(赤)、及び抗TH(グレースケール)の抗体を用いて視覚化した。スケールバー=50µm。

図5Bは、hNucleiの数の定量分析である。データは、H₂O₂処理なしのコントロール条件に正規化された。*P<0.05。

図5Cは、qPCRによる定量である。Nurr1及びTHは、それぞれ初期分化及び成熟におけるドーパミン作動性ニューロンのマーカーとして使用された。

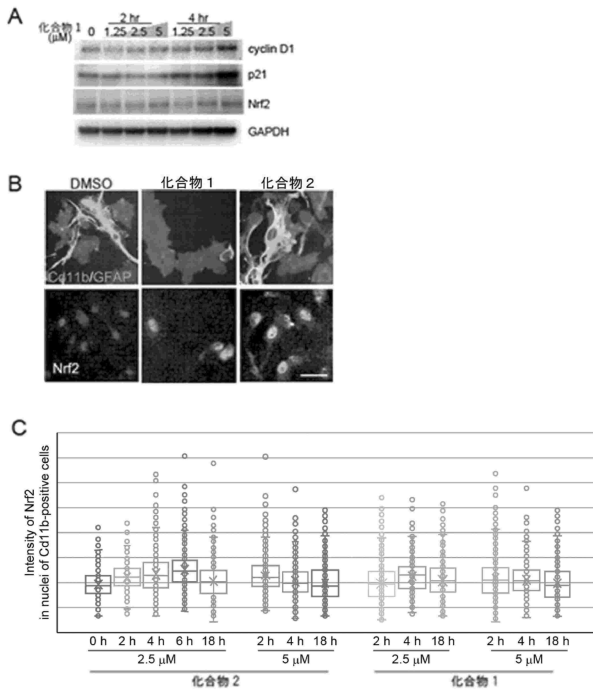
40

図5に示すように、H₂O₂処理による酸化ストレスにより、DAニューロンの生存を低減させるが、化合物2の添加量に依存して生存量が増加する。しかしながら、この化合物2によるニューロンの保護は、グリアがない場合には起こらず、グリアとの共培養のときにのみ起こる。

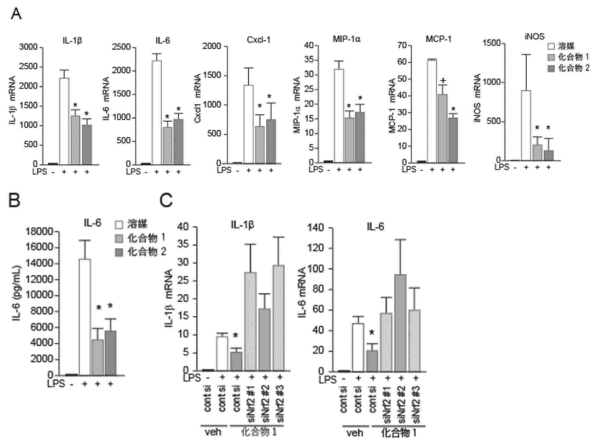
これらのことは、化合物2による神経保護機能の発揮がグリア細胞を介することを、強く示す。

【図面】

【図 1】



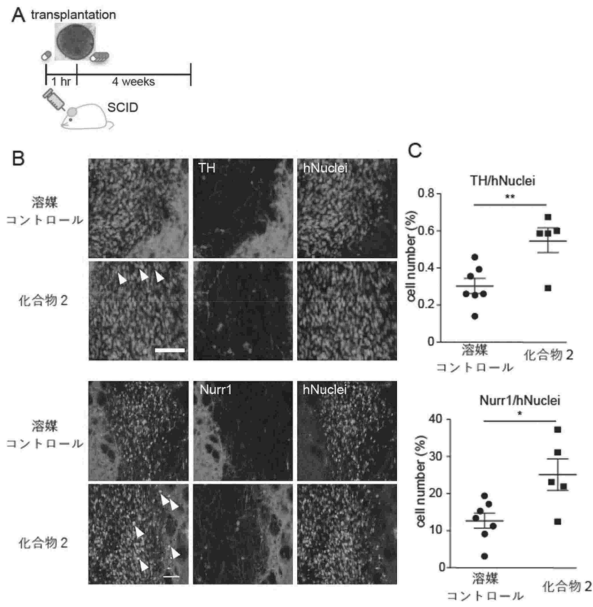
【図 2】



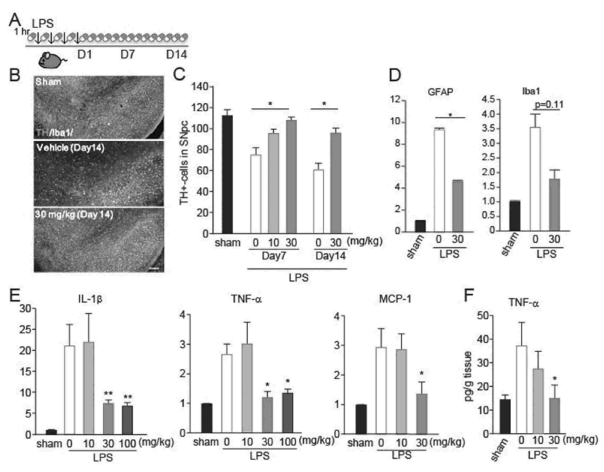
10

20

【図 3】



【図 4】

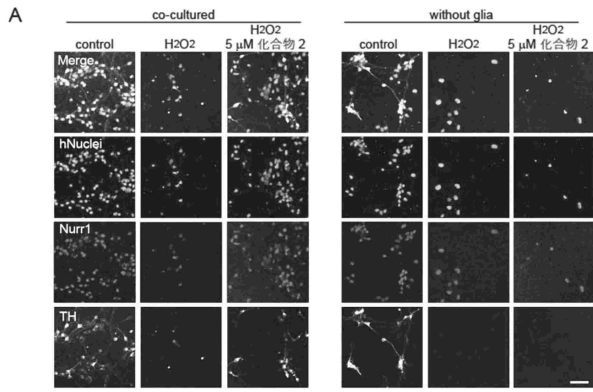


30

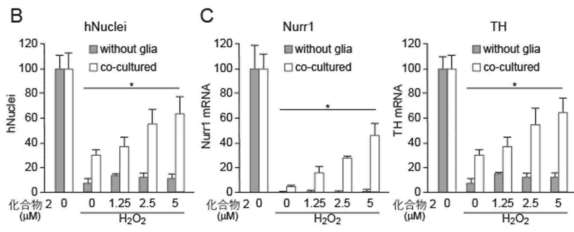
40

50

【 5 】



10



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 0 5

(56)参考文献

国際公開第 2 0 1 5 / 0 8 3 7 5 0 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 8 / 0 4 3 6 7 4 (W O , A 1)

WOO,Hanwoong et al. , The novel DYRK1A inhibitor KD03 alters neuroinflammation in BV2 microglial cells,wild-type, and Alzh , IBRO reports , 2019年 , Vol.6 , p.S130

MELCHIOR,Benoit et al. , ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF SM07883, A NOVEL, POTENT, AND SELECTIVE ORAL DYRK1A INHIBITOR IN NEUROD , Alzheimer's and Dementia , 2019年 , Vol.15,No.7 , Suppl.p.P216

日本臨床 , 2014年 , Vol.72, Suppl.5 , pp.453-458

日本臨床 , 2003年 , Vol.61, No.3 , pp.463-468

Acta Neuropathologica Communications , 2019年 , Vol.7, Article No.46 , pp.1-15

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 1 / 8 0

A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 4 5 / 0 8

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)