

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年2月28日(28.02.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/039574 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61K 31/155 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/031257

(22) 国際出願日: 2018年8月24日(24.08.2018)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2017-160861 2017年8月24日(24.08.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 Kumamoto (JP).

(72) 発明者: 甲斐 広文(KAI Hirofumi); 〒8620973 熊本県熊本市中央区大江本町5-1 国立大

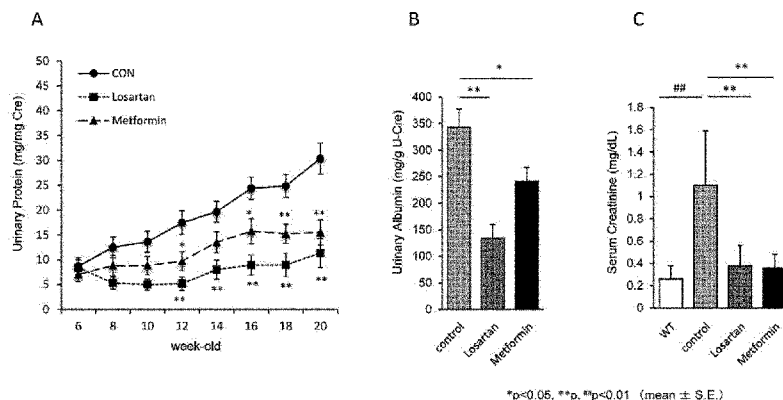
学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 首藤 剛(SHUDOU Tsuyoshi); 〒8620973 熊本県熊本市中央区大江本町5-1 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 大町 紘平(OOMACHI Kouhei); 〒8620973 熊本県熊本市中央区大江本町5-1 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). マリー アン スイコ(Mary Ann Suico); 〒8620973 熊本県熊本市中央区大江本町5-1 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 加世田 将大(KASEDA Masahiro); 〒8620973 熊本県熊本市中央区大江本町5-1 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).

(74) 代理人: 川口 敬義(KAWAGUCHI Takayoshi); 〒8120011 福岡県福岡市博多区博多駅前2-7-12-503 Fukuoka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: NOVEL THERAPEUTIC AGENT RELATING TO THERAPEUTIC AGENT FOR GENETIC RENAL DISEASE ALPORT SYNDROME

(54) 発明の名称: 遺伝性腎疾患アルポート症候群治療薬に係る新規治療薬



(57) Abstract: [Problem] To clarify the pathological mechanism of Alport syndrome (AS) for which no specific remedy is known hitherto and to develop a novel therapeutic method therefor which is more efficacious than the conventional symptomatic treatments. [Solution] A therapeutic agent for AS characterized in that AS is treated by regulating metabolism in renal glomeruli. In particular, a biguanide compound or a salt thereof is usable as an active ingredient for regulating the metabolism in renal glomeruli. Still preferably, metformin or a salt thereof and most preferably metformin hydrochloride can be used therefor.

(57) 要約: 【課題】未だ特異的治療法の存在しないASの病態形成機構の解明と、既存の対症療法よりもさらに効果的な新規治療方法の開発。【解決手段】腎糸球体の代謝調整を行うことにより、アルポート症候群の治療を行うことを特徴とするアルポート症候群治療薬。特に、これら腎糸球体の代謝調整を行う有効成分として、ビグアナイド系化合物もしくはその塩を用いることができ、さらに好ましくはメトホルミンないしその塩、最も好ましくはメトホルミン塩酸塩を用いることができる。

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：

遺伝性腎疾患アルポート症候群治療薬に係る新規治療薬

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝性腎疾患であるアルポート症候群の治療薬に関する。

背景技術

[0002] アルポート症候群（AS）は、腎糸球体基底膜を構成するIV型コラーゲン遺伝子の変異によって生じる遺伝性の腎疾患であり、代表的な小児腎疾患である（特許文献1）。

ASは腎不全進行を予防する目的で、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン阻害をメカニズムとする治療薬が用いられている。しかしながら、これらの治療薬は対症療法に過ぎず、ASの根治的な治療はない。このような事情もあって、AS患者の多くは、最終的に末期腎不全への移行を余儀なくされているのが現状である。

[0003] 現在、AS患者は、日本には1200人ほど存在すると推計されている。また、欧米では、5千人から1万人に1人の割合で発症すると言われており、AS患者・患者家族を支援し、治療研究の助成を行うためのAlport Syndrome Foundationも存在している。

[0004] 一方、メトホルミンは、1959年に国際誕生した経口糖尿病治療薬であり、日本においても、メトホルミン塩酸塩を有効成分として、多くの製薬メーカーから販売されている。メトホルミンは、肝臓での糖新生の抑制、グルコガンによる肝細胞でのグリコーゲン分解抑制・インスリン抵抗性の改善を通じて、血糖値の上昇抑制等の糖尿病治療効果を発揮する。ASにおけるメトホルミンの治療効果については、明らかとなっていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2014／058881号パンフレット

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] このような状況から発明者らは、未だ特異的治療法の存在しないASの病態形成機構の解明と、既存の対症療法よりもさらに効果的な新規治療方法の開発について、研究を開始したものである。

上記事情を背景として本発明では、ASについて新規な治療方法の開発を課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、鋭意研究の結果、ASモデルマウスの腎系球体において、複数の分子が発現異常を起こしていることを明らかにした。加えて、これら分子について解析を行ったところ、複数の細胞内代謝経路が過剰に促進されていることを発明者らは見出したものである。

これらより発明者らは、ASにおいて、腎系球体における細胞内代謝を改善させることでASの治療が行えることに想到し、細胞内代謝改善薬の一つとしてメトホルミンを用いたところ、ASモデルマウスにおいて治療効果がみられることを実験的に確認し、発明を完成させたものである。

[0008] 本発明は、以下の構成からなる。

本発明の第一の構成は、腎系球体の代謝調整を行うことにより、アルポート症候群の治療を行うことを特徴とするアルポート症候群治療薬である。

本発明の第二の構成は、腎系球体の代謝調整が、ビッグアニド系化合物もしくはその塩を有効成分としてなされることを特徴とする第一の構成に記載のアルポート症候群治療薬である。

本発明の第三の構成は、ビッグアニド系化合物が、メトホルミンないしその塩であることを特徴とする第二の構成に記載のアルポート症候群治療薬である。

本発明の第四の構成は、メトホルミンないしその塩が、メトホルミン塩酸塩であることを特徴とする第三の構成に記載のアルポート症候群治療薬である。

発明の効果

[0009] 本発明により、ASにおいて新規治療方法の提供が可能となった。すなわち、ASでは、腎糸球体における代謝異常を調整することにより、治療効果がもたらされることが明らかとなるとともに、そのような治療薬として、ビッグアニド系化合物もしくはその塩を用いればよいことが明らかとなった。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ASモデルマウスの腎糸球体におけるプロテオミクス解析の結果を示したグラフ。

[図2]実験方法の概容を説明した図。

[図3]ASモデルマウスにおいて、メトホルミンが、腎機能に与える影響を調べた結果を示した図。

[図4]ASモデルマウスにおいて、メトホルミンが、腎組織障害に与える影響を調べた結果を示した図。

[図5]ASモデルマウスにおいて、メトホルミンが、各種炎症関連因子に与える影響を調べた結果を示した図。

[図6]ASモデルマウスにおいて、メトホルミンが、各種繊維化関連因子に与える影響を調べた結果を示した図。

[図7]ASモデルマウスにおいて、メトホルミンが、AS腎糸球体障害に与える影響を調べた結果を示した図。

発明を実施するための形態

[0011] ここでは、本発明のアルポート症候群治療薬（以下、「AS治療薬」と略する）について、説明を行う。

[0012] 本発明におけるAS治療薬は、腎糸球体における代謝調整を行うことを特徴とする。

本発明において「代謝調整を行う」とは、広義には、腎糸球体における代謝を整えることとして定義され、狭義には、本発明で明らかとなった腎糸球体における代謝異常（Complex I biogenesis, Respiratory electron transport, Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic, The

citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport) の過剰な促進を抑制することとして定義される。

[0013] 本発明において腎糸球体における代謝調整は、ビグアナイド系化合物もしくはその塩を有効成分としてなされることが好ましい。すなわち、メトホルミンは、腎における代謝調整ならびにASにおいて治療効果を発揮する化合物として発明者らにより見出された化合物である。これより、メトホルミンをはじめとするビグアナイド系化合物は、メトホルミンと同様の薬理機序を有することから、腎糸球体において代謝調整を行うことにより、ASにおける治療効果を発揮することが期待できる。

このようなビグアナイド系化合物として、例えば、メトホルミン (1,1-Dimethylbiguanide) 、ブホルミン (1-Butylbiguanide) もしくはこれらの塩を用いることが好ましい。

[0014] ビグアナイド系化合物として、メトホルミンないしその塩を用いることが好ましく、このような化合物として、メトホルミン塩酸塩を用いることがさらに好ましい。

すなわち、メトホルミンは、古くから糖尿病治療薬として用いられており、その体内動態や安全性など医薬品性能に関する知見が十分に蓄積している化合物である。これより、メトホルミン塩酸塩をはじめとするメトホルミンないしその塩を、腎糸球体における代謝調整に用いることにより、医薬品としての開発を加速することができる効果を有する。

[0015] なお、本発明において、各種化合物ないしその塩（以下、これらを合わせて「有効成分化合物」という）を有効成分として用いる場合、有効成分化合物についてそのままの化学構造を保持した形で有効成分としてもよいし、本発明の趣旨に鑑み、生体内における代謝等を受けて化合物の構造を変化させ有効成分化合物として作用する、もしくは、血中半減期を長くするための化学的修飾を行うなどの、いわゆるDDS化された有効成分化合物を含むものとしてもよい。

[0016] 本発明の薬剤の剤形について、特に限定する必要はなく、種々の剤形を用

いることができる。典型的には、経口用錠剤が挙げられるが、これに限定する必要はなく、カプセル剤、散剤、経皮吸収型製剤、注射剤など種々の形態を採用することができる。

本発明において、「AS治療」とは、ASの根治を当然に意味するものではなく、その症状の改善や進行の抑制、予防を行うことを含む概念として定義される。

典型的には、AS患者に投与を行うことにより、尿たんぱくの減少や、腎組織繊維化等のASに生じる症状を抑制することなどがASの治療として挙げられる。

実施例

[0017] 以下、実験例を示して、本発明について詳述する。

[0018] <<実験方法概略>>

<マウス>

各実験例で用いたX連鎖型Alport症候群モデルマウス (Col4a5 tm1Yseg G5X mutant) は、ジャクソンラボラトリーから購入した。検討には購入したAlport症候群マウスを繁殖させた仔マウスを用いた。また、同週齢のC57BL/6 マウス (日本チャールズリバーより購入) をWTマウスのコントロールとした。

これらのマウスを、図2の実験概容の条件にて用いた。

[0019] <薬物投与>

Losartan, Metformin, とともに自由飲水による投与を行った。

[0020] <採尿>

尿について、マウスが餌や水が自由に摂取・行動できる代謝ケージを用い、24時間で蓄積された尿を攪拌し回収した。回収された尿は、夾雑物を除くため、4℃、12,000rpmで5分間遠心し、-80℃で保存した。

[0021] <尿中アルブミン測定>

尿中のアルブミンは、ExocellのAlbumin定量ELISA kitであるAlbuwellを用い、製品プロトコールに従い測定を行った。得られた値は、尿中クレアチニン値で補正し、U-Albumin値として算出した。

[0022] ＜タンパク尿スコア＞

タンパク尿スコアは、尿中総タンパク質濃度／尿中クレアチニン濃度の比で算出した。尿中総タンパク質濃度は、Bradford 法を用いて測定した。尿中クレアチニン値は、クレアチニン測定キットを用いプロトコールに従い測定を行った。

[0023] ＜血清クレアチニン＞

血液は、ジエチルエーテル麻酔下でマウスの下大静脈より約500 μ Lを採取した。その後、遠心（3,000 rpm, 15分, 4℃）を行い、得られた血清を-80℃で保存し、試料とした。Serum Creは富士ドライケムを用い、プロトコールに従い測定した。

[0024] ＜パラフィン切片の作成＞

マウスより腎臓を摘出後、10%ホルマリン溶液中で3日間ローテートし、固定した（ホルマリンは24時間毎に新鮮なものに交換した）。ホルマリン固定後、PBS（-）により洗浄し、EtOH, JFCを用いて脱水した。次に、HISTO5によってパラフィン置換を行い、Leica EG1160を用いてパラフィンプロックを作製した。パラフィンプロックは4℃で保存した。作製したパラフィンプロックはLeica RM2125RTを用いて薄切を行い、マスコートガラス（マツナミ）に乗せ12時間37℃で乾燥し、切片を作製した。

[0025] ＜PAS染色＞

腎切片はキシレン用いて脱パラフィン操作を行い、その後エタノールを用いて脱キシレン操作を行った。PAS染色はPeriodic Acid Schiff stainingキットを用いて行い、ヘマトキシリン染色によって核染色を行った。PAS染色後、切片はエタノール、キシレンによって段階的に脱水、透徹を行い、カナダバルサムによって封入した。染色画像はKeyenceによって撮影した。

[0026] ＜Masson' s Trichrome 染色＞

腎切片はキシレンを用いて脱パラフィン操作を行い、その後エタノールを用いて脱キシレン操作を行った。その後Bouin' s solutionにより、室温で14時間固定した。染色はMasson' s Trichrome 染色キットを用い、プロトコ

ルに従って行った。核染色はヘマトキシリンを用いた。Masson' s trichrome 染色後、切片は脱水、透徹を行い、カナダバルサムによって封入した。染色画像はBiorevo (Keyence) によって撮影した。

[0027] <免疫化学染色 (WT1, F4/80, PCNA)>

パラフィン切片を脱パラフィン、脱キシレン処理後、1% Triton in TBSに30分間浸し、クリーニングを行った。その後、抗原賦活化のためクエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸し、98℃で20分間加熱した。その後20分間静置した後、切片を取り出し、内因性ペルオキシダーゼ除去のため、3% H₂O₂ in methanol溶液に浸し、15分間室温で反応させた。その後、湿潤箱内でBlocking solution (DAKO) を組織に乗せ、30分間室温でブロッキングを行った。TBS-tweenで洗浄後、F4/80, PCNA抗体を Antibody diluent (DAKO) で1:100に希釈し、一晚反応させた。TBS-tweenで洗浄後、その後2次抗体として、HRP-conjugated 抗体を0.3% Triton-X in PBSにより1:500に希釈し、40分間室温で反応させた。TBS-tweenで洗浄後、3,3' -Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) solution (DAB 10mg, 0.05M Tris-Buffer (pH 7.6) , 30% H₂O₂ 5μL) を10分間室温で反応させ呈色させた。カウンター染色にはヘマトキシリン (Gill3) を用いた。染色終了後、脱水、透徹、封入を行い、Biorevo (Keyence) によって撮影・解析を行った。

[0028] <凍結切片>

マウス腎凍結ブロックは解剖摘出後の新鮮なマウス腎臓を半割し、クリオモルド内でOCT compound (サクラファインテック) に浸し、液体窒素により急速凍結した。腎凍結ブロックはクライオスタットにより、4μmに薄切し、凍結切片とした。

[0029] <免疫蛍光染色 (Nephrin) >

腎凍結切片は作成後すぐに氷冷したアセトン溶液に-20℃で5分間浸し、PBS洗浄後、更に4% Paraformaldehydeで10分間 4℃でインキュベーションすることで固定した。その後、湿潤箱内で3 % BSA/PBSにより室温で1時間ブロッキングした。PBSによる洗浄後、3 % BSA/PBSで1:50に希釈した各1次抗体を室

温で1時間反応させた。更にPBS洗浄後、PBSにより1:500に希釈した蛍光標識2次抗体 (Alexa fluor antibody) を室温で45分間反応させた。その後、DAPI solutionにより核染色を行い、Vector shieldで封入し、Biorevo (Keyence) によって撮影・解析を行った。

[0030] <マウスからのRNA回収>

マウス組織はRNA安定性保持のため、RNA laterに浸し、4℃、12時間、ローテートを行った後、RNA laterを除き、-80℃で保存した。組織は解凍後、冷却したPBS (-) を用いて洗浄し、1.5 mL tubeに入れた。その後、RNA iso Plusを1mL加え、臓器を眼科ばさみにて細切後、ホモジナイザーによってホモジナイズを行った。室温に5分間静置し、クロロホルム 0.2 mLを加え、よく撹拌した。以下、培養細胞と同様にRNA回収を行った。RNA回収後RNA濃度を測定し、DNaseをプロトコールに従って処理、更にフェノール／クロロホルム法、エタノール沈殿法によってRNAのみを精製した。RNAペレットはDEPC処理水によって溶解し、その後の実験に用いた。

[0031] <Real-time RT-PCR>

マウス組織における各遺伝子の発現量を検討するためにReal-time RT-PCR (iQ5 リアルタイム PCR 解析システム) を行った。Real-time RT-PCRにはRT反応用にPrime Script RT reagent kitを、PCR反応用にSYBR Premix Ex Taq IIを用いた。概略を示すと、培養細胞およびマウス組織から抽出した total RNA 0.25gを鋳型とし、Oligo dT primerを用いて逆転写反応 (37℃ 30分, 85℃ 10秒) を行った。その後、各遺伝子mRNA 増幅用の5' -primer および 3' -primer を用いてPCR反応を (94℃ 2分 1サイクル, 94℃ 30秒および 60℃ 30秒 40サイクル, 72℃ 5分 1サイクル) を行った。なお、internal control として18S rRNAのPCR反応を同時に行った。標的PCR産物の定量は、Comparative CT法 (CT法) により行った。

[0032] <マウス組織からのタンパク質抽出>

マウス組織は摘出後、液体窒素に入れ急速凍結し、-80℃で保存した。解凍後、組織に冷PBS (-) 1mLを加え、眼科バサミによって細切し、ホモジナイザ

ーによってホモジナイズした。その後、遠心分離（12,000rpm, 4℃, 5分間）により上清を除去し、RIPA buffer を400 μ L加え更にホモジナイズした。氷上で2時間静置し、遠心分離（15,000 rpm, 4℃, 10分間）を行い、上清をタンパク質溶液として回収した。タンパク質濃度は、BCA法によって定量した。

[0033] <Western blotting>

マウス腎組織から抽出した各タンパク質をサンプルとして用い、Western blotting 法を行った。まず、ポリアクリルアミドゲルを作製し、SDS-PAGE を行った後、PVDF膜への転写を250mAで2時間行った。転写の確認はponceau染色により行った。Ponceau染色の方法は、転写後のPVDF膜をponceau S 溶液に浸し、5分間 incubateし、滅菌水で2回 wash して確認する。その後、転写したPVDF膜は、0.1 % Tween 20-TBS (-) または 0.05% Tween 20-PBS (-) で希釈した 5% スキムミルクで1時間ブロッキングを行った。次に0.1 % Tween 20-TBS (-) または 0.05% Tween 20-PBS (-) で PVDF 膜を 3回洗浄し、1 次抗体反応（室温）を行った。1次抗体反応後、0.1 % Tween 20-TBS (-) または 0.05% Tween 20-PBS (-) で 3回洗浄し、2次抗体反応（室温）を行った。2 次抗体反応後、0.1 % Tween 20-TBS (-) または 0.05% Tween 20-PBS (-) で PVDF 膜を 3回洗浄し、Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate または、Immuno-star発光試薬を処理し、LAS-4000 mini (FUJIFILM) によって抗体反応を検出した。HRP 標識2 次抗体は全て Jackson Immuno Research Laboratoriesで購入した。

[0034] <<実験例 1, ASモデルマウスにおける腎系球体のプロテオミクス解析>>

ASモデルマウスの腎系球体についてプロテオミクス解析を行い、各種分子の発現を調べることにより、ASにおける病態メカニズムの解明を目的に検討を行った。

[0035] 1. 結果を図 1 に示す。

(1) LC-MS/MSの分析により、ASでは、WTと比較して、いくつかの代謝経路に関する分子が過剰に発現していることが分かった。

(2) さらにパスウェイ解析により、ASでは、WTと比較して、いくつかの代謝

経路が過剰に促進されていることが分かった (Complex I biogenesis, Respiratory electron transport, Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic, The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport)。

2. これより、ASの腎糸球体において、細胞内代謝関連分子の発現変動が引き起こされていることが分かった。

[0036] <<実験例 2, メトホルミンによるAS腎機能への影響>>

腎糸球体における代謝調整を行う薬物の一つとしてメトホルミンを用い、AS腎機能にどのような影響を及ぼすかを調べることを目的に検討を行った。

[0037] 1. 結果を図 3 に示す。

(1) タンパク尿について、メトホルミン投与群は、コントロールと比較して、尿中タンパク量は一貫して少なく、18週齢以降では、有意に少なかった (図 3 A)。また、メトホルミン投与群は、ロサルタン投与群と比較すると、一貫して高い値であった。

(2) 尿中アルブミンについて、メトホルミン投与群は、ロサルタン投与群ほどではないものの、コントロールと比較して、有意に低い値であった (図 3 B)。

(3) 血清クレアチニンについて、メトホルミン投与群は、コントロールと比較して、有意に低い値であり、ロサルタン投与群ならびにWTと同等の値であった (図 3 C)。

2. これらの結果から、メトホルミンは、ASにおける腎機能低下を抑制することが分かった。

[0038] <<実験例 3, メトホルミンによるAS腎組織障害への影響>>

メトホルミンがASにおける腎組織障害へどのような影響を及ぼすかを調べることを目的に検討を行った。

[0039] 1. 免疫染色の結果を、図 4 に示す。

(1) PAM染色において、メトホルミン投与群では、コントロールと比較と比較して、強く染まっていた。また、メトホルミン投与群は、ロサルタン投与

群と比較しても強く、WTと同程度、染まっていた。

(2) マッソントリクローム染色において、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して、その染色は弱いものであった。また、メトホルミン投与群は、ロサルタン投与群と比較しても、その染色は弱いものであった。

(3) マクロファージマーカーであるF4/80染色において、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して、ほとんど染まっていなかった。また、メトホルミン投与群は、ロサルタン投与群と比較して、同程度、染まっていた。

[0040] 2. また、マクロファージ浸潤について、F4/80で染色された陽性領域を算出した結果、メトホルミン投与群は、コントロールと比較して有意に低い値を示し、ロサルタン投与群と同程度の値であった。

3. さらに、マッソントリクローム染色より陽性領域を繊維化スコアとして算出した結果、メトホルミン投与群は、コントロールと比較して有意に低い値を示し、ロサルタン投与群よりも低い値であった。

[0041] 4. これらの結果から、メトホルミンは、ASの腎組織障害を抑制していることが分かった。

5. また、ASの腎組織障害抑制効果は、ロサルタンと同等程度と考えられ、パラメーターによっては、それ以上の効果を有することが分かった。

[0042] <<実験例4、メトホルミンによる各種炎症・繊維化関連遺伝子への影響>>

ASにおいて、メトホルミンが各種炎症・繊維化関連遺伝子の発現への影響を調べることを目的に検討を行った。

[0043] 1. 炎症性サイトカインに関する結果を図5に示す。

(1) IL-6について、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して有意に低い値であり、ロサルタン投与群よりも低い値であった。

(2) IL-1 β について、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して有意に低い値であり、ロサルタン投与群よりも低い値であった。

(3) KC (IL-8) について、メトホルミン投与群では、コントロールと比較し

て有意に低い値であり、ロサルタン投与群と同等の値であった。

[0044] 2. 繊維化関連分子に関する結果を図6に示す。

(1) Mmp12について、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して有意に低い値であり、ロサルタン投与群と同等の値であった。

(2) Mmp9について、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して有意に低い値であり、ロサルタン投与群よりも低い値であった。

(3) Tgf- β について、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して有意に低い値を示し、ロサルタン投与群と同程度の値であった。

(4) α -Smaについて、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して有意に低い値を示し、ロサルタン投与群よりも低い値であった。

[0045] 3. これらの結果より、メトホルミンは、ASにおいて変動する各種炎症・繊維化関連遺伝子の発現を抑制することが分かった。

4. また、メトホルミンの抑制効果は、ロサルタンと同等程度と考えられ、パラメーターによっては、ロサルタンを超える効果を示すことが分かった。

[0046] <<実験例5, メトホルミンによるAS腎系球体障害への影響>>

メトホルミンがASにおける腎系球体障害へどのような影響を及ぼすかを調べることを目的に検討を行った。

[0047] 1. 結果を図7に示す。

(1) WT1染色において、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して強く染まっており、ロサルタン投与群と同程度、染まっていた。

(2) Neph rin Nuclei染色において、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して強く染まっており、ロサルタン投与群と同程度、染まっていた。

(3) PCNA染色において、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して、その染色は弱く、ロサルタン投与群と同程度であった。

[0048] 2. また、WT1染色をもとに、糸球体当たりのポドサイト数の算出を行ったところ、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して、大きな値であり、ロサルタン投与群と同等の値であった。

3. さらに、PCNA染色をもとに、糸球体当たりの細胞増殖数の算出を行った

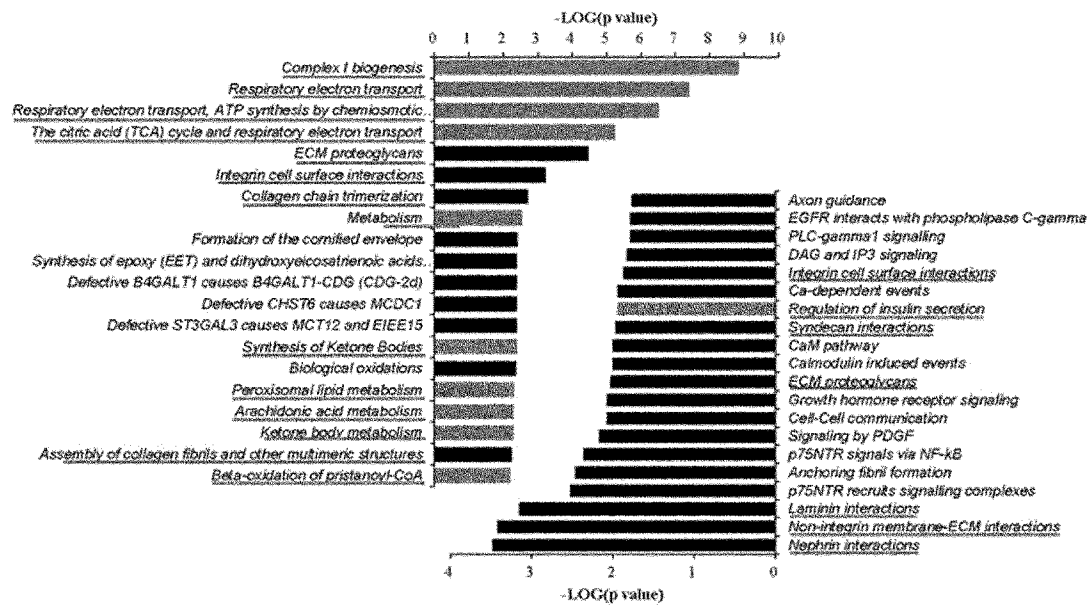
ところ、メトホルミン投与群では、コントロールと比較して小さな値であり、ロサルタン投与群と同等の値であった。

[0049] 4. これらの結果から、メトホルミンは、ASにおいてポドサイト障害を抑制するとともに、糸球体細胞の増殖を抑制していることが分かった。

請求の範囲

- [請求項1] 腎糸球体の代謝調整を行うことにより、アルポート症候群の治療を行うことを特徴とするアルポート症候群治療薬
- [請求項2] 腎糸球体の代謝調整が、ビグアナイド系化合物もしくはその塩を有効成分としてなされることを特徴とする請求項1に記載のアルポート症候群治療薬
- [請求項3] ビグアナイド系化合物が、メトホルミンないしその塩であることを特徴とする請求項2に記載のアルポート症候群治療薬
- [請求項4] メトホルミンないしその塩が、メトホルミン塩酸塩であることを特徴とする請求項3に記載のアルポート症候群治療薬

[図1]



[図2]

実験条件

マウス:

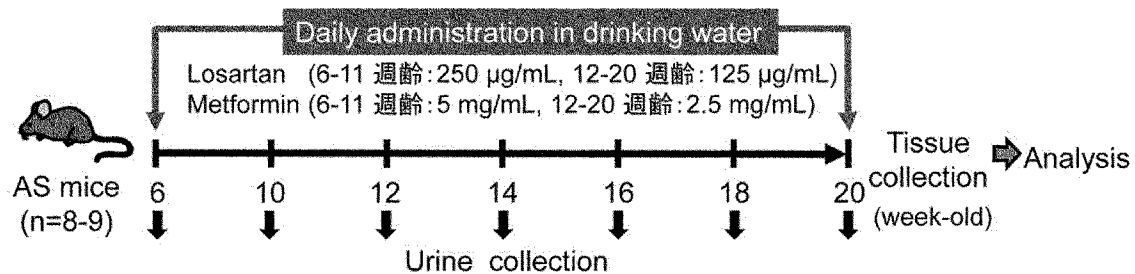
C57BL6/J (正常コントロール)
B6 COL4A5 G5X (アルポートマウス)^{1,2}

薬剤:

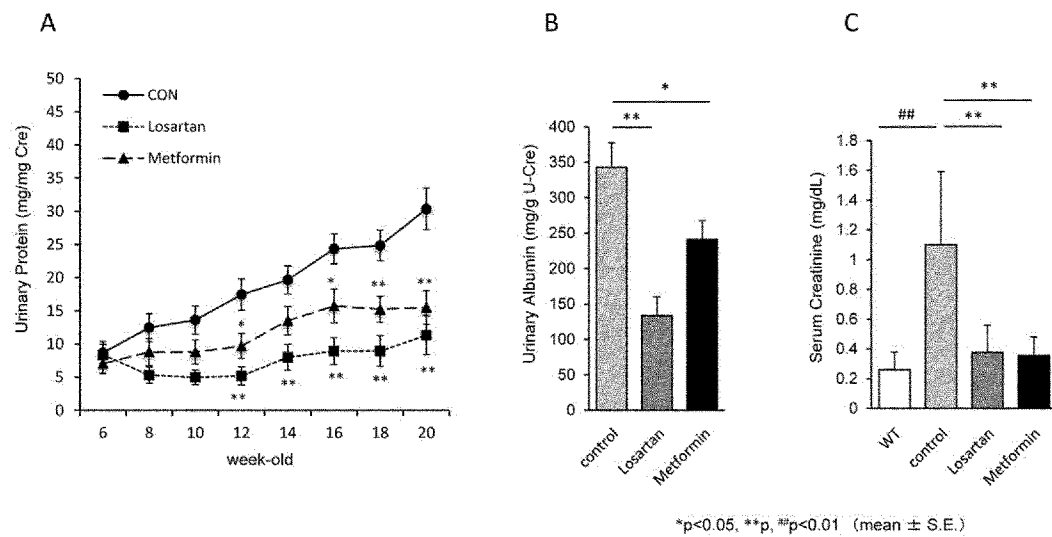
ロサルタンカリウム (陽性コントロール) (cat.no. 128-06112, WAKO)
メトホルミン (cat.no. 130-15485, WAKO)

いずれも自由飲水投与

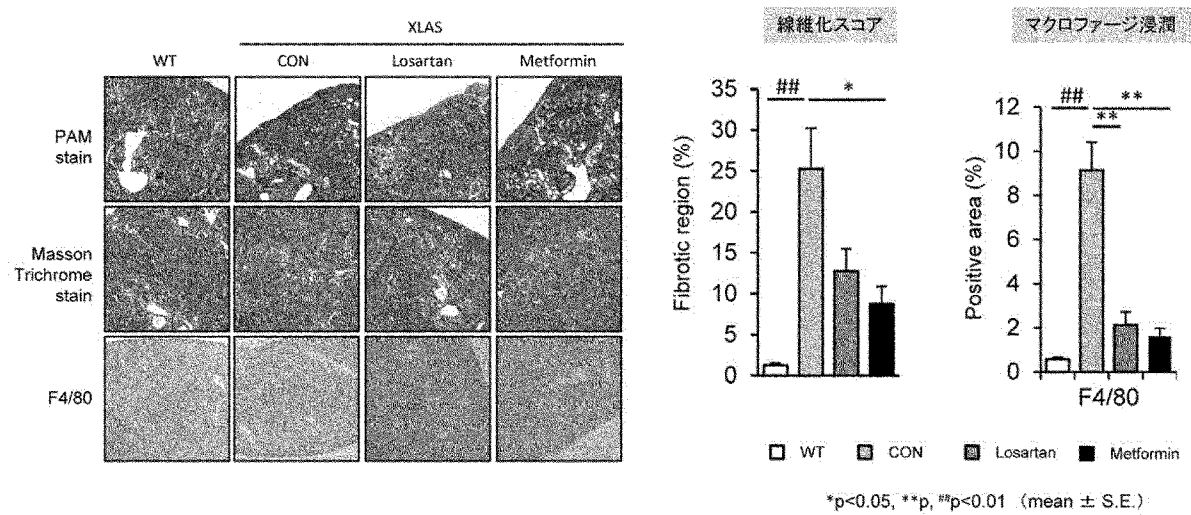
※飲水量の増加を考慮し、12週齢以降、投与濃度を減少



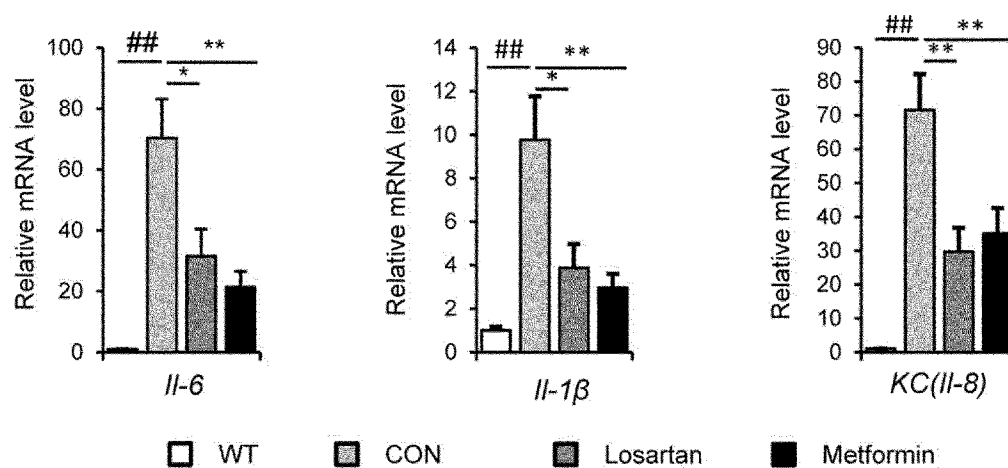
[図3]



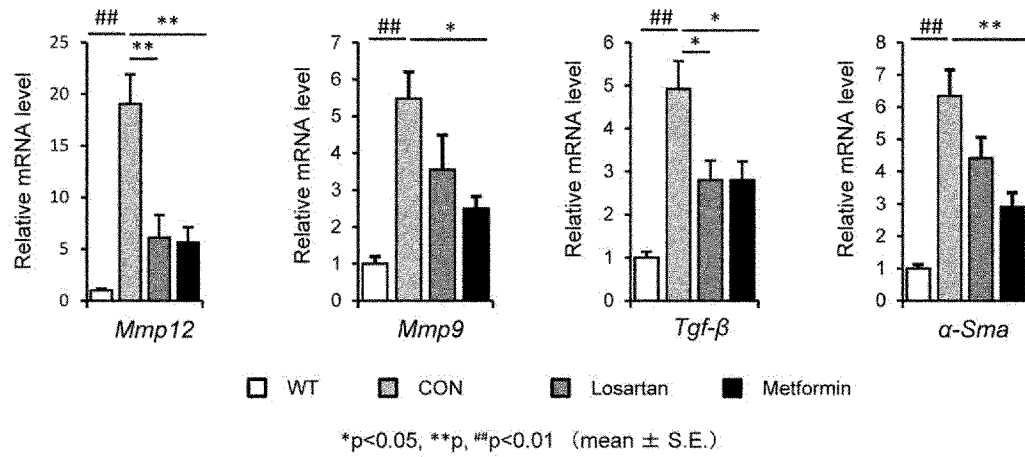
[図4]



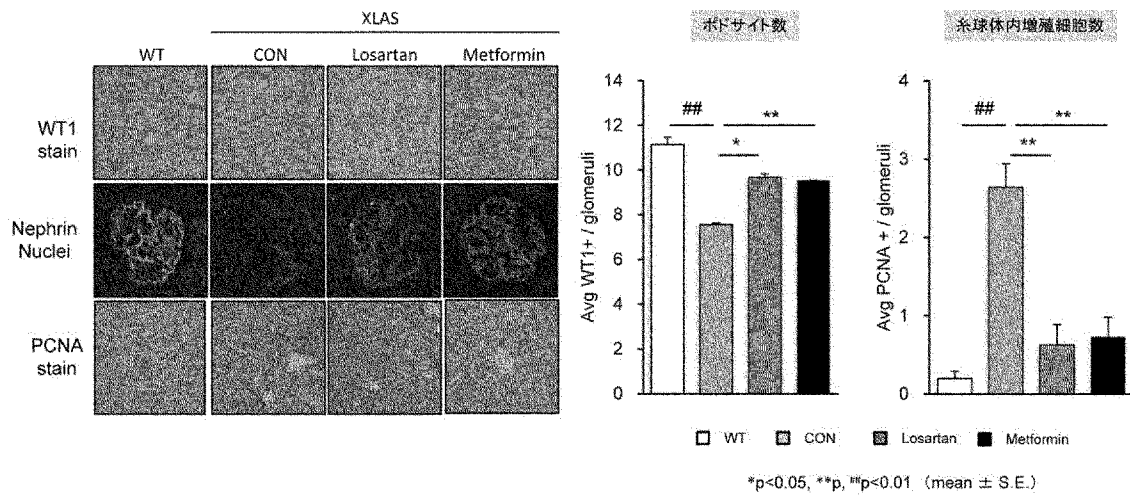
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/031257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A61K45/00 (2006.01)i, A61K31/155 (2006.01)i, A61P13/12 (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/155, A61P13/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/MEDLINE/EMBASE/RTOSTS (STN), Pubmed, 医中誌WEB (Ichush WER)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	GOMEZ, IG, et al., "Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways", The Journal of Clinical Investigation, January 2015, vol. 125, no. 1, pp. 141-156, ISSN 0021-9738, in particular, page 141, summary, table 1, fig. 2-8	1 2-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 September 2018 (21.09.2018)

Date of mailing of the international search report
09 October 2018 (09.10.2018)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/031257

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LUO, M., et al., "MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway", Scientific Reports, 23 February 2017, vol. 7, 43427, doi:10.1038/srep43427, ISSN 2045-2322, in particular, page 1, summary, fig. 1	2-4
Y	MORALES, AI, et al., "Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway", Kidney International, 2010, vol. 77, no. 10, pp. 861-869, ISSN 0085-2538, in particular, page 861, summary, tables 1-3, fig. 1-6	2-4
Y	FENG, Y., et al., "Metformin attenuates renal fibrosis in both AMPK α : 2-dependent and independent manners", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, June 2017, vol. 44, no. 6, pp. 648-655, ISSN 0305-1870, in particular, page 648, "summary", fig. 1, 4	1-4
Y	SHEN, Y., et al., "Metformin Prevents Renal Fibrosis in Mice with Unilateral Ureteral Obstruction and Inhibits Ang II-Induced ECM Production in Renal Fibroblasts", International Journal of Molecular Sciences, 2016, vol. 17, 146, doi:10.3390/ijms17020146, ISSN 1422-0067, in particular, page 1, "Abstract", fig. 2-4	1-4
Y	SAYERS, R., et al., "Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression", Kidney International, 1999, vol. 56, no. 5, pp. 1662-1673, ISSN 0085-2538, in particular, page 1662, summary, fig. 1-3	1-4
P, X	加世田将大ほか, Metformin による進行性糸球体腎炎に対する保護効果, 第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, 26 October 2017, pp. 60-61, ISSN 0919-2131, non-official translation (KASEDA, Masahiro et al., "Protective effects against progressive glomerulonephritis by metformin", Lecture abstracts of the 39th symposium on interaction between biomembrane and medicine)	1-4
P, X	加世田将大ほか, 抗糖尿病薬 Metformin による遺伝性腎疾患アルポート症候群に対する新規治療法の確立, 日本小児腎臓病学会雑誌, 24 May 2018, vol. 31, no. 1 special issue, p. 99, ISSN 0915-2245, non-official translation (KASEDA, Masahiro et al., "Establishment of novel method for curing hereditary renal disease, Alport syndrome, by means of antidiabetic drug, Metformin", Japanese journal of pediatric nephrology)	1-4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/155(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/155, A61P13/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed, 医中誌 WEB (Ichushi WEB)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	GOMEZ IG, et al., Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways, The Journal of Clinical Investigation, 2015.01, Vol.125, No.1, p.141-156, ISSN 0021-9738, 特に p.141 要旨, Table 1, Figure 2-8	1
Y		2-4

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.09.2018

国際調査報告の発送日

09.10.2018

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

春田 由香

4U

4147

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LUO M, et al., MiRNA-21 mediates the antiangiogenic activity of metformin through targeting PTEN and SMAD7 expression and PI3K/AKT pathway, Scientific Reports, 2017.02.23, Vol.7, 43427, doi: 10.1038/srep43427, ISSN 2045-2322, 特に p.1 要旨, Figure 1	2-4
Y	MORALES AI, et al., Metformin prevents experimental gentamicin-induced nephropathy by a mitochondria-dependent pathway, Kidney International, 2010, Vol.77, No.10, p.861-869, ISSN 0085-2538, 特に p.861 要旨, Table 1-3, Figure 1-6	2-4
Y	FENG Y, et al., Metformin attenuates renal fibrosis in both AMPK α 2-dependent and independent manners, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2017.06, Vol.44, No.6, p.648-655, ISSN 0305-1870, 特に p.648 「Summary」, Figure 1,4	1-4
Y	SHEN Y, et al., Metformin Prevents Renal Fibrosis in Mice with Unilateral Ureteral Obstruction and Inhibits Ang II-Induced ECM Production in Renal Fibroblasts, International Journal of Molecular Sciences, 2016, Vol.17, 146, doi: 10.3390/ijms17020146, ISSN 1422-0067, 特に p.1 「Abstract」, Figure 2-4	1-4
Y	SAYERS R, et al., Role for transforming growth factor-beta1 in alport renal disease progression, Kidney International, 1999, Vol.56, No.5, p.1662-1673, ISSN 0085-2538, 特に p.1662 要旨, Fig. 1-3	1-4
P, X	加世田 将大 ほか, Metformin による進行性糸球体腎炎に対する保護効果, 第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム講演要旨集, 2017.10.26, p.60-61, ISSN 0919-2131	1-4
P, X	加世田 将大 ほか, 抗糖尿病薬 Metformin による遺伝性腎疾患アルポート症候群に対する新規治療法の確立, 日本小児腎臓病学会雑誌, 2018.05.24, 第 31 巻, 第 1 号 増刊号, p.99, ISSN 0915-2245	1-4