

(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8月15日(15.08.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/156252 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/366 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2019/004766

(22) 国際出願日: 2019年2月5日(05.02.2019)

(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 2018-019698 2018年2月6日(06.02.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 櫻井 英俊 (SAKURAI, Hidetoshi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

西 洋平(NISHI, Yohei); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 太田 章(OHTA, Akira); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

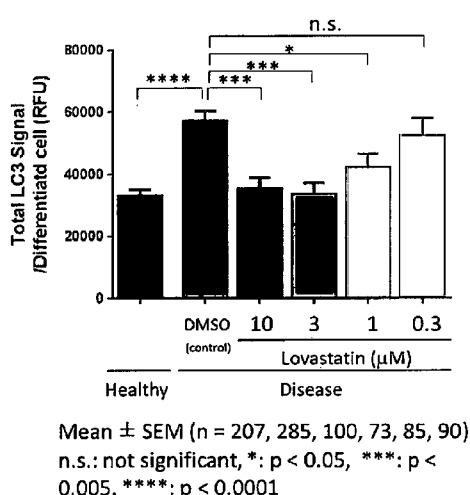
(74) 代理人: 高 島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目 1 番 1 号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(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, 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, JP, 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,

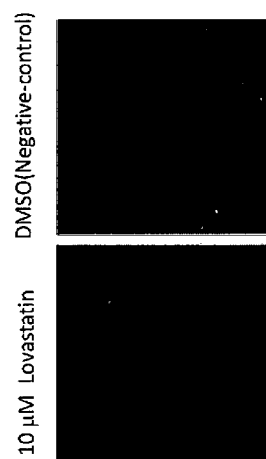
(54) Title: PREVENTIVE AND THERAPEUTIC AGENT FOR LYSOSOMAL DISEASES

(54) 発明の名称: ライソゾーム病の予防及び治療剤

【図 2】



Nuclei /mCherry/LC3 (Autophagy marker)



(57) Abstract: The present invention provides a lysosomal disease preventive/therapeutic agent comprising an HMG-CoA reductase inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、HMG-CoA還元酵素阻害薬を含有してなるライソゾーム病の予防又は治療剤を提供する。

[続葉有]

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】ライソゾーム病の予防及び治療剤

【技術分野】

【0001】

本発明は、ライソゾーム病の予防又は治療剤に関する。より詳細には、本発明は、HMG-CoA 還元酵素阻害薬を含有してなるライソゾーム病の予防又は治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

ライソゾーム病（以下、「LSD」と略記する場合がある）はライソゾーム内の酸性分解酵素の遺伝的欠損又はライソゾームの機能障害を来す遺伝子の異常により発症する。それらの欠損によりライソゾーム内に様々な基質や不要物質が蓄積し、その結果、肝臓、脾臓の腫大、骨変形、神経障害（痙攣、知能障害など）、眼障害、腎障害、心不全など種々の症状を呈する疾患であり、厚生労働省の指定難病に指定されている。

【0003】

LSDの原因は、ライソゾーム内の酸性分解酵素の遺伝的欠損が多数であり、蓄積する基質や欠損する酵素の種類により数多くの疾患に分類される（ゴーシェ病、ファブリー病、ニーマン・ピック病、GM1 ガングリオシドーシス、ムコ多糖症 I 型など）。

【0004】

現在、LSD の治療薬としていくつかの酵素補充療法が施行されている。例えば、ファブリー病なら、リプレガルTM（大日本住友製薬）やファブラザイムTM（JCR ファーマ）が、ボンペ病ではマイオザイムTM（サノフィ）が上市され、施行されている。しかしながら、これらの酵素補充療法は臨床症状の改善や生存期間の延長など一定の効果を示すが、1）中枢神経症状や骨格筋症状に効果がない、2）自己抗体の出現、3）アレルギー反応、4）オートファジーの機能不全など問題点がある。特に、マイオザイムTMを用いた酵素補充療法において、生命予後が改善される一方で、骨格筋症状に対する効果は認められず運動機能は改善しない。また、中枢神経症状も改善しない。その原因として、オートファジービルドアップと呼ばれる過剰のオートファゴソームの蓄積を原因とするオートファジーの機能不全が報告されている（非特許文献 1）。

【0005】

ところで、Yamanaka らが樹立した人工多能性幹細胞（以下、「iPS 細胞」という）（特許文献 1）は、各組織の細胞へと分化させることができるため、*in vitro* で病態の再現をすることが可能と考えられている。実際、上記の方法で、様々な難病患者由来の iPS 細胞が作製され、目的の細胞へ分化させ治療薬のスクリーニングが行われている。本発明者らは以前、骨格筋細胞を特異的に誘導しない条件で培養した多能性幹細胞において外因性の MyoD や Myf5 を発現させ、その発現期間を調節することにより、多能性幹細胞から骨格筋細胞を効率よく分化誘導させる方法を確認し（特許文献 2）、当該方法を用いてボンペ病患者由来 iPS 細胞から同疾患のモデル細胞を樹立している（非特許文献 2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】 WO 2008/118820 A2

【特許文献 2】 WO 2013/073246 A1

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献 1】 Fukuda, T., and H. Sugie. Brain and nerve= Shinkei kenkyu no shinpo 67.9 (2015): 1091-1098.

【非特許文献 2】 Yoshida, T. et al., Sci. Rep., 7: 13473 (2017)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、より有効かつ副作用の少ない LSD の新規な予防及び／又は治療薬を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく、ポンペ病患者由来の線維芽細胞から iPS 細胞を樹立し、本発明者らが開発した分化誘導法（上記特許文献2）を用いて筋細胞へ分化誘導を行った。ここで、得られた筋細胞においてオートファゴソームが蓄積していることに着目し、当該筋細胞と試験化合物を接触させ、オートファゴソームの蓄積を低下させる化合物をスクリーニングした。その結果、HMG-CoA 還元酵素（以下、「HMGCR」ともいう）阻害薬がオートファゴソームの蓄積を低下させることを見出した。さらに、別の LSD である縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー（GNE ミオパチー）患者由来 iPS 細胞から分化させた筋細胞を用いた実験でも、HMGCR 阻害薬によるオートファゴソームの蓄積減少を確認した。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、HMGCR 阻害薬が LSD の予防及び／又は治療に有効であると結論し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

- [1] HMG-CoA 還元酵素阻害薬を含有してなるライソゾーム病の予防又は治療剤。
- [2] HMG-CoA 還元酵素阻害薬がロバスタチンである、[1]に記載の剤。
- [3] ライソゾーム病がポンペ病又は GNE ミオパチーである、[1]又は[2]に記載の剤。
- [4] 対象におけるライソゾーム病の予防又は治療方法であって、該対象に有効量の HMG-CoA 還元酵素阻害薬を投与することを含む、方法。
- [5] HMG-CoA 還元酵素阻害薬がロバスタチンである、[4]に記載の方法。
- [6] ライソゾーム病がポンペ病又は GNE ミオパチーである、[4]又は[5]に記載の方法。
- [7] ライソゾーム病の予防又は治療における使用のための HMG-CoA 還元酵素阻害薬。
- [8] HMG-CoA 還元酵素阻害薬がロバスタチンである、[7]に記載の阻害薬。
- [9] ライソゾーム病がポンペ病又は GNE ミオパチーである、[7]又は[8]に記載の剤。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、LSD に共通する病態でありながら、従来の酵素補充療法では介入できなかったオートファジーの機能不全を改善することができるので、LSD の有効な新規予防及び／又は治療手段として期待される。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】 LSD 予防／治療薬のスクリーニング結果を示す図である。横軸に蛍光強度を、縦軸に細胞内のオートファジー小胞の面積を、それぞれ示す。

【図2】 ロバスタチンがポンペ病特異的筋細胞におけるオートファジーマーカーLS3の発現を抑制することを示す図である。

【図3】 ポンペ病特異的筋細胞におけるロバスタチンの治療効果を示す電子顕微鏡写真である。

【図4】 ポンペ病特異的筋細胞におけるロバスタチンの治療効果を示す電子顕微鏡写真である。

【図5】 ロバスタチンがGNEミオパチー特異的筋細胞におけるオートファジー空胞を消失させることを示す図である。

【図 6】 GNE ミオパチー特異的筋細胞におけるロバスタチンの治療効果を示す電子顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、HMG-CoA 還元酵素 (HMGR) 阻害薬を含有してなるライソゾーム病 (LSD) の予防及び／又は治療剤 (以下、「本発明の予防／治療剤」ともいう) を提供する。

【0014】

本発明において治療対象となる LSD は、ライソゾームに関連する酵素の欠損により分解されるべき物質が老廃物として蓄積し、ライソゾームとオートファゴソームとの融合が阻害され、オートファゴソームが蓄積してオートファジーの機能不全の病態を呈する疾患であれば特に制限はなく、例えば、 α -グルコシダーゼ (GAA) の欠損によりグリコーゲンが蓄積するポンペ病、UDP-N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ/N-アセチルマンノサミンキナーゼ (GNE) を欠損する縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチー (GNE ミオパチー)、GM1 ガングリオシドーシス、GM2 ガングリオシドーシス、異染色性白質ジストロフィー (MLD)、ファブリー病 (α -ガラクトシダーゼ A 欠損)、ファーバー病、ゴーシェ病 (β -グルコセレブロシダーゼ欠損)、ニーマン・ピック病 (A, B, C 型)、クラッペ病等のスフィンゴ脂質が蓄積する疾患、ムコ多糖症 (I-VII 型)、ダノン病、 α -マンノシドーシスなどが挙げられるが、それらに限定されない、好ましくは、ポンペ病又は GNE ミオパチーである。

【0015】

本発明の予防／治療剤の有効成分である HMG-CoA 還元酵素 (HMGR) 阻害薬は、ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼの酵素活性を阻害する活性を有する化合物であれば特に制限はなく、微生物由来の天然物質、それから誘導される半合成物質、及び全合成化合物のすべてが含まれ、例えば、(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル (S)-2-メチルブチレート (ロバスタチン、特開昭 57-163374 号公報 (USP4231938) 参照)、(+)-(1S, 3R, 7S, 8S, 8aR)-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-3, 7-ジメチル-8-[2-[(2R, 4R)-テトラヒドロ-4-ヒドロキシ-6-オキソ-2H-ピラン-2-イル]エチル]-1-ナフチル 2, 2-ジメチルブチレート (シンバスタチン、特開昭 56-122375 号公報 (USP4444784) 参照)、(±)(3R*, 5S*, 6E)-7-[3-(4-フルオロフェニル)-1-(1-メチルエチル)-1H-インドール-2-イル]-3, 5-ジヒドロキシ-6-ヘプテン酸 (フルバスタチン、特表昭 60-500015 号公報 (USP4739073) 参照)、(3R, 5S)-7-[2-(4-フルオロフェニル)-5-(1-メチルエチル)-3-フェニル-4-フェニルアミノカルボニル-1H-ピロール-1-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプタン酸 (アトルバスタチン、特開平 3-58967 号公報 (USP5273995) 参照)、(1S, 7R, 8S, 8aR)-8-{2-[(2R, 4R)-4-ヒドロキシ-6-オキソテトラヒドロ-2H-ピラン-2-イル]エチル}-7-メチル-1, 2, 3, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロナフタレン-1-イル (2S)-2-メチルブタノエート (メバスタチン、Journal of Antibiotics (Tokyo) 29 (12): 1346-8 (1976))、(3R, 5S, 6E)-7-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(メトキシメチル)-2, 6-ビス (プロパン-2-イル) ピリジン-3-イル]-3, 5-ジヒドロキシヘプト-6-エノイン酸 (セリバスタチン、Br J Pharmacol. 1999 Feb; 126(4): 961-968.)、(+)-(3R, 5R)-3, 5-ジヒドロキシ-7-[(1S, 2S, 6S, 8S, 8aR)-6-ヒドロキシ-2-メチル-8-[(S)-2-メチルブチリルオキシ]-1, 2, 6, 7, 8, 8a-ヘキサヒドロ-1-ナフチル]ヘプタン酸 (プラバスタチン、特開昭 57-2240 号公報 (USP4346227) 参照)、(+)-(3R, 5S)-7-[4-(4-フルオロフェニル)-6-イソプロピル-2-(N-メチル-N-メタンスルフォニル

アミノ)ピリミジン-5-イル]-3,5-ジヒドロキシー-6(E)-ヘプテン酸(ロスタタチン、特開平5-178841号公報(USP5260440)参照)又は(E)-3,5-ジヒドロキシー-7-[4'-(4'-フルオロフェニル)-2'-シクロプロピルキノリン-3'-イル]-6-ヘプテン酸(ピタバスタチン、特開平1-279866号公報(USP5854259及びUSP5856336)参照)のようなスタチン化合物である。好ましいHMGCR阻害薬としては、ロスタタチンである。

【0016】

上記のスタチン化合物は、そのラクトン閉環体又はその薬理上許容される塩(好適には、ナトリウム塩又はカルシウム塩等)を包含する。

【0017】

本発明の予防/治療剤は、有効成分であるHMGCR阻害薬をそのまま単独で、または薬理的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等と混合し、適当な剤型の医薬組成物として経口的又は非経口的に投与することができる。

【0018】

経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤(糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む)、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤(ソフトカプセル剤を含む)、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。一方、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。これらの製剤は、賦形剤(例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体;トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体;結晶セルロースのようなセルロース誘導体;アラビアゴム;デキストラン;プルランのような有機系賦形剤;及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体;磷酸水素カルシウムのような磷酸塩;炭酸カルシウムのような炭酸塩;硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤である)、滑沢剤(例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩;タルク;コロイドシリカ;ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類;硼酸;アジピン酸;硫酸ナトリウムのような硫酸塩;グリコール;フマル酸;安息香酸ナトリウム;DLロイシン;ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩;無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類;及び、上記澱粉誘導体である)、結合剤(例えば、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、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である)、崩壊剤(例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体;カルボキシメチルスターチ、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・セルロース類である)、乳化剤(例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土;水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物;ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤;塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤;及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤である)、安定剤(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ノール類;チメロサル;デヒドロ酢酸;及び、ソルビン酸である)、矯味矯臭剤(例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等である)、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

【0019】

HMGCR阻害薬の投与量は、患者の症状、年齢、体重等の種々の条件により変化し得る。

その投与量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、1回当たり下限0.1 mg、上限1000mg（好適には500mg）を、非経口的投与の場合には、1回当たり下限0.01 mg、上限100mg（好適には50mg）を、成人に対して1日当たり1乃至6回投与することができる。症状に応じて増量もしくは減量してもよい。

【0020】

本発明の予防／治療剤は、他の薬剤、例えば、ライソゾーム病の治療に従来使用されている薬剤、例えば、酵素補充療法剤（例、 α -グルコシダーゼ（ポンペ病）、 α -ガラクトシダーゼA（ファブリー病）、ゴーシェ病（ β -グルコセレブロシダーゼ）等）、薬理的シヤペロン療法剤、基質低減療法剤などと併用してもよい。本発明の予防／治療剤及びこれらの他の薬剤は、同時に、順次又は別個に投与することができる。

【0021】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【実施例】

【0022】

実施例1：ポンペ病患者から樹立したiPS細胞を用いた薬理評価

（1）ポンペ病患者由来の線維芽細胞

生検した4 mmの皮膚を3週間の培養後、ポンペ病患者由来の線維芽細胞として用いた。

【0023】

（2）iPS細胞誘導

KLF4、Sox2、Oct3/4 および c-Myc に対するヒト cDNA を、Takahashi K, et al, Cell 131(5), 861, 2007 に記載の方法に従って、レトロウイルスを用いて前記線維芽細胞へ導入した。導入後6日目に、線維芽細胞をSNLフィーダー細胞上に移し、翌日に4 ng/ml のbFGF（Wako）を添加した霊長類ES細胞用培養液へ培地を交換した。培地は、1日おきに交換し、遺伝子導入後30日目に、コロニーをピックアップした。

【0024】

（3）骨格筋細胞分化誘導

上記のポンペ病患者由来iPS細胞に、テトラサイクリン応答性のMyoD発現ベクターを導入し（Tanaka et al. Plos One, 2013）、筋分化良好なクローン（MyoD-hiPSC）を選別した。

MyoD-hiPSCを、フィーダー細胞の不在下、マトリゲル（BD）コートディッシュ又はi-matrix（ニッキ）に播種した。マトリゲルは、霊長類ES培地で1:50に希釈した。MyoD-hiPSCをトリプシン処理し、単一の細胞に解離した。96ウェル培養プレート1ウェルに対する細胞数は $3.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ の範囲であった。培養液を、bFGFを有さず、10 μ M Y-27632（wako）を有するヒトiPS培地に変更した。24時間後、1 μ g/mLのドキシサイクリン（LKT Laboratories）を含むAK02NもしくはAK03（Ajinomoto）ヒトiPS培養液に添加した。Knockout Serum Replacement（KSR）（Invitrogen）、50 mU/L ペニシリン/50 μ g/L ストレプトマイシン（Invitrogen）、1 μ g/mLのドキシサイクリン（LKT Laboratories）および100 μ M 2-メルカプトエタノール（2-ME）

（Invitrogen）を添加したものに變更した。さらに5日後まで細胞培養を継続し骨格筋細胞へ分化誘導させた。これらの培養は、すべて37℃、5% CO₂、加湿雰囲気下でインキュベートすることで行った。この方法により、MHC陽性の細胞が得られ、骨格筋細胞への分化誘導が確認された。

【0025】

（4）オートファジーを指標としたLSD予防／治療薬のスクリーニング方法及び薬理評価

上記（3）で得られた疾患iPS細胞由来の骨格筋細胞に、それぞれ基剤（0.3% dimethylsulfoxide（DMSO））、スクリーニングの場合は終濃度3 μ Mの各種化合物、薬理評価の場合は終濃度10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01, 0.003 μ Mのどちらかを加

えて48時間インキュベートした。その後、細胞を回収し、オートファジーを検出できるKit、Cyto-ID autophagy detection kit(Enzo Life Science, Inc.)を用いて細胞染色した。また、染色の方法は、Kit添付の方法に従った。細胞染色したプレートをArrayScan(Thermo Scientific)を用いて測定・解析した。評価に用いた指標として、細胞内のオートファジーの蛍光値と領域の2つを用い、散布図にて化合物の評価を実施した(図1)。その中でオートファジーの領域を減少させる一群がHMGCoA阻害剤群であり、その一つが、ロバスタチンであった。

【0026】

(5) LC3を指標としたLSD予防/治療薬の薬理評価法

HTSスクリーニングにより見出されたスタチン類の中で、代表的な化合物としてロバスタチンを評価した。上記(3)で得られた疾患iPS細胞由来の骨格筋細胞に、それぞれ基剤(0.3% dimethylsulfoxide (DMSO))、終濃度10, 3, 1, 0.3 μ Mのロバスタチンを加えて48時間インキュベートした。分化した細胞を、4%パラフォルムアルデヒド(wako)/PBSを用いて室温で10分間固定し、PBSで洗浄した後、PBS(ナカライテスク)に0.5% Triton X-100(Sigma-aldrich)を加えたものでpermeabilizationを室温で10分間行った。その後、PBSで洗浄し、Blocking one(ナカライテスク)を用いて4℃、30分間ブロッキングを行った後、再度PBSで洗浄した。一次抗体は、上記10% blocking one 液中に、ウサギモノクローナル抗体(mAb)抗LC3B(1:200; Cell signaling)を希釈して使用した。4℃、5時間細胞を反応させ、PBSで洗浄した。次いで、上記10% blocking one 液中に、二次抗体としてAlexa fluor488結合抗ウサギIgGヤギ抗体(1:500; Invitrogen)および核染色用のHoechst33342(1:10000; Dojindo)をそれぞれ希釈したものを、室温で1時間反応させた。PBSにて洗浄した後、ArrayScan(Thermo Scientific)にて測定・解析した。その結果、オートファジーの代表的なマーカータンパク質であるLC3が健常者由来の筋細胞より、疾患由来の筋細胞では多く発現されていたが、ロバスタチン処置群では濃度依存的に減少することが確認できた(図2)。

【0027】

(6) LSD予防/治療薬の電子顕微鏡を用いた薬理評価

ロバスタチンの効果を電子顕微鏡によっても評価した。上記(3)で得られた疾患iPS細胞由来の骨格筋細胞に、それぞれ基剤(0.3% dimethylsulfoxide (DMSO))、終濃度10 μ Mのロバスタチンを加えて48時間インキュベートした。その後、細胞を回収し、2%パラフォルムアルデヒドと2%のグルタルアルデヒドで30分間、固定した。PBSで3回洗浄後、サンプルを、PBS中の2%のオスミウムで4℃、1時間固定化した。次いで60℃で48時間重合化後、切片を切り出し、透過型電子顕微鏡(日本電子)にて観察した。その結果、ロバスタチン無処置群では、ポンペ病の病態であるグリコーゲン顆粒が多数蓄積したオートファジー空胞(図3 黒矢印)が観察されたが、ロバスタチン処置群ではオートファジー空胞が消失しており、より健常者由来の筋分化細胞に近い電子顕微鏡像が得られた(図4)。以上より、オートファジー機能の制御不全による細胞への影響について数多くの知見(Galluzzi et al. Nature Reviews Drug Discovery 16: 487-511, 2017 および Parenti et al. Annual review of medicine 66: 471-486, 2015)を考慮すると、ロバスタチンはLSDにおけるライソゾーム機能不全と、それに伴うオートファジーの過剰蓄積の予防及び治療に有用であることが示唆された。

【0028】

実施例2：縁取り空胞をともなう遠位型ミオパチー(GNE ミオパチー)患者から樹立したiPS細胞を用いた薬理評価

(1) GNE ミオパチー患者由来の線維芽細胞

生検した4 mmの皮膚を3週間の培養後、GNE ミオパチー患者由来の線維芽細胞として用いた。

【0029】

(2) iPS 細胞誘導

OCT3/4, SOX2, KLF4, L-Myc, LIN28 に対するヒト cDNA と、shRNA-p53 を、Okita K, et al, Nature Methods, 2011 に記載の方法に従って、エピゾーマルベクターを用いて前記線維芽細胞へ導入した。導入後 6 日目に、線維芽細胞を SNL フィーダー細胞上に移し、翌日に 4 ng/ml の bFGF (Wako) を添加した霊長類 ES 細胞用培養液へ培地を交換した。培地は、1 日おきに交換し、遺伝子導入後 30 日目に、コロニーをピックアップした。

【0030】

(3) 骨格筋細胞分化誘導

上記の GNE ミオパチー患者由来 iPS 細胞に、テトラサイクリン応答性の MyoD 発現ベクターを導入し (Tanaka et al. Plos One, 2013)、筋分化良好なクローン (MyoD-hiPSC) を選別した。

MyoD-hiPSC を、フィーダー細胞の不在下、マトリゲル (BD) コートディッシュ又は i-matrix(ニッキ)に播種した。マトリゲルは、霊長類 ES 培地で 1:50 に希釈した。MyoD-hiPSC をトリプシン処理し、単一の細胞に解離した。96 ウェル培養プレート 1 ウェルに対する細胞数は $3.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ の範囲であった。培養液を、bFGF を有さず、10 μ M Y-27632 (wako) を有するヒト iPS 培地に変更した。24 時間後、1 μ g/mL のドキシサイクリン (LKT Laboratories) を含む AK02N もしくは AK03 (Ajinomoto) ヒト iPS 培養液に添加した。さらに 24 時間後、培養液を、 α 最小必須培地 (α MEM) (ナカライテスク) に 5% Knockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen)、50 mU/L ペニシリン/50 μ g/L ストレプトマイシン (Invitrogen)、1 μ g/mL のドキシサイクリン (LKT Laboratories) および 100 μ M 2-メルカプトエタノール (2-ME)

(Invitrogen) を添加したものに變更した。さらに 5 日後まで細胞培養を継続し骨格筋細胞へ分化誘導させた。これらの培養は、すべて 37°C、5% CO₂、加湿雰囲気下でインキュベートすることで行った。この方法により、MHC 陽性の細胞が得られ、骨格筋細胞への分化誘導が確認された。

【0031】

(4) オートファジーを指標とした薬理評価

GNE ミオパチーに対するロバスタチンを評価した。筋分化させた細胞に終濃度、10 μ M のロバスタチンを加え、48 時間インキュベート後、オートファジー検出 Kit である Cyto-ID autophagy detection kit 2.0 (Enzo Life Science, Inc.,) により評価した。染色の方法は、Kit 添付の方法に従った。細胞染色したプレートは ArrayScan (Thermo Scientific) を用いて測定・解析した。その結果、ロバスタチン処置群のオートファジー蓄積の消失が確認された (図 5)。

【0032】

(5) 電子顕微鏡を用いた薬理評価

ロバスタチンの効果を電子顕微鏡によっても評価した。上記 (3) で得られた疾患 iPS 細胞由来の骨格筋細胞に、それぞれ基剤 (0.3% dimethylsulfoxide (DMSO))、終濃度 10 μ M のロバスタチンを加えて 48 時間インキュベートした。その後、細胞を回収し、2% パラフォルムアルデヒドと 2% のグルタルアルデヒドで 30 分間、固定した。PBS で 3 回洗浄後、サンプルを、PBS 中の 2% のオスミウムで 4°C、1 時間固定化した。次いで、60°C で 48 時間重合化後、切片を切り出し、透過型電子顕微鏡 (日本電子) にて観察した。その結果、ロバスタチン無処置群では、凝集体が多数蓄積した小胞 (図 6 上パネル 黒矢印) が観察されたが、ロバスタチン処置群ではその小胞が消失した (図 6 下パネル)。

【産業上の利用可能性】

【0033】

本発明によれば、LSD に共通する病態でありながら、従来の酵素補充療法では介入できなかったオートファジーの機能不全を改善することができるので、オートファジーの機能不全による毒性物質の蓄積による細胞の損傷/ストレスや、ミトコンドリアの機能不全等

による細胞死が抑制され、生命予後の改善のみならず、骨格筋症状や中枢神経症状の改善も期待できる点で極めて有用である。

【 0 0 3 4 】

本出願は、2018 年 2 月 6 日付で日本国に出願された特願 2018-019698 を基礎としており、ここで言及することにより、その内容はすべて本明細書に包含されるものである。

請求の範囲

【請求項 1】

HMG-CoA 還元酵素阻害薬を含有してなるライソゾーム病の予防又は治療剤。

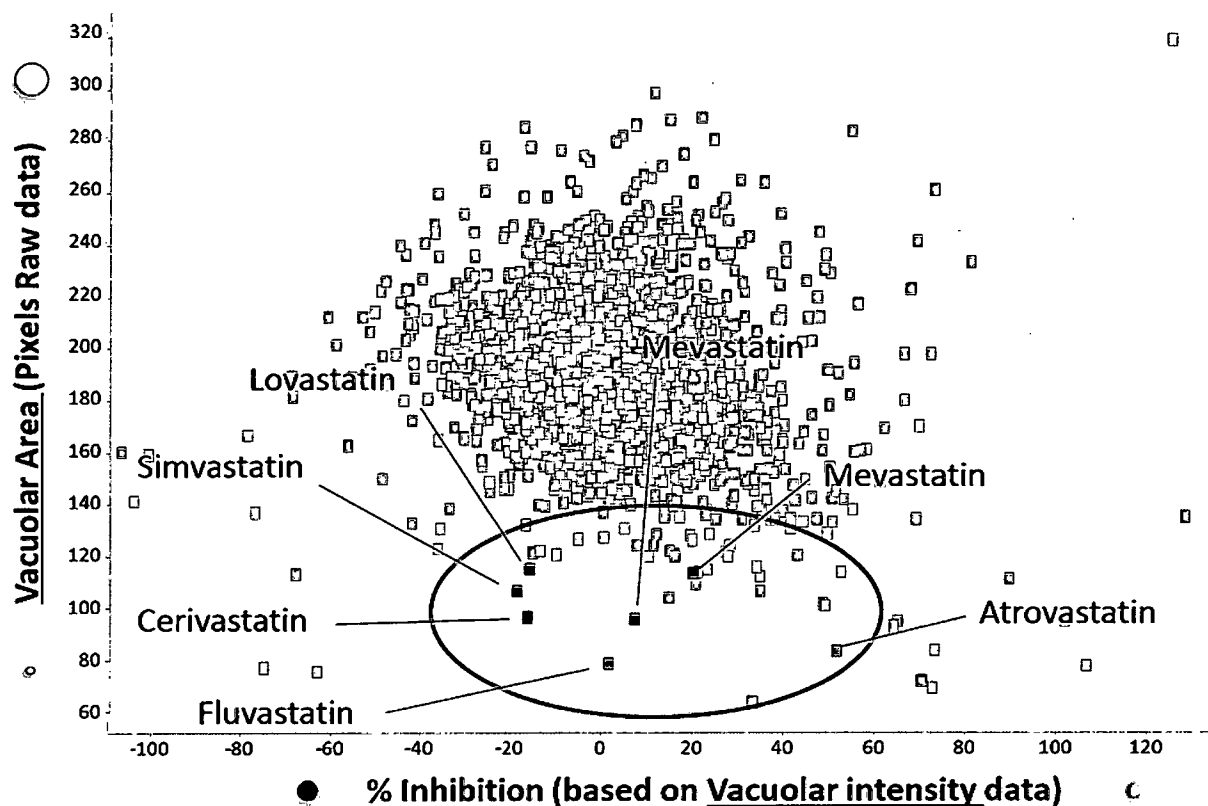
【請求項 2】

HMG-CoA 還元酵素阻害薬がロバスタチンである、請求項 1 に記載の剤。

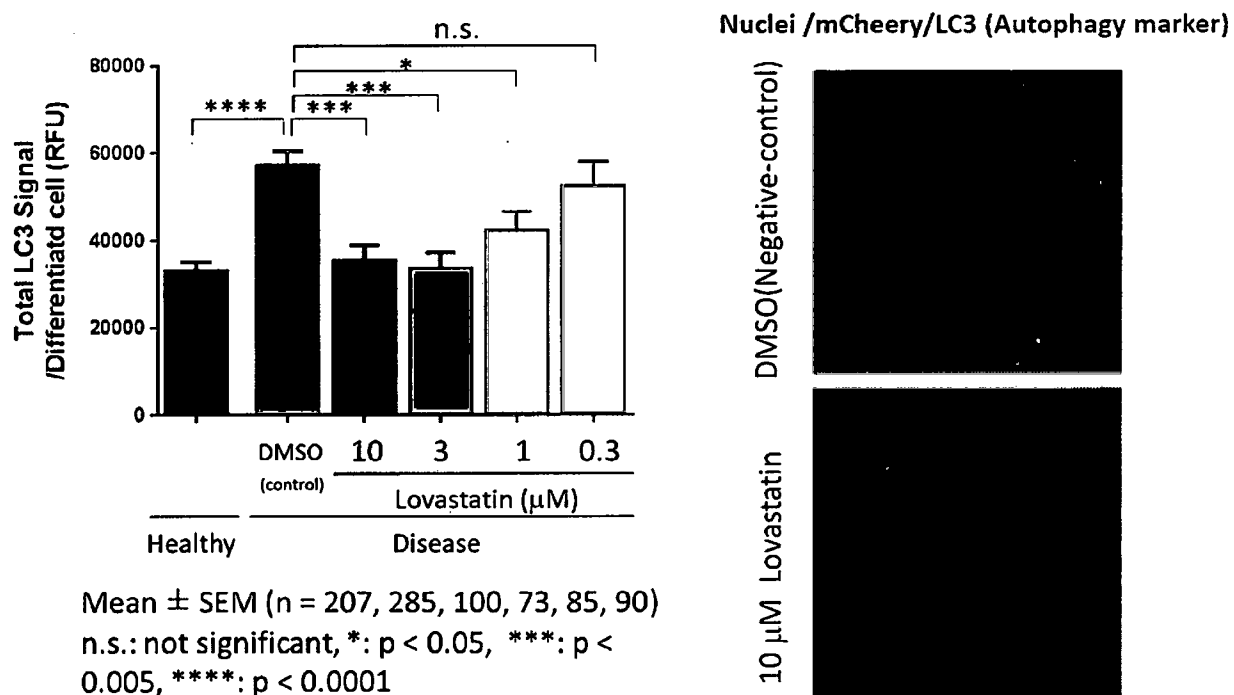
【請求項 3】

ライソゾーム病がポンペ病又は GNE ミオパチーである、請求項 1 又は 2 に記載の剤。

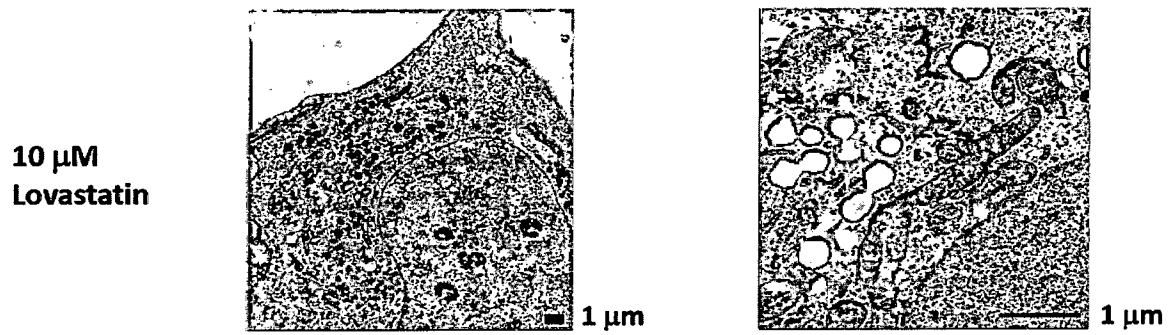
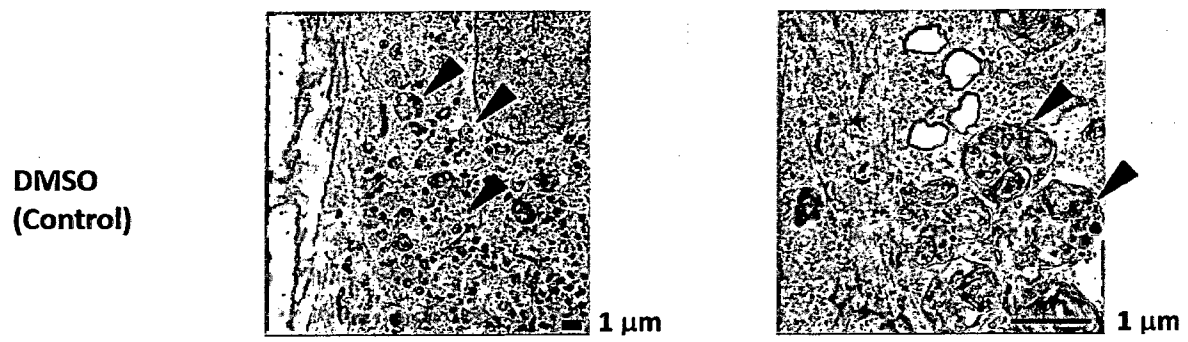
【図 1】



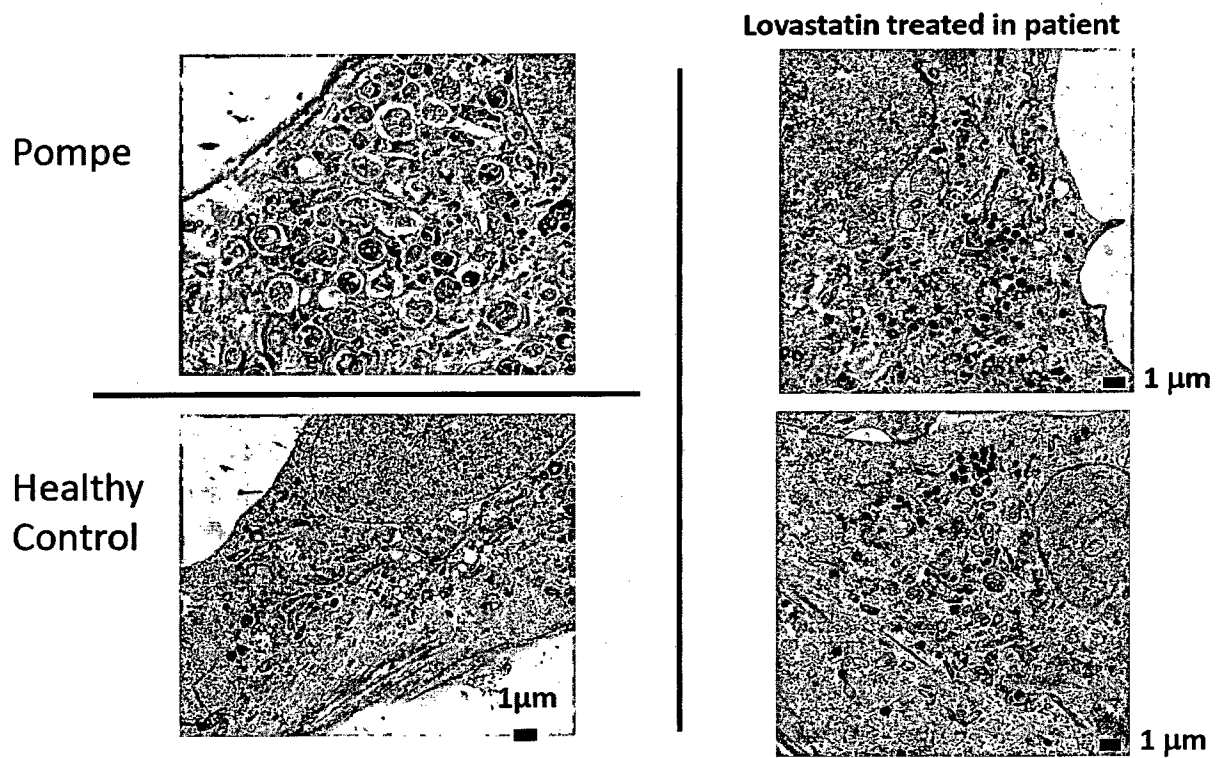
【図 2】



【図 3】

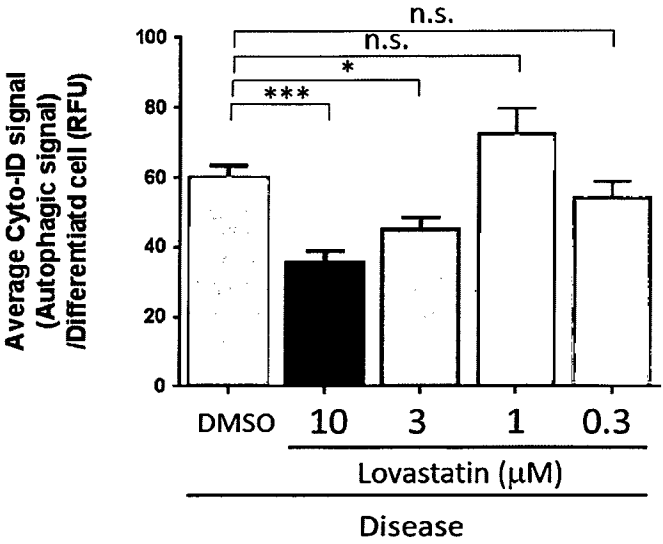
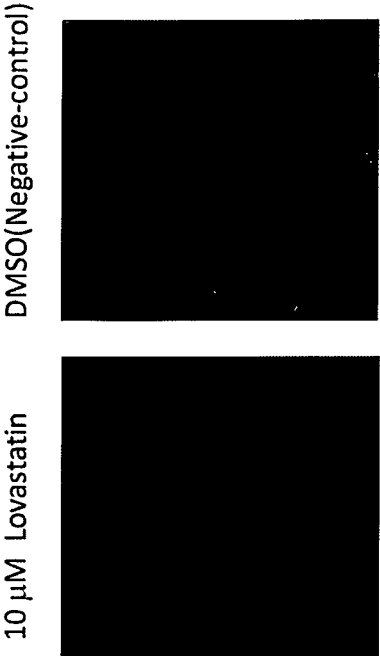


【図 4】

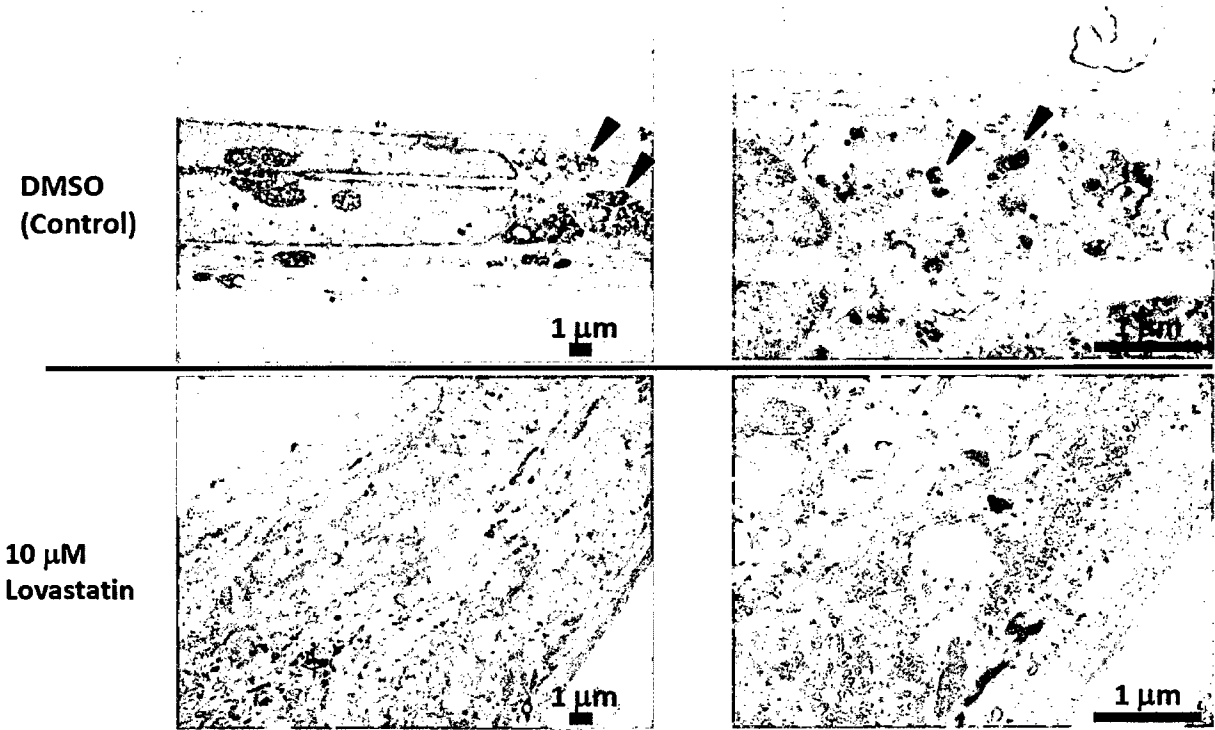


【 5 】

/mCherry/Cyto-ID (Autophagy signal)



【 6 】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/004766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A61K31/366 (2006.01) i, A61K45/00 (@@01) i, A61P3/00 (2006.01) i,
A61P21/00 (2006.01) i, A61P43/00 (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. A61K31/366, A61K45/00, A61P3/00, A61P21/00, A61P43/00

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 1971-2019

Registered utility model specifications of Japan 1996-2019

Published registered utility model applications of Japan 1994-2019

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/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/040816 A1 (RAMOT AT TEL AVIVUNIVERSITY LTD.) 02 April 2009, claims, examples 7, 8 & GB 718824 D	1, 2
X	JP 2017-536363 A (RUSH UNIVERSITY MEDICAL CENTER) 07 December 2017, claims, example 9 & US	1, 2
Y	2017/0354666 A1 & WO 2016/081365 A1, claims, example 9 & EP 3220906 A1	3
X	全陽, ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症—コレステロールエステル蓄積症 (CESD) を中心に—, 肝胆膵, 2014, vol. 69, no. 3, pp. 445-453, p. 450, left column, third paragraph, non-official translation (QUAN, Yang. Lysosome Acid Lipase Deficiency: Focus on Cholesterol Ester Storage Disease (CESD). Kan-Tan-Sui.)	1



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
25.02.2019

Date of mailing of the international search report
05.03.2019

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/JP2019/004766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-117553 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11 May 2006, paragraph [0081] (Family: none)	3
Y	WO 2010/131712 A1 (JAPAN HEALTH SCIENCES FOUNDATION) 18 November 2010, paragraph [0084] & US 2012/0264928 A1, paragraph [0114]	3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/366(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P3/00(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P43/00(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 (I P C))

Int.Cl. A61K31/366, A61K45/00, A61P3/00, A61P21/00, A61P43/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 9 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 9 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 9 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)

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	WO 2009/040816 A1 (RAMOT AT TEL AVIV UNIVERSITY LTD.) 2009.04.02, 特許請求の範囲、実施例 7 及び 8 & GB 718824 D	1, 2
X	JP 2017-536363 A (ラッシュ・ユニバーシティ・メディカル・センター) 2017.12.07, 特許請求の範囲、実施例 9	1, 2
Y	& US 2017/0354666 A1 & WO 2016/081365 A1 (Claims, Example 9) & EP 3220906 A1	3

☒ 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

2 5 . 0 2 . 2 0 1 9

国際調査報告の発送日

0 5 . 0 3 . 2 0 1 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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)

菊池 美香

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

3 9 5 4

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
X	全陽, ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症ーコレステロールエステル蓄積症 (CESD) を中心にー, 肝胆膵, 2014, 第69巻第3号, 第445ー453頁, 第450頁右欄第3段落	1
Y	JP 2006-117553 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2006.05.11, [0081] (ファミリーなし)	3
Y	WO 2010/131712 A1 (財団法人ヒューマンサイエンス振興財団) 2010.11.18, [0084] & US 2012/0264928 A1 ([0114])	3