

(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
2018年2月22日(22.02.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/034334 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7068 (2006.01) C07K 7/08 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/029600

(22) 国際出願日: 2017年8月18日(18.08.2017)

(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 2016-160390 2016年8月18日(18.08.2016) JP

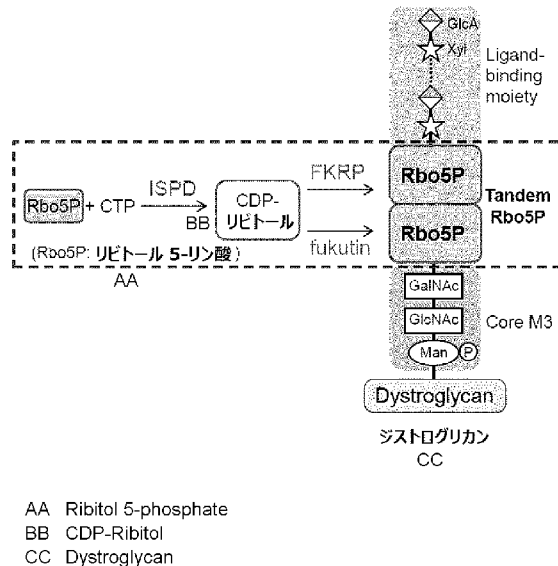
(71) 出願人: 国立大学法人神戸大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6578501 兵庫

県神戸市灘区六甲台町1番1号 Hyogo (JP). 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(TOKYO METROPOLITAN GERIATRIC HOSPITAL AND INSTITUTE OF GERONTOLOGY) [JP/JP]; 〒1730015 東京都板橋区栄町35番2号 Tokyo (JP). 地方独立行政法人大阪府立病院機構(OSAKA PREFECTURAL HOSPITAL ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒5418567 大阪府大阪府中央区大手前三丁目1番69号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 戸田 達史(TODA, Tatsushi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 小林 千浩(KOBAYASHI, Kazuhiro); 〒6578501 兵庫県神

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR DISEASES ASSOCIATED WITH ABNORMALITIES IN DYSTROGLYCAN SUGAR CHAIN MODIFICATION AND METHOD FOR ASSAYING ASSOCIATED ENZYME

(54) 発明の名称: ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤及び関連酵素測定法



(57) Abstract: Provided is a therapeutic agent which effectively acts on diseases associated with abnormalities in dystroglycan sugar chain modification. A method for diagnosing diseases associated with abnormalities in dystroglycan sugar chain modification is also provided. This therapeutic agent for diseases associated with abnormalities in dystroglycan sugar chain modification contains CDP-ribitol as an active ingredient. Ribitol phosphate is important in the sugar chain structure of dystroglycan, and a material (sugar donor) is required for ribitol phosphate to be incorporated in the sugar chain of dystroglycan. In the present invention, it is revealed for the first time that CDP-ribitol functions as a sugar donor. After observing that sugar chains of ISPD-deficient cells could be recovered by administering CDP-ribitol, the present invention was conceived in which CDP-ribitol can be used for replacement therapy.



戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 金川 基(KANAGAWA, Motoi); 〒6578501 兵庫県神戸市灘区六甲台町 1 - 1 国立大学法人神戸大学内 Hyogo (JP). 遠藤 玉夫(ENDO, Tamao); 〒1730015 東京都板橋区栄町 3 5 番 2 号 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター内 Tokyo (JP). 萬谷 博(MANYA, Hiroshi); 〒1730015 東京都板橋区栄町 3 5 番 2 号 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター内 Tokyo (JP). 和田 芳直(WADA, Yoshinao); 〒5941101 大阪府和泉市室堂町 8 4 0 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪母子医療センター内 Osaka (JP). 田尻 道子(TAJIRI, Michiko); 〒5941101 大阪府和泉市室堂町 8 4 0 地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪母子医療センター内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 庄 司 隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6 番 1 3 号 御幸ビル 3 0 7 号 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, 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).

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(57) 要約: ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患について、効果的に作用する治療剤を提供する。ジストログリカン糖鎖異常に伴う疾患の検査方法を提供する。CDP-リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤による。ジストログリカンの糖鎖構造においてリビトールリン酸が重要であり、リビトールリン酸がジストログリカン糖鎖に組み込まれるためには、その材料(糖供与体)が必要である。CDP-リビトールが糖供与体となることを本発明において初めて見出した。CDP-リビトールの投与によって、ISPD欠損細胞の糖鎖を回復できることを確認し、CDP-リビトールを補充療法に利用しうる本発明の完成に至った。

明 細 書

発明の名称：

ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤及び関連酵素測定法 技術分野

[0001] 本発明は、CDP-リビトール (cytidine diphosphate ribitol: CDP-Rbo) を有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤に関する。

[0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願 2016-160390 号優先権を請求する。

背景技術

[0003] 筋ジストロフィーは、骨格筋の壊死・再生を主病変とする遺伝性筋疾患で50以上の原因遺伝子が解明されている。骨格筋障害に伴う運動機能障害を主症状とするが、関節拘縮・変形、呼吸機能障害、心筋障害、嚥下機能障害等、様々な症状を合併することも多い。運動機能低下を主症状とするが、病型により発症時期や臨床像、進行速度には多様性がある。代表的な病型としては、福山型先天性筋ジストロフィー (Fukuyama congenital muscular dystrophy: FCMD)、ジストロフィン異常症 (デュシェンヌ型/ベッカー型筋ジストロフィー)、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、眼咽頭筋型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーなどがある。いずれの病型においても根本的な治療法はない。デュシェンヌ型に対する副腎皮質ステロイド薬の限定的効果、リハビリテーションによる機能維持、補助呼吸管理や心臓ペースメーカーなどの対症療法にとどまる。

[0004] 筋ジストロフィーのうち、FCMDはフクチン (fukutin: FKTN) 遺伝子の異常によることが知られている。FCMD以外にも、フクチン遺伝子の変異に伴って様々な病態が引き起こされる。例えば、成人発症の拡張型心筋症 (非特許文献1) 及びWalker-Warburg症候群 (Walker-Warburg syndrome: WWS) 様の重

症型先天性筋ジストロフィー（非特許文献2）が挙げられる。フクチン遺伝子におけるSVA型レトロトランスポゾン挿入変異が原因の疾患の治療のために、挿入変異型フクチン遺伝子の転写段階において正常フクチン mRNAを発現させ、正常フクチン（fukutin）タンパク質の生成を回復させることができるアンチセンス核酸について報告がある（特許文献1）。

[0005] ジストログリカン（dystroglycan：DG）は、ジストロフィン-糖タンパク質複合体（dystrophin-glycoprotein complex：DGC）の成分として骨格筋から発見された。ジストログリカンは、細胞外マトリックス分子やシナプス分子の細胞表面受容体であり、さまざまな組織で重要な役割を担っている。ジストログリカンは、リガンド結合活性を獲得するために独特な機序によって翻訳後修飾を受ける。ジストログリカンの糖鎖修飾異常は、脳奇形や精神発達遅滞を伴う筋ジストロフィーの原因になるともいわれている。

[0006] DGCは、ジストロフィンと膜型糖タンパク質群からなる分子複合体である。基底膜とアクチン骨格を結ぶ構造を形成している。このDGCが仲介する基底膜-細胞骨格の連携が、筋の伸収縮といった機械的ストレスに耐えうるような筋細胞膜の強度を維持するために重要と考えられている。ジストログリカンはジストロフィンを細胞膜直下につなぎとめる一方で、細胞外ではラミニンなどの基底膜分子と結合しており、細胞骨格と基底膜を結ぶ分子軸として機能している。ジストログリカンは、 α 及び β のサブユニットからなるが、両者は単一のmRNAにコードされており、翻訳後修飾の過程で α ジストログリカン（ α -DG）と β ジストログリカン（ β -DG）に切断される。 α -DGは高度な糖鎖修飾を受けており、細胞外サブユニットとしてリガンドと結合する機能を担う。

[0007] ジストログリカンの糖鎖は、シアル酸（Sia）-ガラクトース（Gal）-N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）-マンノース（Man）などの糖鎖構造を含み、当該糖鎖はジストログリカンのセリンやトレオニンから伸びていることが1990年代後半に確認された。FCMD型の類縁疾患の筋眼脳病（muscle-eye-brain disease：MEB）やWWSの原因遺伝子（POMGNT1、POMT）が、GlcNAcやManをつなげる糖

転移酵素であることは報告されている（非特許文献3、4）が、糖鎖異常型筋ジストロフィーの原因遺伝子であるフクチンやFKRP（fukutin-related protein）、ISPD（Isoprenoid synthase domain-containing protein）等の作用は不明であった。

[0008] CDP-リビトール（CDP-Rbo）を生合成するバクテリア由来の酵素の構造とISPDの結晶構造が似ていることから、ISPDがシチジン転移酵素活性を有することを予測した報告がある（非特許文献5）。非特許文献5ではシチジン転移酵素活性により、CTP（cytidine triphosphate）から、CDP-リブローズ、CDP-リボース及びCDP-リビトールを合成できることが示唆されている。しかしながら、いずれの物質、あるいは合成反応が生理的に作用しているかは一切証明されておらず、ISPDがシチジン転移酵素活性を有することを予測したに過ぎない。また、非特許文献5ではジストログリカン糖鎖については全く開示も示唆もされていない。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1：Ann. Neurol., 60, 597-602 (2006)
非特許文献2：Hum. Mol. Genet., 8, 2303-2309 (1999)
非特許文献3：Dev Cell., 1(5), 717-24 (2001)
非特許文献4：Proc Natl Acad Sci U S A., 101(2), 500-5 (2004)
非特許文献5：Chemistry & Biology, 22(12), 1643-52 (2015)

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開2015-91229号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明は、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患について、効果的に作用する治療剤を提供することを課題とする。さらには、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の検査方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、ジストログリカンの糖鎖構造を詳細に解析した結果、糖鎖の構造にリビトールリン酸が存在することを初めて見出した。リビトールリン酸は、哺乳類では従来確認されておらず、バクテリアや一部の植物でしか確認されていなかった。リビトールリン酸がジストログリカン糖鎖に組み込まれるためには、その材料（糖供与体）が必要である。そこで、CDP-リビトールが糖供与体となることを確認し、ISPDが哺乳類でのCDP-リビトール合成酵素活性を有することを本発明において初めて見出した。またフクチンやFKRPは、CDP-リビトールを糖供与体として、ジストログリカンの糖鎖の中にリビトールリン酸を組み込む転移酵素であることも本発明において初めて確認した。さらに、ISPD欠損細胞にCDP-リビトールを投与することで、ジストログリカン糖鎖を回復できることを確認し、CDP-リビトールを補充療法に利用しうる本発明の完成に至った。

[0013] すなわち本発明は、以下よりなる。

1. CDP-リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤。
2. ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が、ISPD、FKRP、fukutin、POMT1、POMT2、DAG1、LARGE、DPM1、DPM2、DPM3、B3GALNT2、GMPPB、TMEM5、POMK、DOLK、POMGNT1、POMGNT2及びB4GAT1から選択されるいずれかの遺伝子が異常であることに伴って発生する疾患である、前項1に記載の治療剤。
3. ジストログリカン糖鎖修飾異常が、ジストログリカン糖鎖におけるリビトールリン酸の異常である、前項1又は2に記載の治療剤。
4. ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が、 α -ジストログリカン異常症である、前項1～3のいずれかに記載の治療剤。
5. α -ジストログリカン異常症が、福山型筋ジストロフィー、Walker-Warburg症候群、筋眼脳病（MEB）、肢帯型筋ジストロフィー2I型、肢帯型筋ジストロフィー2M型及び心筋症から選択されるいずれかである、前項4に記載の治療剤。

6. ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が、ISPD遺伝子の異常に伴い、ラミニン結合性糖鎖の生合成に異常をきたす疾患である、前項2に記載の治療剤。

7. ジストログリカン糖鎖のリビトールリン酸の異常を検出することを特徴とする、筋ジストロフィーの検査方法。

8. 以下の工程を含む、フクチン活性の測定方法：

1) GalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸1分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

9. 以下の工程を含む、フクチン活性の測定方法：

1) リン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸1分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

10. リン酸化CoreM3修飾ペプチドが、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂ (配列番号2)を有するリン酸化CoreM3修飾ペプチドである、前項9に記載のフクチン活性の測定方法。

11. 以下の工程を含む、FKRP活性の測定方法：

1) リビトールリン酸を1分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸2分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

12. 以下の工程を含む、FKRP活性の測定方法：

1) リビトールリン酸を1分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 2 分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

1 3. リン酸化CoreM3修飾ペプチドが、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂ (配列番号 2) を有するリン酸化CoreM3修飾ペプチドである、前項 1 2 に記載のFKRP活性の測定方法。

1 4. ISPD、フクチン、FKRPのいずれかの遺伝子が欠損又は変異してなる細胞を用いて、CDP-リビトール又は核酸トランスフェクション試薬を混合したものを添加して培養し、その後、細胞を回収し、ジストログリカン糖鎖を解析することを特徴とする、糖鎖異常の改善効果の解析方法。

1 5. 分泌型フクチンを含む試薬。

1 6. 分泌型FKRPを含む試薬。

1 7. GalNAc β 1-3GlcNAc β 1を含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むフクチン活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型フクチンを含む試薬を構成として含むフクチン活性測定用キット。

1 8. リン酸化CoreM3修飾ペプチドを含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むフクチン活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型フクチンを含む試薬を構成として含む、フクチン活性測定用キット。

1 9. リビトールリン酸を 1 分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAc β 1を含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むFKRP活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型FKRPを含む試薬を構成として含む、FKRP活性測定用キット。

2 0. リビトールリン酸を 1 分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むFKRP活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型FKRPを含む試薬を構成として含む、FKRP活性測定用キット。

発明の効果

[0014] 本発明のCDP-リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤によれば、ジストログリカン糖鎖を回復する

ことができ、上記疾患の治療及び／又は疾患に伴う症状の改善に効果的に作用する。

[0015] フクチン (fukutin) やFKRPに変異がある患者の場合、変異によってフクチンやFKRPの酵素活性がゼロになるわけではなく、少量の活性は残存していると考えられる。フクチンやFKRPの活性がゼロになると、生存できず生まれてこない。そのようなケースでは、フクチンやFKRPの酵素反応の材料となるCDP-リビトールが大量にあれば、残っている酵素活性を利用して、ジストログリカン糖鎖へのリビトールリン酸の転移及び組込みが進むと考えられる。つまり、CDP-リビトール補充療法は、ISPD変異型のみならず、フクチンやFKRP変異型にも効果を発揮することが期待できる。また、ISPD、フクチン、FKRP以外の遺伝子であっても、ジストログリカン糖鎖修飾におけるリビトールリン酸に影響を及ぼす遺伝子であれば、それらの遺伝子の異常によるジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患に対しても、本発明のCDP-リビトールを有効成分として含有する治療剤は有効に作用しうる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]ジストログリカン糖鎖修飾異常の態様を模式的に示す図である。

[図2]本発明のCDP-リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤の作用機序を模式的に示す図である。ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の責任遺伝子として挙げられるISPD、フクチン及びFKRPの機能についても示す図である。

[図3]ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の責任遺伝子の一つとして挙げられるISPDの機能を解析した図である。(実施例1)

[図4]本発明の以前の段階で明らかになっていたジストログリカン糖鎖構造の概略を示す図である。(実施例2)

[図5]ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の責任遺伝子の一つとして挙げられるフクチンの機能を解析した図である。(実施例2)

[図6]ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の責任遺伝子の一つとして挙げられるFKRPの機能を解析した図である。(実施例3)

[図7]ゲノム編集によりISPD、fukutin又はFKRPの欠損細胞を作製し、細胞におけるジストログリカン糖鎖の生合成を確認した図である。（実施例4）

[図8]ゲノム編集によりISPD欠損細胞を作製し、CDP-リビトールを添加することでジストログリカン糖鎖が回復したことを確認した図である。（実施例5）

発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患について、効果的に作用する治療剤に関し、このような治療剤としてCDP-リビトールを有効成分として含有する。

[0018] 本明細書において、「ジストログリカン糖鎖修飾異常」とは、ジストログリカン糖鎖の構造的な異常の他、量的な異常もいう。ジストログリカン糖鎖の構成成分としての糖は、グルクロン酸、キシロース、リビトールリン酸、ガラクトサミン、グルコサミン、マンノースリン酸等が挙げられ、特にリビトールリン酸が重要である。リビトールリン酸がジストログリカン糖鎖に組み込まれるためには、その材料（糖供与体）が必要である。本発明において、CDP-リビトールが糖供与体となること、そしてISPDが哺乳類のCDP-リビトール合成酵素であることを初めて確認した（図2参照）。さらにフクチンやFKRPは、CDP-リビトールを糖供与体として用い、リビトール5リン酸を糖（それぞれGalNAc-3部位、又はリビトール5リン酸のC1部位）に転移させる転移酵素であることも本発明において初めて確認した（図2参照）。

[0019] 本明細書において、「ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患」とはジストログリカン糖鎖の構造的及び／又は量的な異常に伴う疾患が挙げられる。ジストログリカンを構成する α ジストログリカン（ α -DG）及び β ジストログリカン（ β -DG）のサブユニットのうち、 α -DGは高度な糖鎖修飾を受けている。 α -DGは細胞外サブユニットとしてラミニン、ニューレキシン、アグリン等のリガンドと結合し、基底膜と細胞骨格を結ぶ役割を担っている（図1参照）。 α -DGの糖鎖修飾異常に伴い、ジストログリカンのリガンド結合能が消失したり減弱化することで、細胞膜と基底膜の接着が壊れ、その結果疾患

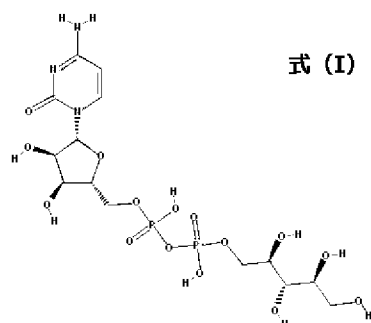
に至る。このような疾患としては、いわゆる α -DG異常症の他、拡張型心筋症や α -DGの糖鎖修飾異常に伴う腫瘍などが挙げられる。いわゆる α -DG異常症の例として、例えば生化学、第86巻第4号、452-463（2014）に例示される疾患、具体的には筋ジストロフィー（ジストログリカノパチー）、より具体的には、FCMD、WWS、MEB病、肢帯型筋ジストロフィー2I型、肢帯型筋ジストロフィー2M型などが挙げられる。腫瘍としては、例えばMolecular Cancer（2015）14:141、Proc Natl Acad Sci USA, 2009 Jul 21;106(29):12109-14.、Cancer Res. 2004 Sep 1;64(17):6152-9.等に列挙される腫瘍のいずれかが挙げられる。

[0020] 本発明のジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の責任遺伝子として、例えばISPD、FKRP、fukutin、POMT1、POMT2、DAG1、LARGE、DPM1、DPM2、DPM3、B3GALNT2、GMPPB、TMEM5、POMK、DOLK、POMGNT1、POMGNT2及びB4GAT1などが挙げられる。好ましくは、ISPD、FKRP、fukutinが挙げられる。本発明のジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患は、上記列挙した遺伝子から選択されるいずれかの遺伝子の欠失、変異、又はエピジェネティックな変化による発現低下等による異常に伴って発生する疾患も含まれる。ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患として、例えば腎がん等が報告されている。これらの疾患等においては、LARGE2やISPDの異常が観察されている（Miller et al. Molecular Cancer（2015）14:141）。また、フクチン遺伝子の異常による拡張型心筋症による筋力の低下等も報告されている（非特許文献1）。上記列挙した遺伝子の異常に伴って発生する疾患であれば、上記具体的に示す疾患以外の疾患も本発明の対象疾患として包含される。特にISPD遺伝子の異常に伴い、ラミニン結合性糖鎖の生合成に異常をきたす疾患である。また、本発明のCDP-リビトールを有効成分として含有する治療剤は、ISPD変異型のみならず、フクチンやFKRP変異型の他、ジストログリカン糖鎖修飾におけるリビトールリン酸に影響を及ぼす遺伝子の変異の場合も、有効に作用しうる。

[0021] 本発明の治療剤は、CDP-リビトールを有効成分として含有する。本明細書において、有効成分として含有するCDP-リビトールとは、以下の式（I）に示

す構造からなる化合物の他、当該化合物の誘導体や、当該化合物若しくは当該化合物誘導体の薬学的に許容される塩であってもよいし、水和物であってもよい。

[化1]



[0022] 本発明の治療剤は、CDP-リブトールを有効成分として含有し、薬学的に許容される担体又は添加剤を適宜配合して製剤化することができる。担体又は添加剤の配合割合については、医薬品分野において通常採用されている範囲に基づいて適宜設定すればよい。配合できる担体又は添加剤は特に制限されないが、例えば、水、生理食塩水、その他の水性溶媒、水性又は油性基剤等の各種担体、賦形剤、結合剤、pH調整剤、崩壊剤、吸収促進剤、滑沢剤、着色剤、矯味剤、香料防腐剤、等張化剤、安定化剤、分散剤、酸化防止剤、緩衝剤等の各種無毒性の添加剤が挙げられる。無毒性の添加剤としては、例えば、でんぷん、ゼラチン、ブドウ糖、乳糖、果糖、マルトース、炭酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ペトロラタム、グリセリン、エタノール、シロップ、塩化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、クエン酸、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

[0023] 本発明の治療剤は、上記説明した「ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患」の患者に対して投与し、疾患の治療及び／又は疾患に伴う症状の軽減化のために使用することができる。投与経路は特に限定されないが、経口投

与又は非経口投与とすることができる。

[0024] 本発明の治療剤は、各投与方法に適した剤形に製剤化すればよい。経口投与の製剤形態としては、例えば錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、細粒剤、丸剤、トローチ剤、舌下錠、坐剤、軟膏、乳剤、懸濁剤、シロップなどが挙げられる。非経口投与では注射剤や経皮製剤が挙げられる。注射剤では静脈内投与、皮下投与、筋肉内投与等することができ、経皮製剤では、経皮投与、経粘膜投与等の局所投与することができる。なお、製剤中には、本発明の有用性を補強したり増強したりするために、他の薬剤を含有させてもよい。

[0025] 本発明の治療剤の用量は、対象となる疾患の重症度、治療目的等によって異なり、さらに剤形、投与経路、患者の年齢や体重によっても異なる。例えば注射剤として投与する場合、1日当たり約0.01mg～60g程度、好ましくは約0.1mg～24g程度、より好ましくは約0.1mg～6g程度を投与することができる。投与間隔は1日1回～数回、又は1日～2週間の間隔を設定することができる。

[0026] 本発明の治療剤は、上記説明した「ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患」の患者に対し、他の作用メカニズムで作用する薬剤、例えば特許文献1（特開2015-91229号公報）に開示するアンチセンス核酸（治療のために挿入変異型フクチン遺伝子のプレmRNAの塩基配列に相補的な配列を含むアンチセンス核酸）とともに同時、又は前後して使用することができる。

[0027] 本発明は、ジストログリカン糖鎖のリビートルリン酸の異常を検出することを特徴とする、筋ジストロフィーの検査方法にも及ぶ。筋ジストロフィーには、FCMD、ジストロフィン異常症（デュシェンヌ型／ベッカー型筋ジストロフィー）、肢帯型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、エメリー・ドレイフス型筋ジストロフィー、眼咽頭筋CDP-リビートル型筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィーなどが挙げられ、ジストログリカン糖鎖修飾異常とは異なる原因によるものもある。筋ジストロフィーの患者において、ジストログリカン糖鎖のリビートルリン酸の異常を検出することで、筋ジストロフィーの病型を見極め、より適切な治療方法を選択することが

できる。

[0028] さらに本発明はフクチン活性やFKRP活性の測定方法にも及ぶ。本発明において、フクチン及びFKRPの各活性を確認したところ、いずれもリビトール転移酵素活性、具体的にはCDP-リビトールからRbo5Pを糖鎖中にRbo5Pを結合させて糖鎖を合成する転移酵素であると考えられる。フクチンは図5に示す酵素活性を有し、FKRPは図6に示す酵素活性を有する。これらの酵素反応から、検体中のリビトール転移酵素活性を測定することができる。さらに、本発明はフクチン活性又はFKRP活性の測定方法により、複数の候補化合物からフクチン又はFKRPの活性に影響を及ぼす化合物をスクリーニングし、選別することができる。フクチン又はFKRPの活性に影響を及ぼす化合物は、低分子化合物であってもよいし、タンパク質やその一部を構成する高分子化合物等であってもよい。

[0029] フクチンの酵素活性は、例えば以下の1)及び2)の工程を含む方法により測定することができる。CoreM3はジストログリカン糖鎖を構成する糖鎖の一部であって、糖鎖としてGalNAc β 1-3GlcNAcを含む。

1) GalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸1分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

[0030] 1) リン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸1分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

上記1)のリン酸化CoreM3修飾ペプチドのペプチド配列の例として、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂(配列番号2)が挙げられる。

[0031] フクチンの活性測定方法を利用して、フクチンと候補化合物を作用させ、フクチンの活性に影響を及ぼす化合物を選別することができる。例えば、以下の1')及び2')の工程を含む方法によることができる。

[0032] 1') GalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに分泌型フクチンと候補化合物を加えて反応させる工程；

2') 反応産物であるリビトールリン酸 1 分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

[0033] 1') リン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに分泌型フクチンと候補化合物を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 1 分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

上記 1') のリン酸化CoreM3修飾ペプチドのペプチド配列の例として、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂ (配列番号 2) が挙げられる。上記 1') 及び 2') の工程において、1') の工程で候補化合物を含まない系を対照として測定することができる。候補化合物がフクチンの活性を増強させる作用を有する場合は、反応産物が対照に比べて高く、候補化合物がフクチンの活性を低減させる作用を有する場合は、反応産物が対照に比べて低い値を示す。

[0034] 例えばヒトフクチンの遺伝子情報は、GenBank RefSeq: NM_006731 (配列番号 3) に開示されており、アミノ酸配列は以下の配列番号 4 で特定される。分泌型フクチンは膜貫通部位を欠くフクチンであり、細胞外分泌型フクチンでもある。フクチンの膜貫通部位を取り除いた分泌型の組換え体として発現させて作製することができる。例えば、配列番号 4 に示すアミノ酸配列のうち、Tyr28から終止コドンまでの配列を含む構造からなる。そのN末端には、配列番号 5 に示すアミノ酸配列を付加することができる。配列番号 5 に示す配列はthe signal sequence of Gaussia luciferase、His/myc tags、制限酵素サイトである。

[0035] ヒトフクチンのアミノ酸配列 (配列番号 4)

MSRINKNVVLALLTLTSSAFLLFQLYYYKHYLSTKNGAGLSKSKGSRIGFDSTQWRAVKKFIMLTSNQN
VPVFLIDPLILELINKNFEQVKNTSHGSTSQCKFFCVPRDFTAFALQYHLWKNEEGWFRIAENMGFQCL
KIESKDPRLDGLSLSGTEIPLHYICKLATHAIHLVVFHERSGNYLWHGHLRLKEHIDRKFPFRKLQF

GRYPGAFDRPELQQVTVDGLEVLIPKDPMHFVEEVPHSRFIECRYKEARAFFQQYLDDNTVEAVAFRKS
AKELLQLAAKTLNKLGVFWLSSGTCLGWYRQCNIIPYSKDVDLGIFIQDYKSDIILAFQDAGLPLKHK
FGKVEDSLELSFQGGKDDVKLDVFFFYEETDHMWNGGTQAKTGKKFKYLFPKFTLCWTEFVDMKVHVPCE
TLEYIEANYGKTWKIPVKTWDWKRSPPNVQPNGIWPISWDEVIQLY

[0036] 付加配列（配列番号 5）

MGVKVLFALICIAVAEAKPTHHHHHEQKLISEEDLRNS

[0037] FKRPの酵素活性は、上記フクチンの酵素活性と同様に、例えば以下の 1) 及び 2) の工程を含む方法により測定することができる。

1) リビトールリン酸を 1 分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 2 分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

[0038] 1) リビトールリン酸を 1 分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 2 分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

上記 1) のリン酸化CoreM3修飾ペプチドのペプチド配列の例として、Ac-AT (Man)PAPVAAIGPK-NH₂（配列番号 2）が挙げられる。

[0039] FKRPの活性測定方法を利用して、FKRPと候補化合物を作用させ、FKRPの活性に影響を及ぼす化合物を選別することができる。例えば、以下の 1') 及び 2') の工程を含む方法によることができる。

[0040] 1') リビトールリン酸を 1 分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに分泌型FKRPと候補化合物を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 2 分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

[0041] 1') リビトールリン酸を1分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに分泌型FKRPと候補化合物を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸2分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

上記1') のリン酸化CoreM3修飾ペプチドのペプチド配列の例として、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂ (配列番号2) が挙げられる。上記1') 及び2') の工程において、1') の工程で候補化合物を含まない系を対照として測定する。候補化合物がFKRPの活性を増強させる作用を有する場合は、反応産物が対照に比べて高く、候補化合物がFKRPの活性を低減させる作用を有する場合は、反応産物が対照に比べて低い値を示す。

[0042] 例えばヒトFKRPの遺伝子情報は、GenBank RefSeq: NM_024301 (配列番号6) に開示されており、そのアミノ酸配列は、以下の配列番号7で特定される。分泌型FKRPは膜貫通部位を欠くFKRPであり、細胞外分泌型FKRPでもある。FKRPの膜貫通部位を取り除き分泌型の組換え体として発現させて作製することができる。例えば、配列番号7に示すアミノ酸配列のうち、Asn33から終止コドンまでの配列を含む構造からなる。そのN末端には、配列番号8に示すアミノ酸配列を付加することができる。配列番号8に示す配列はthe signal sequence of murine preprotrypsin、His/myc tagsである。

[0043] ヒトFKRPのアミノ酸配列 (配列番号7)

MRLTRCQAALAAAITLNLVLFYVSWLQHQPNSRARGPRRASAAGPRVTVLVREFEAFDNAVPELVDS
FLQQDPAQPVVVAADTLPPYPLALPRIPNVRLALLQPALDRPAAASRPETYVATEFVALVPDGARAEAP
GLLERMVEALRAGSARLVAAPVATANPARCLALNVSLREWTARYGAAPAAPRCDALDGDVAVLLRARDL
FNLSAPLARPVGTSLFLQTALRGWAVQLLDLTFAAARQPPLATAHARWKAEREGRARRAALLRALGIRL
VSWEGGRLEWFGCNKETTRCFGTVVGDTPAYLYEERWTPCCLRALRETARYVVGVLAAAGVRYWLEGG
SLLGAARHGDIIPWDYDVDLGIYLEDVGNCEQLRGAEAGSVVDERGFVWEKAVEGDFFRVQYSES NHLH
VDLWPFYPRNGVMTKDTWLDHRQDVEFPEHFLQPLVPLPFAGFVAQAPNNYRRFLELKFPGGVIENTPQY
PNPALLSLTGSG

[0044] 付加配列（配列番号 8）

MSALLILALVGAAVADYKHHHHHHEQKLISEEDLR

[0045] フクチンやFKRPの酵素反応は、例えば $37 \pm 1^\circ\text{C}$ の温度条件で、5分～48時間、好ましくは1～24時間反応させることで達成される。フクチンは、具体的には図5に示す酵素活性を有し、反応産物はリビトールリン酸1分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドが挙げられる。フクチンは、CDP-リビトールからRbo5Pを例えば糖鎖中のGalNAc-3部位に結合させて糖鎖を合成する転移酵素（CDP-Rbo: GalNAc-3 Rbo5P転移酵素）であると考えられる。FKRPは、具体的には図6に示す酵素活性を有し、反応産物はリビトールリン酸2分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドが挙げられる。FKRPは、CDP-リビトールからRbo5Pを、例えば糖鎖中のリビトール5リン酸のC1部位に結合させて糖鎖を合成する転移酵素（CDP-Rbo: Rbo5P-1 Rbo5P転移酵素）であると考えられる。

[0046] フクチンやFKRPの酵素反応により得られた反応産物、例えばリビトールリン酸1分子を含むリン酸化CoreM3やリビトールリン酸2分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドは、HPLC、質量分析、LC/MS、放射性同位体標識CDP-リビトール等、自体公知の方法又は今後開発されるあらゆる方法により測定することができる。

[0047] 本発明は、上記説明した分泌型フクチン又は分泌型FKRPにも及ぶ。分泌型フクチンを含む試薬（以下、「分泌型フクチン試薬」）又は分泌型FKRPを含む試薬（以下、「分泌型FKRP試薬」）は、フクチンやFKRPの酵素反応の測定系において、有効に使用することができ、例えば化合物のスクリーニングに使用することができる。これらの測定系に使用可能な分泌型フクチン試薬又は分泌型FKRP試薬は、各々測定用酵素標品としても使用することができる。

[0048] 本発明は、さらにフクチン活性測定用キット及びFKRP測定用キットに及ぶ。これらの活性測定用キットには、基質用試薬を構成として少なくとも含み、糖供与体を含む試薬及び／又は酵素源を含む試薬を構成として含ませることができる。

[0049] フクチン活性測定用キットとしては以下を構成とすることができる。基質

用試薬として、GalNAc β 1-3GlcNAcを含む試薬（以下「GalNAc β 1-3GlcNAc試薬」）又はリン酸化CoreM3修飾ペプチドを含む試薬（以下「リン酸化CoreM3修飾ペプチド試薬」）のいずれかを選択することができる。リン酸化CoreM3修飾ペプチドのペプチド配列の例として、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂（配列番号2）が挙げられる。糖供与体を含む試薬として、CDP-リビトールを含む試薬（以下「CDP-リビトール試薬」）が挙げられる。酵素源を含む試薬として、分泌型フクチンを含む試薬（以下「分泌型フクチン試薬」）を使用することができる。例えば検体中のフクチン活性のみを測定する場合には、分泌型フクチン試薬は使用しなくてもよい。また、フクチンの活性に影響を及ぼす化合物の活性を確認する場合等には、分泌型フクチン試薬を使用することができる。分泌型フクチン試薬は、フクチンの酵素標品としても使用することができる。

[0050] FKR活性測定用キットとしては以下を構成とすることができる。基質用試薬として、リビトールリン酸を1分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAcを含む試薬（以下「リビトールリン酸化1GalNAc β 1-3GlcNAc試薬」）又はリビトールリン酸を1分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを含む試薬（以下「リビトールリン酸化1リン酸化CoreM3修飾ペプチド試薬」）のいずれかを選択することができる。リン酸化CoreM3修飾ペプチドのペプチド配列の例として、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂（配列番号2）が挙げられる。糖供与体を含む試薬として、CDP-リビトールを含む試薬（以下「CDP-リビトール試薬」）が挙げられる。酵素源を含む試薬として、分泌型FKRPを含む試薬（以下「分泌型FKRP試薬」）を使用することができる。例えば検体中のFKRP活性のみを測定する場合には、分泌型FKRP試薬は使用しなくてもよい。また、FKRPの活性に影響を及ぼす化合物の活性を確認する場合等には、分泌型FKRP試薬を使用することができる。分泌型FKRP試薬は、FKRPの酵素標品としても使用することができる。

[0051] ISPD、フクチン及びFKRPのいずれかの遺伝子が欠損又は変異している細胞を用いてジストログリカン糖鎖を解析することができる。ISPD、フクチン及

びFKRPのいずれかの遺伝子が欠損又は変異している細胞は、ゲノム編集等の手法により作製することができる。遺伝子を欠損させた細胞又は遺伝子を変異させた細胞を作製することができる。また、上記ISPD、フクチン及びFKRPのいずれかの遺伝子が欠損又は変異している細胞の代わりにジストログリカン糖鎖修飾異常を伴う患者由来細胞を使用することもできる。上記ISPD、フクチン、FKRPのいずれかの遺伝子を欠損あるいは変異を導入した細胞、またはジストログリカン糖鎖修飾異常を伴う患者由来細胞に対して、CDP-リビトール（単体、又は核酸トランスフェクション試薬と混合したものを添加し、培養後、細胞を回収し、ジストログリカンの糖鎖状況を確認することができる。係る測定系に、ジストログリカンの糖鎖形成に効果があると考えられる候補化合物を作用させることで、ジストログリカンの糖鎖状況を指標に候補化合物の効果を検証することができる。ジストログリカンの糖鎖状況の確認は、ウエスタンブロット法や免疫染色法等、自体公知の方法を適用することができるし、今後開発される方法を適用することができる。

実施例

[0052] 以下、本発明の理解を深めるために参考例及び実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0053] （参考例１）

本参考例では、本発明を完成するに至ったジストログリカン糖鎖の構造解析経緯、及び糖鎖構造の解析のための質量分析用ジストログリカンの調製について説明する。

[0054] ジストログリカン糖鎖の構造解析を行うに当たり、生体組織からは解析に必要なサンプル量を確保するのが困難であった。一方で、サンプル量の大量確保が可能な遺伝子組換え体については、培養細胞に遺伝子組み換えジストログリカンを発現させても、生体組織のジストログリカンと同様な生理活性をもつ糖鎖が修飾される効率はきわめて低く、生体での糖鎖構造とは異なることも問題であった。更に、ジストログリカンには糖鎖修飾が生じ得るセリン・トレオニン残基が４０か所程度存在し、糖鎖修飾の不均一性が高いこと

も、糖鎖解析を困難にさせる要因の一つであった。

[0055] そこで、まず、遺伝子組換えジストログリカンに生体組織のジストログリカンと同様の生理的な糖鎖を修飾できる細胞株を探索した。その結果、NIH3T3細胞では、遺伝子組換えジストログリカンに高効率で生理的な糖鎖が修飾されることを見出した。

[0056] 上記に基づき、遺伝子組換え操作により、ジストログリカンのN末端球状領域（アミノ酸番号1番目から313番目）と糖鎖修飾部位（N末端球状領域に続くムチン領域内に存在する）のセリン及びトレオニンを合計で5個含む20アミノ酸（ジストログリカンのアミノ酸番号314番目から333番目）に限定した野生型（WT）ジストログリカンを設計した。ジストログリカンの成熟過程において、N末端球状領域は310番目のアミノ酸で切断プロセッシングをうけるため、解析に用いた成熟型のジストログリカンには存在しない。つまり、解析に用いたジストログリカンは、アミノ酸番号311番目から333番目までで構成される。別途、ジストログリカンのN末端球状領域、190番目のアミノ酸をトレオニンからメチオニンへ変異させた変異型（T190M）も作出した。190番目の変異箇所は糖鎖修飾領域には含まれていないが、190番目に変異した変異体によれば、生理的糖鎖の一部であるキシロース（Xyl）とグルクロン酸（GlcA）の二糖を単位とする繰り返し構造（Xyl-GlcAリピート）が修飾されない。更に、20アミノ酸の配列中にリジン残基を導入し、320番目のアミノ酸をトレオニンからリジンに変異させた、リジン切断酵素処理でより断片化できる変異型（T320K）も作出した。以下、野生型、変異型等特に限定しない遺伝子組換えジストログリカンを、単に「rDG」といい、糖鎖修飾部位を20アミノ酸（ジストログリカンのアミノ酸番号314番目から333番目）に限定した野生型ジストログリカンを「DG^{WT}」、変異型ジストログリカンを各々「DG^{T190M}」又は「DG^{T320K}」という。これらの組換えジストログリカンのC末端にプレジジョン切断配列、Fcタグを含むものを、各々「DGFc」、「DGFc^{WT}」、「DGFc^{T190M}」、「DGFc^{T320K}」という。

[0057] rDGを発現するNIH3T3安定発現細胞株を樹立した。その結果、DG^{WT}とDG^{T320K}に

は生理的糖鎖が修飾されることを確認したが、DG^{T190M}では生理的糖鎖修飾は生じなかった。

[0058] rDG安定発現NIH3T3細胞をBelloCell^(R)培養装置にて1週間培養し、培養上清を回収した。Protein A-beadsを用いて、培養上清からDGFcを回収した。次いで、プレシジョン酵素処理によりFcタグ部分を切断し、Protein A-beadsにてFcタグ部分を除去し、グルタチオン-beadsによりPreScission Proteaseを除去した。rDGには生理活性をもつ糖鎖以外の糖鎖も含まれているが、O-glycosidaseと α 2,3,6,8,9-neuramidase処理によって、シアル酸とO-GalNAc型糖鎖を除去した。更にイオン交換カラムでの酢酸アンモニウム溶出(0.1, 0.25, 0.5, 0.75Mのステップワイズ溶出)により、rDGを分画し、糖鎖構造解析用試料とした。

[0059] MALDI-TOFを用いた質量分析により、糖鎖構造解析を行った。質量分析計はMALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems)を使用した。DG^{WT}では、高濃度酢酸アンモニウム溶出画分に、Xyl-GlcAリピートの修飾を示す、質量308間隔のシグナルが検出されたことから、生理的糖鎖が修飾されたことが示された。一方、DG^{T190M}では、Xyl-GlcAリピートが認められず、代わりに6138の質量を示すピークが得られた。この6138の質量をもつ糖ペプチドはXyl-GlcAリピート構造のみが修飾されていないものとなる。生理活性糖鎖はリン酸ジエステル結合によりコア糖鎖に結合しているとされるが、リン酸ジエステル結合を化学的に切断するフッ化水素でDG^{WT}の糖ペプチドを処理すると、5402の質量をもつ糖ペプチドが得られた。つまり、6138-5402の差で得られる質量736の糖鎖の存在が見出された。

[0060] リニアイオントラップ(LTQ)と電場型フーリエ変換質量分析機構(Orbitrap)の2つの分析部からなるハイブリッド質量分析システム(LTQ XLTM ion trap mass spectrometer、Thermo Fisher Scientific社)を用いて質量736の糖鎖の構成成分を解析したところ、ひとつのXyl-GlcAユニットと、質量134と80からなるユニットが二つ存在することが示された。質量134と80の成分を精密質量分析すると、134はC₅H₁₂O₅の化学式をもつ分子、80はリン酸であること

がわかった。 $C_5H_{12}O_5$ の化合物は、リビトール、キシリトール、アラビトールのいずれかであるため、それぞれを標準物質として、rDGの単糖組成分析を行ったところ、ジストログリカンにリビトールが含まれていることが明らかになった。

[0061] 以上により、コア糖鎖とXyl-GlcAリピートを結ぶ質量736の構造は、リビトールリン酸ーリビトールリン酸-Xyl-GlcAであることが明らかになった。また、DG^{T320K}にもリビトールリン酸が含まれていることを確認した。リビトールリン酸は、ごく一部のバクテリアや植物（福寿草の仲間）にのみ存在が確認されていたが、哺乳類におけるリビトールリン酸は確認されていなかった。そこで、以下に示す各実施例によりジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の責任遺伝子とリビトールリン酸が糖鎖に組み込まれるための機構を解析した。

[0062] （実施例1）ISPDの作用

本実施例では、筋ジストロフィー責任遺伝子の一つであるISPDについて、ジストログリカン糖鎖修飾における機能を確認した。

[0063] 1. 正常ISPDによる反応

バクテリアでは、CDP-リビトールはリビトールリン酸（リビトール5リン酸：Rbo5P）とCTPの反応によって合成される。本実施例ではISPDの作用について、リビトールリン酸からCTPを基質（Substrate）としてCDP-リビトールを合成可能かについて検討した。His-tag付ヒトISPDを遺伝子組換え操作により作製し、酵素源とした。ヒトISPDの遺伝子情報は、RefSeq: NM_001101426に開示されている。作製したヒトISPDとリビトールリン酸及びCTPを混合して酵素反応させ、酵素反応物をHPLCで分析した。酵素反応は、ヒトISPDを100 mM MOPS-NaOH (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM CTP, 2 mM Rbo5P 合計40 μ lの反応液中で、37°C、2時間反応の条件で行った。HPLCは、4.6×150 mm COSMOSIL^(R) PBrカラム (Nacalai Tesque) を用いて、3%メタノール/97%酢酸トリエチルアミン (pH 7.3) で30°Cでのisocratic溶出の条件で行い、酵素反応物を254nmの吸光度で検出した。酵素反応前でみられるピークは基質としてのCTPであっ

たが、酵素反応後ではCTPのピークは減少し、新たなピークとしてCDP-リビトールが確認された（図3左）。これにより、ISPDはCDP-リビトール合成酵素であることが確認された（図2）。

[0064] 2. 変異型ISPDによる反応

ISPD変異患者に係る変異型ISPD（p.D156N、p.M213R、p.T238I）について、上記1. と同手法により各々遺伝子組換えISPDを作製し、酵素反応を行った。酵素反応物であるCDP-リビトール量を確認した。その結果、CDP-リビトールを示すピーク値は正常ISPDで反応させた場合と比べて低かった。変異型ISPDによればCDP-リビトールの合成量が低いことが確認された（図3右）。

[0065] CDP-リビトールは、リビトールリン酸が糖鎖に組み込まれるための糖供与体基質として重要である。本実施例の結果より、ISPDによりCDP-リビトールを生合成できるが、変異型ISPDではCDP-リビトールの生合成に支障をきたし、疾患に至ることが考えられた。

[0066] （実施例2）フクチンの作用

本実施例では、筋ジストロフィー責任遺伝子の一つであるfukutinについて、ジストログリカン糖鎖修飾における機能を確認した。

[0067] 1. 正常フクチンによる反応

ジストログリカン糖鎖の合成に及ぼすフクチンの作用について検討した。ヒトフクチンを遺伝子組換え操作により作製した。ヒトフクチンの遺伝子情報は、RefSeq: NM_006731に開示されている。フクチンは膜貫通部位を取り除き分泌型の組換え体として発現させた。CDP-リビトールを糖供与体基質（リビトールリン酸の供与元）とし、リン酸化CoreM3修飾ペプチドを糖受容基質とし、作製した分泌型ヒトフクチンと混合して酵素反応させ、酵素反応物をHPLCにより解析した。酵素反応は、アガロースビーズに結合したヒトフクチン 25 μ l を 100 mM MES (pH 6.5) , 0.5 mM CDP-Rbo, 0.1 mM リン酸化CoreM3修飾ペプチド, 10 mM $MnCl_2$, 10mM $MgCl_2$, 0.5% Triton X-100 合計50 μ l の反応液中で、37°C、16時間反応の条件で行った。酵素反応物を5×250 mm Mightysil RP-18GP Aqua カラム (Kanto Chemical) を用いた逆相HPLCにて分離した

。溶媒Aを0.1% TFA (trifluoroacetic acid) 含有蒸留水、溶媒Bを0.1% TFA 含有アセトニトリルとし、1 ml/minの流速で、0%–40%の溶媒Bの直線濃度勾配の条件で酵素反応物を溶出した。溶出物を214nmの吸光度で検出した。ここで、CoreM3はジストログリカン糖鎖を構成する糖鎖の一部であって、GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-4Man-からなる（図4参照）。Manがリン酸化されていることが、その先の糖鎖修飾に重要である。ここで、ペプチドとは、Ac-ATPAPVAAIGPK-NH₂（配列番号1）をいう。このペプチドはジストログリカンの配列を模倣しているがトレオニンがひとつしか含まれない。合成の際は、Man修飾型トレオニンを用いるため、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂（配列番号2）となる。配列番号2のMan修飾ペプチドを出発材料に、POMGNT2, B3GALNT2, POMKによる段階的な酵素反応により、リン酸化CoreM3修飾ペプチドを用意した。フクチン酵素反応前は糖受容基質であるリン酸化CoreM3修飾ペプチドのピークしかみられないが（図5左図、反応前）、反応後はリン酸化CoreM3修飾ペプチドのピークが減少し、新たにProduct1のピークがみられた（図5左図、反応後）。

[0068] このProduct1の構造を質量分析により解析した結果、Product1は1分子のリビトールリン酸を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドであることが確認された（図5左上より2番目）。これにより、ヒトフクチンは、CDP-リビトールからリビトールリン酸を糖鎖に組み込む酵素、リビトール転移酵素であることが確認された（図2）。

[0069] 2. 変異型フクチンによる反応

フクチン変異患者に係る変異型フクチン（p.M133T、p.R307Q）について、上記1. と同手法により分泌型遺伝子組換えフクチンを作製し、同手法により酵素反応を行った。p.M133T変異型フクチンでは酵素反応物であるProduct1を示すピーク量が正常フクチンの場合と比べて低く（図5左上より3番目）、p.R307Q変異型フクチンではProduct1を示すピークが確認できなかった（図5左上より4番目）。つまり、変異型フクチンによれば、リビトールリン酸転移酵素活性が低下していることが確認された。

[0070] 酵素反応物を核磁気共鳴（NMR）で解析し、リビトールリン酸が結合する部位について同定した。解析は1次元 ^1H - ^{13}C （HSQC）及び2次元 ^1H - ^{31}P （HMBC）により行なった。その結果、フクチンは、CDP-リビトールからRbo5Pを糖鎖中のGalNAc-3部位に転移させて糖鎖を合成する転移酵素（GalNAc-3 Rbo5P転移酵素）であると考えられた。

[0071] （実施例3）FKRPの作用

本実施例では、筋ジストロフィー責任遺伝子の一つであるFKRPについて、ジストログリカン糖鎖修飾における機能を確認した。

[0072] 1. 正常FKRPによる反応

ジストログリカン糖鎖の合成に及ぼすFKRPの作用について検討した。ヒトFKRPを遺伝子組換え操作により作製した。ヒトFKRPの遺伝子情報は、RefSeq: NM_024301に開示されている。実施例2と同様にFKRPは膜貫通部位を取り除き分泌型の組換え体として発現させた。実施例2と同様にCDP-リビトールを糖供与体基質（リビトールリン酸の供与元）とし、実施例2で作製した1分子のリビトールリン酸を含む糖ペプチド（Product1）を糖受容基質として、作製した分泌型ヒトFKRPと混合して酵素反応させ、酵素反応物をHPLCで分析した（図6）。酵素反応は、アガロースビーズに結合したヒトFKRP 25 μl を100 mM MES（pH 6.5）、0.5 mM CDP-Rbo, 0.1 mM リビトールリン酸-リン酸化CoreM3修飾ペプチド, 10 mM MnCl_2 , 10mM MgCl_2 , 0.5% Triton X-100 合計50 μl の反応液中で、37℃、16時間反応の条件で行った。酵素反応物を実施例2と同手法により逆相HPLCにて分離、溶出し、溶出物を214nmの吸光度で検出した。

[0073] 反応前はProduct1のピークしかみられないが（図6左図、反応前）、反応後は、Product1のピークの代わりに新たにProduct2のピークがみられた（図6左図、反応後）。このProduct2のピークを質量分析すると2分子のリビトールリン酸を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドであることが確認された（図6左上より2番目）。これにより、ヒトFKRPは、CDP-リビトールからリビトールリン酸を糖鎖に組み込む酵素、リビトール転移酵素であることが確認さ

れた（図2）。

[0074] 2. 変異型FKRPによる反応

FKRP変異患者に係るp.Y307N変異型FKRPについて、上記1. と同手法により分泌型遺伝子組換えFKRPを作製し、酵素反応を行った。変異型FKRPでは酵素反応物であるProduct2を示すピーク量が正常FKRPの場合と比べて低く、Product1のピークが残っていた（図6左上より3番目）。つまり、変異型FKRPではリビトールリン酸転移酵素活性が低下していることが確認された。酵素反応物のNMR解析を行ない、リビトールリン酸が結合する部位についても同定した。FKRPは、CDP-リビトールからRbo5Pを糖鎖中のリビトール5リン酸のC1部位に転移させて糖鎖を合成する転移酵素（CDP-Rbo: Rbo5P-1Rbo5P転移酵素）であると考えられた。

[0075] （実施例4）患者モデル細胞でのリビトールリン酸修飾

本実施例では、ISPD、フクチン又はFKRPのいずれかが欠損している細胞におけるリビトールリン酸の修飾について確認した。CRISPR/CAS9のゲノム編集法を用いて、それぞれの遺伝子が欠損したHAP1細胞を作製し、患者モデル細胞とした。欠損変異はDNAシーケンスで確認した。実際の患者とは変異の種類が異なるが、遺伝子機能を欠損しているという点では同義であるので、モデル細胞ということができる。

[0076] 図7上段の各細胞において、それぞれの欠損細胞（CRISPRのレーン）では糖鎖が欠損していることが確認された。また、欠損させた遺伝子をトランスフェクションにより再発現させると糖鎖が回復したことから（Rescueのレーン）、作製した細胞の疾患モデル細胞としての正当性が証明された。これらの細胞に、参考例1と同様にDG^{WT}を発現させて糖鎖を質量分析で解析した。正常型（Normal）の細胞では、左下図で示すように、リビトールリン酸を含む736で示されるピークが検出された（図7）。ISPDやフクチンを欠損している細胞では、糖鎖においてリビトールリン酸の転移が起こらないので、736で示されるピークは検出されなかった。一方、FKRP欠損では、ひとつめのリビトールリン酸は組み込まれるので、736で示される分子の一部分であるリビトール

ルリン酸を1分子含む糖鎖が検出された。これにより、実施例1～3で示す糖鎖構造データや酵素活性データを支持する結果が得られたと考えられる。また、このことは、ISPD、フクチン、FKRPの異常により、生体内リビトールリン酸修飾が十分に行われず、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が発症することが示された。

[0077] (実施例5) CDP-リビトール投与による糖鎖修飾異常の改善

実施例1及び4の結果、ISPD欠損型患者では、細胞内でCDP-リビトールが生合成することができず、生体内リビトールリン酸修飾の異常によってジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が発症することが示された。本実施例では、CRISPR/CAS9のゲノム編集法を用いてHAP1細胞及びHEK細胞についてISPDが欠損している細胞を作製した。HAP1細胞はヒト白血病培養細胞(KBM7)由来であるが半数体細胞株であり、ゲノム編集を高効率に行うことが可能な細胞である。

[0078] 図8のHAP1細胞及びHEK細胞について、本実施例ではWTはISPDが欠損していない正常型細胞を示し、KOはCRISPR/CAS9のゲノム編集法によりISPDがノックアウトされたISPD欠損細胞を示す。ISPD欠損細胞の欠損変異はDNAシーケンスで確認した。それぞれの培養液に終濃度1 mMのCDP-リビトールを添加し、24時間培養した。培養後、細胞抽出液から細胞内在のジストログリカンを調製し、糖鎖修飾状況をウエスタンブロット法で確認した。HAP1細胞ではISPD欠損細胞であっても、細胞外からCDP-リビトールを加えることで正常型細胞と同様の α -DGの糖鎖修飾が生じ、糖鎖の合成が回復したと考えられる。また、HEK細胞ではISPD欠損細胞では細胞導入試薬(lipofectamine™)と同時にCDP-リビトールを投与すれば糖鎖の回復が確認された。つまりISPD欠損型では、CDP-リビトールの補充により糖鎖の合成が回復し、有効な治療法になることが示唆された。

産業上の利用可能性

[0079] 以上詳述したように、CDP-リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤によれば、糖鎖修飾異常が改善

し、その結果疾患の治療及び／又は疾患に伴う症状の改善に効果的に作用する。ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患について、原因遺伝子の作用が確認され、疾患の発症原因が解明されたことで、対象となる疾患について、より効果的な治療方法の開発に貢献しうる。

[0080] フクチンやFKRPに変異がある患者の場合、変異によってフクチンやFKRPの酵素活性がゼロになるわけではなく、少量の活性は残存していると考えられる（活性がゼロになると、生存できず生まれてこない）。フクチンやFKRPの活性が少しでも残存する場合は、フクチンやFKRPの酵素反応の材料となるCDP-リビトールが大量にあれば、残存する酵素活性を利用して、ジストログリカン糖鎖へのリビトールリン酸への転移及び組込みが進むと考えられる。つまり、CDP-リビトール補充療法は、ISPD遺伝子の異常のみならず、フクチン遺伝子の異常やFKRP遺伝子の異常にも効果を発揮することが期待できる。また、ISPD、フクチン、FKRP以外の遺伝子であっても、ジストログリカン糖鎖修飾におけるリビトールリン酸に影響を及ぼす遺伝子であれば、それらの遺伝子の異常によるジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患に対しても、本発明のCDP-リビトールを有効成分として含有する治療剤は有効に作用しうる。

請求の範囲

- [請求項1] CDP-リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤。
- [請求項2] ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が、ISPD、FKRP、fukutin、POMT1、POMT2、DAG1、LARGE、DPM1、DPM2、DPM3、B3GALNT2、GMPPB、TMEM5、POMK、DOLK、POMGNT1、POMGNT2及びB4GAT1から選択されるいずれかの遺伝子が異常であることに伴って発生する疾患である、請求項1に記載の治療剤。
- [請求項3] ジストログリカン糖鎖修飾異常が、ジストログリカン糖鎖におけるリビトールリン酸の異常である、請求項1又は2に記載の治療剤。
- [請求項4] ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が、 α -ジストログリカン異常症である、請求項1～3のいずれかに記載の治療剤。
- [請求項5] α -ジストログリカン異常症が、福山型筋ジストロフィー、Walker-Warburg症候群、筋眼脳病（MEB）、肢帯型筋ジストロフィー2I型、肢帯型筋ジストロフィー2M型及び心筋症から選択されるいずれかである、請求項4に記載の治療剤。
- [請求項6] ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患が、ISPD遺伝子の異常に伴い、ラミニン結合性糖鎖の生合成に異常をきたす疾患である、請求項2に記載の治療剤。
- [請求項7] ジストログリカン糖鎖のリビトールリン酸の異常を検出することを特徴とする、筋ジストロフィーの検査方法。
- [請求項8] 以下の工程を含む、フクチン活性の測定方法：
1) GalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；
2) 反応産物であるリビトールリン酸1分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。
- [請求項9] 以下の工程を含む、フクチン活性の測定方法：
1) リン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供

与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 1 分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

[請求項10] リン酸化CoreM3修飾ペプチドが、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂ (配列番号 2) を有するリン酸化CoreM3修飾ペプチドである、請求項 9 に記載のフクチン活性の測定方法。

[請求項11] 以下の工程を含む、FKRP活性の測定方法：

1) リビトールリン酸を 1 分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAcを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 2 分子を含むGalNAc β 1-3GlcNAcを測定する工程。

[請求項12] 以下の工程を含む、FKRP活性の測定方法：

1) リビトールリン酸を 1 分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを基質とし、CDP-リビトールを糖供与体として含む系に、さらに検体を加えて反応させる工程；

2) 反応産物であるリビトールリン酸 2 分子を含むリン酸化CoreM3修飾ペプチドを測定する工程。

[請求項13] リン酸化CoreM3修飾ペプチドが、Ac-AT(Man)PAPVAAIGPK-NH₂ (配列番号 2) を有するリン酸化CoreM3修飾ペプチドである、請求項 1 2 に記載のFKRP活性の測定方法。

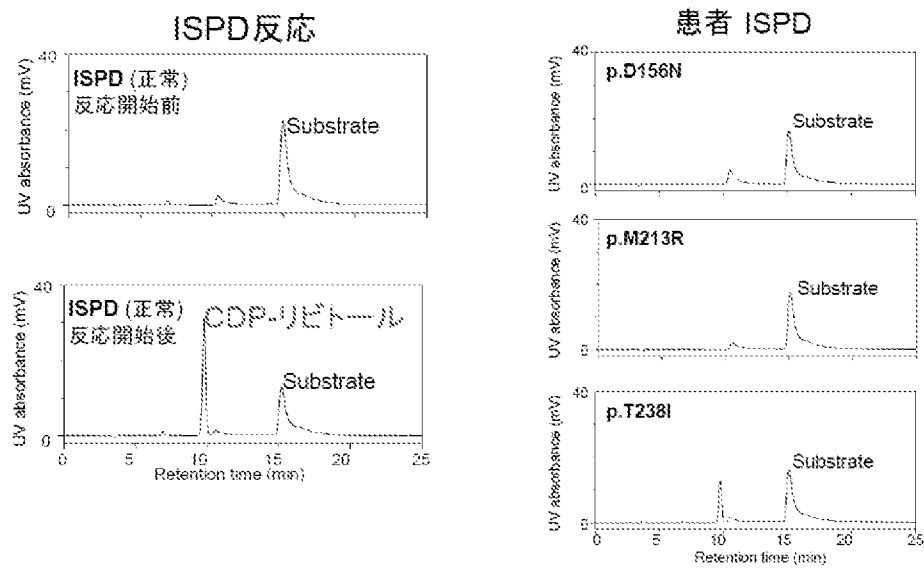
[請求項14] ISPD、フクチン、FKRPのいずれかの遺伝子が欠損又は変異してなる細胞を用いて、CDP-リビトール又は核酸トランスフェクション試薬を混合したものを添加して培養し、その後、細胞を回収し、ジストログリカン糖鎖を解析することを特徴とする、糖鎖異常の改善効果の解析方法。

[請求項15] 分泌型フクチンを含む試薬。

[請求項16] 分泌型FKRPを含む試薬。

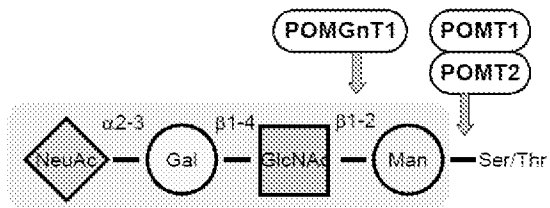
- [請求項17] GalNAc β 1-3GlcNAc β 1を含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むフクチン活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型フクチンを含む試薬を構成として含むフクチン活性測定用キット。
- [請求項18] リン酸化CoreM3修飾ペプチドを含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むフクチン活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型フクチンを含む試薬を構成として含む、フクチン活性測定用キット。
- [請求項19] リビトールリン酸を1分子付加したGalNAc β 1-3GlcNAc β 1を含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むFKRP活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型FKRPを含む試薬を構成として含む、FKRP活性測定用キット。
- [請求項20] リビトールリン酸を1分子付加したリン酸化CoreM3修飾ペプチドを含む試薬及びCDP-リビトールを含む試薬を構成として含むFKRP活性測定用キット、又は前記の構成にさらに分泌型FKRPを含む試薬を構成として含む、FKRP活性測定用キット。

[図3]

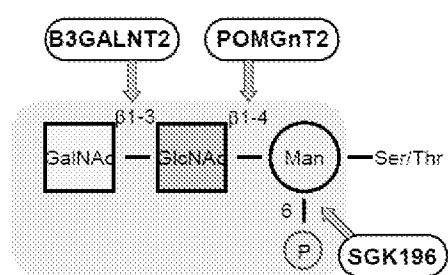


[図4]

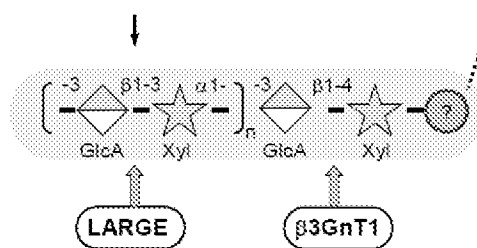
Core M1 (ゴルジ)



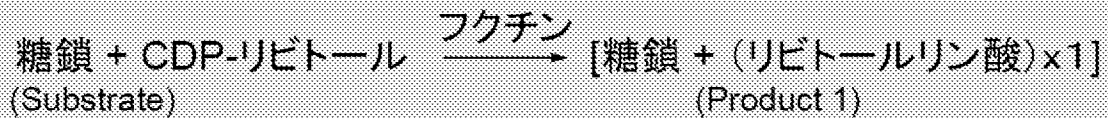
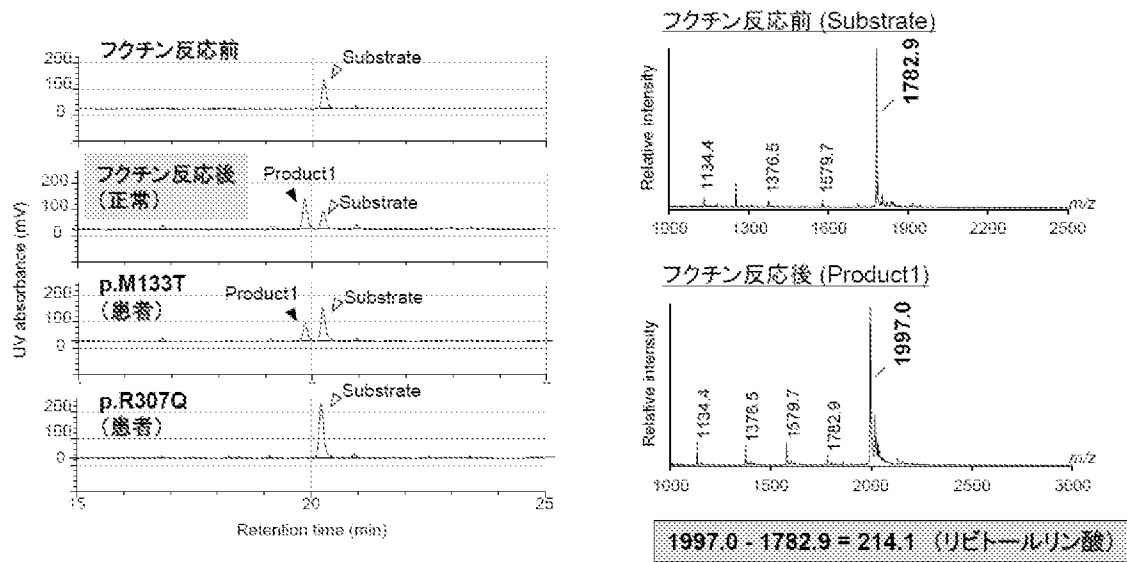
Core M3 (ER)



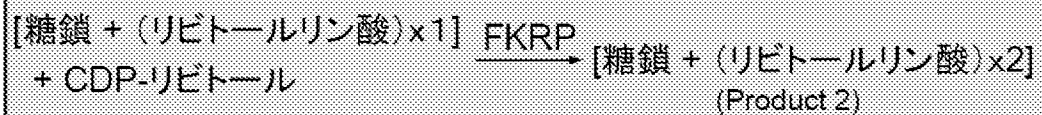
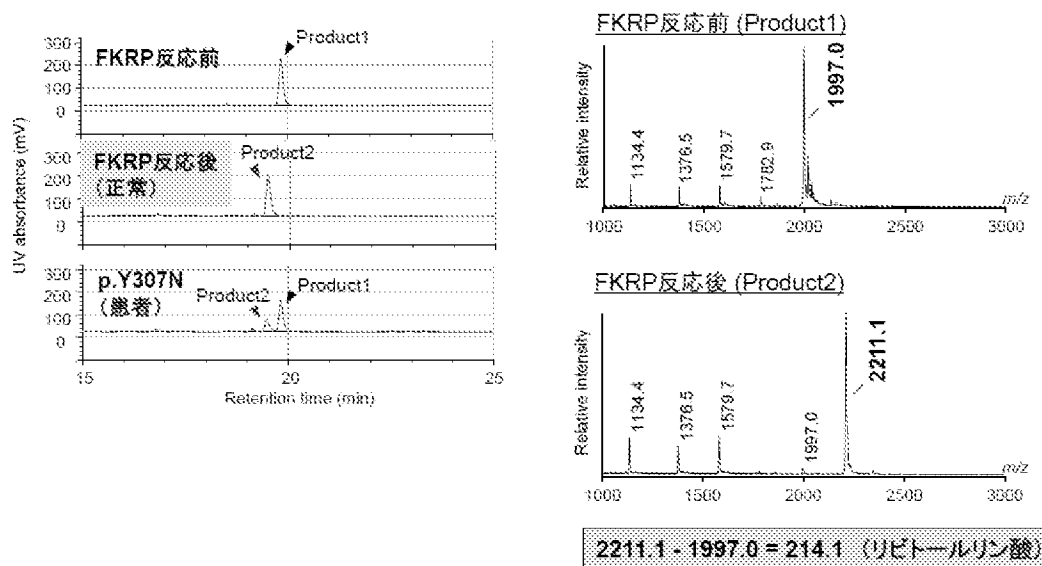
ラミニン結合



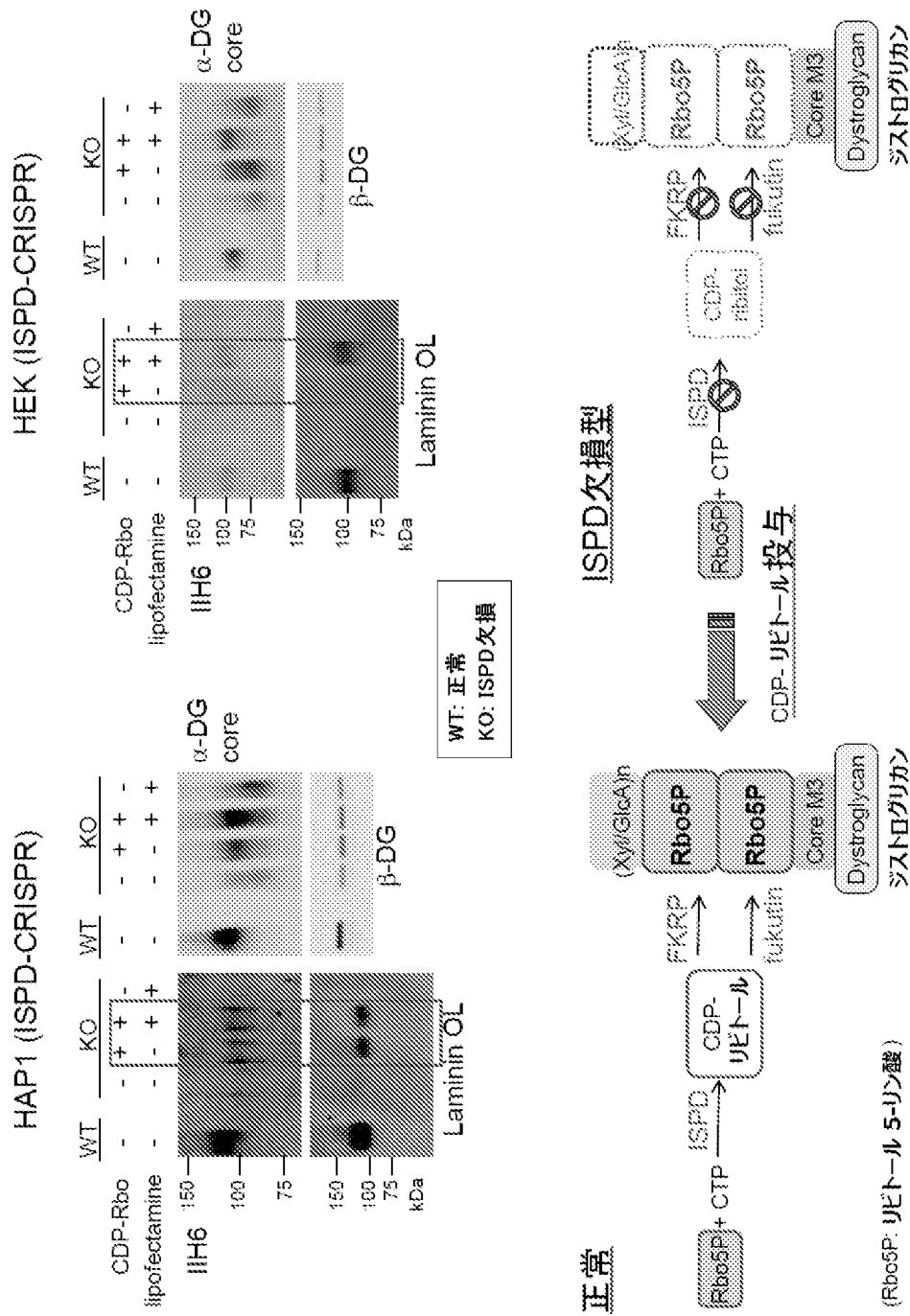
[図5]



[図6]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029600

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7068(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, G01N33/50(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)

A61K31/7068, A61P21/00, A61P43/00, C07K7/08, G01N33/50

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII), Ichushi WEB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	GERIN, Isabelle et al., ISPD produces CDP-ribitol used by FKTN and FKRP to transfer ribitol phosphate onto α -dystroglycan, Nature Communications, 2016.05, Vol.7:11534, p.1-15 Figure 1, 5, page 10, left column, 3rd to 7th paragraphs, page 11, left column, 2nd paragraph	1-6, 14 7, 15, 16 8-13, 17-20
Y	Tatsushi TODA, Fukuyamagata Sentensei Kin Dystrophy, Bessatsu Japanese Journal of Clinical Medicine, Shin Ryoikibetsu Shokogun Series no.32, Medical syndromes of muscular diseases (2nd edition)(first) -Sonohoka no Shinkeikin Shikkan o Fukumete-, 2nd edition, 1st print, 2015.05, pages 135 to 145, page 135, column of 'Introduction', page 138, left column, 1st paragraph, page 143, column of '5.'	7

☒ 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
10 November 2017 (10.11.17)

Date of mailing of the international search report
21 November 2017 (21.11.17)

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/JP2017/029600

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	KUWABARA, Naoyuki et al., Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 2016.08.16, Vol.113, No.33, p.9280-9285, page 9281, left column, 1st paragraph, Fig. 4, page 9283, left column, 1st paragraph	15,16 8-13,17-20
Y A	KOBAYASHI, Kazuhiro et al., An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, Nature, 1998, Vol.394, p.388-392, entire text, particularly, page 391, left column, 1st paragraph	15 17,18
Y A	LU, Pei J. et al., Mutations alter secretion of fukutin-related protein, Biochimica et Biophysica Acta, 2010, Vol.1802, p.253-258, entire text, particularly, page 257, right column, the last paragraph	16 19,20
X	KANAGAWA, Motoi et al., Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy, Cell Reports, 2016.03, Vol.14, No.9, p.2209-2223, entire text	1-20
X	"Kin Dystrophy no Aratana Hassho Gen'in o Hakken Chiryoho Kaihatsu ni Kitai", Kobe University [online], [retrieval date 07 September 2017 (07.09.2017)], 26 February 2016 (26.02.2016), Internet<URL:http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_02_26_01.html>, entire text	1-7
P,X	Kazuhiro KOBAYASHI et al., "Fukuyama muscular dystrophy and related disorders : rebitol-phosphate and antisense oligonucleotide", Journal of Clinical and Experimental Medicine, vol.259, no.1, 2016.10, pages 51 to 57, entire text	1-20
P,X	Tamao ENDO, "Identification of CDP-ribitol and its relation with Fukuyama congenital muscular dystrophy", Bioscience & Industry, vol.74, no.6, 2016.11, pages 513 to 515, entire text	1-20
A	Tamao ENDO, Walker-Warburg Shokogun (WWS), Bessatsu Japanese Journal of Clinical Medicine, Shin Ryoikibetsu Shokogun Series no.32, Medical syndromes of muscular diseases (2nd edition) (first) -sonohoka no Shinkeikin Shikkan o Fukumete-, 2nd edition, 1st print, 2015.05, pages 150 to 153, entire text	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029600

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PRAISSMAN, Jeremy L et al., The functional O-mannose glycan on α -dystroglycan contains a phospho-ribitol primed for matriglycan addition, eLIFE, 2016.04, Vol.5:e14473, p.1-28, entire text	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029600

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029600

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims are classified into seven inventions each of which has a special technical feature indicated below.

(Invention 1) claims 1-6

"A therapeutic agent for a disease caused by modification abnormality in dystroglycan sugar chain, said therapeutic agent comprising CDP-ribitol as an active ingredient"

(Invention 2) claim 7

"A method for detecting muscular dystrophy, said method comprising detecting abnormality in ribitol phosphate"

(Invention 3) claims 8-10 and the first half parts of claims 17 and 18

"A method for measuring fukutin activity and a kit for measuring fukutin activity"

(Invention 4) claims 11-13 and the first half parts of claims 19 and 20

"A method for measuring FKRP activity and a kit for measuring FKRP activity"

(Invention 5) claim 14

"A method for analyzing an effect of improving sugar chain abnormality, said method comprising analyzing dystroglycan sugar chain with the use of CDP-ribitol or a nucleic acid transfection reagent"

(Invention 6) claim 15 and the second half parts of claims 17 and 18

"A reagent comprising a secretory fukutin and a kit for measuring fukutin activity using the same"

(Invention 7) claim 16 and the second half parts of claims 19 and 20

"A reagent comprising secretory FKRP and a kit for measuring FKRP activity using the same"

Claims 1-6 have a special technical feature of "a therapeutic agent for a disease caused by modification abnormality in dystroglycan sugar chain, said therapeutic agent comprising CDP-ribitol as an active ingredient". Thus, claims 1-6 are identified as Invention 1.

Claim 7 has a technical feature of "muscular dystrophy" (corresponding to a specific concept of "a disease caused by modification abnormality in dystroglycan sugar chain") common to claim 1 that is identified as Invention 1.

However, this technical feature corresponds to a well-known disease to the extent needless to cite reference and does not make a contribution over the prior art. Thus, this technical feature cannot be considered as a special technical feature.

Further, claim 7 is not dependent on claim 1.

In addition, claim 7 has no relationship such that said claim 7 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claim 7 cannot be classified into Invention 1.

Claim 7 has a special technical feature of "a method for detecting muscular dystrophy, said method comprising detecting abnormality in ribitol phosphate". Thus, claim 7 is identified as Invention 2.

A technical feature, which is common to claim 1 classified into Invention 1 and claim 7 classified into Invention 2, cannot be found in claims 8-10.

In addition, claims 8-10 are not dependent on claim 1 or 7.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029600

Further, claims 8-10 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1 or 2.

Consequently, claims 8-10 cannot be classified into either Invention 1 or 2.

Claims 8-10 have a special technical feature of "a method for measuring fukutin activity". Thus, claims 8-10 are identified as Invention 3.

A technical feature, which is common to claim 1 classified into Invention 1 and claim 7 classified into Invention 2, cannot be found in claims 11-13.

Although claims 11-13 are similar at a glance to claim 8 that is identified as Invention 3, these claims are different in subjects to be measured from each other. Thus, it cannot be considered that these claims have a common technical feature.

In addition, claims 11-13 are not dependent on claim 1, 7 or 8.

In addition, claims 11-13 have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-3.

Consequently, claims 11-13 cannot be classified into Inventions 1-3.

Claims 11-13 have a special technical feature of "a method for measuring FKRP activity". Thus, claims 11-13 are identified as Invention 4.

Claim 14 has a technical feature of "with the use of CDP-ribitol" common to claim 1 that is identified as Invention 1.

However, this technical feature does not make a contribution over the prior art since CDP-ribitol is well-known (CAS registry number 3506-17-0) and, moreover, in the light of the disclosure in document 1 (in particular, Table 4). Thus, this technical feature cannot be considered as a special technical feature.

Further, a technical feature, which is common to claim 7 classified into Invention 2, claim 8 classified into Invention 3 and claim 11 classified into Invention 4 cannot be found in claim 14.

In addition, claim 14 is not dependent on claim 1, 7, 8 or 11.

In addition, claim 14 has no relationship such that said claim 14 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-4.

Consequently, claim 14 cannot be classified into any one of Inventions 1-4.

Claim 14 has a special technical feature of "a method for analyzing an effect of improving sugar chain abnormality, said method comprising analyzing dystroglycan sugar chain with the use of CDP-ribitol or a nucleic acid transfection reagent". Thus, claim 14 is identified as Invention 5.

A technical feature, which is common to claim 1 classified into Invention 1, claim 7 classified into Invention 2, claim 8 classified into Invention 3, claim 11 classified into Invention 4 and claim 14 classified into Invention 5, cannot be found in claim 15.

Further, claim 15 is not dependent on claim 1, 7, 8, 11 or 14.

In addition, claim 15 has no relationship such that said claim 15 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-5.

Consequently, claim 15 cannot be classified into any one of Inventions 1-5.

Claim 15 has a special technical feature of "a reagent comprising a secretory fukutin". Thus, claim 15 is identified as Invention 6.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/029600

A technical feature, which is common to claim 1 classified into Invention 1, claim 7 classified into Invention 2, claim 8 classified into Invention 3, claim 11 classified into Invention 4 and claim 14 classified into Invention 5, cannot be found in claim 16.

Claim 16 has a technical feature of "a secretory enzyme" common to claim 15 that is identified as Invention 6. However, this technical feature is well-known to the extent needless to cite reference and does not make a contribution over the prior art. Thus, this technical feature cannot be considered as a special technical feature.

Further, claim 15 is not dependent on claim 1, 7, 8, 11, 14 or 15.

In addition, claim 16 has no relationship such that said claim 16 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Inventions 1-6.

Consequently, claim 16 cannot be classified into any one of Inventions 1-6.

Claim 16 has a special technical feature of "a reagent comprising secretory FKRP". Thus, claim 16 is identified as Invention 7.

Claims 17 and 18 (each in the second half part) have a technical feature of "a reagent comprising a secretory fukutin" common to claim 15 that is identified as Invention 6.

In addition, it is considered that the first half parts of claims 17 and 18 have a relationship such that these parts are substantially same as or equivalent to claims 8-10 classified into Invention 3.

Consequently, the first half parts of claims 17 and 18 are classified into Invention 3, and the second half parts thereof are classified into Invention 6.

Claims 19 and 20 (each in the second half part) have a technical feature of "a reagent comprising secretory FKRP" common to claim 16 that is identified as Invention 7.

In addition, it is considered that the first half parts of claims 19 and 20 have a relationship such that these parts are substantially same as or equivalent to claims 11-13 classified into Invention 4.

Consequently, the first half parts of claims 19 and 20 are classified into Invention 4, and the second half parts thereof are classified into Invention 7.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/7068(2006.01)i, A61P21/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07K7/08(2006.01)i, G01N33/50(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. A61K31/7068, A61P21/00, A61P43/00, C07K7/08, G01N33/50

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), 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 Y A	GERIN, Isabelle et al., ISPD produces CDP-ribitol used by FKTN and FKRP to transfer ribitol phosphate onto α -dystroglycan, Nature Communications, 2016.05, Vol.7:11534, p.1-15 Figure 1、5、第10頁左欄第3-7段落、第11頁左欄第2段落	1-6, 14 7, 15, 16 8-13, 17-20

☑ 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

10.11.2017

国際調査報告の発送日

21.11.2017

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 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)

砂原 一公

4 C

4 7 6 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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	戸田達史, 福山型先天性筋ジストロフィー, 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 32 骨格筋症候群 (第2版) (上) - その他の神経筋疾患を含めて -, 第2版第1刷, 2015.05, p.135-145 第135頁「はじめに」欄、第138頁左欄第1段落、第143頁「5.」欄	7
Y A	KUWABARA, Naoyuki et al., Carbohydrate-binding domain of the POMGnT1 stem region modulates O-mannosylation sites of α -dystroglycan, Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, 2016.08.16, Vol.113, No.33, p.9280-9285 第9281頁左欄第1段落、Fig. 4、第9283頁左欄第1段落	15, 16 8-13, 17-20
Y A	KOBAYASHI, Kazuhiro et al., An ancient retrotransposon insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, Nature, 1998, Vol.394, p.388-392 全文、特に、第391頁左欄第1段落	15 17, 18
Y A	LU, Pei J. et al., Mutations alter secretion of fukutin-related protein, Biochimica et Biophysica Acta, 2010, Vol.1802, p.253-258 全文、特に、第257頁右欄最終段落	16 19, 20
X	KANAGAWA, Motoi et al., Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy, Cell Reports, 2016.03, Vol.14, No.9, p.2209-2223 全文	1-20
X	筋ジストロフィーの新たな発症原因を発見 治療法開発に期待, 神戸大学 [オンライン], [検索日 2017.09.07], 2016.02.26, インターネット<URL : http://www.kobe-u.ac.jp/NEWS/research/2016_02_26_01.html > 全文	1-7
P, X	小林千浩ほか, 福山型筋ジストロフィーと類縁疾患: リビトールリン酸とアンチセンス核酸, 医学のあゆみ, Vol.259, No.1, 2016.10, p.51-57 全文	1-20

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
P, X	遠藤玉夫, CDP-リビトールと福山型先天性筋ジストロフィー症との関連, バイオサイエンスとインダストリー, Vo. 74, No. 6, 2016. 11, p. 513-515 全文	1-20
A	遠藤玉夫, Walker-Warburg 症候群 (WWS), 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 32 骨格筋症候群 (第2版) (上) - その他の神経筋疾患を含めて -, 第2版第1刷, 2015. 05, p. 150-153 全文	1-20
A	PRAISSMAN, Jeremy L et al., The functional O-mannose glycan on α -dystroglycan contains a phospho-ribitol primed for matriglycan addition, eLIFE, 2016. 04, Vol. 5: e14473, p. 1-28 全文	1-20

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

< 第Ⅲ欄の続き >

請求の範囲は、各々下記の特別な技術的特徴を有する 7 の発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1－6

「CDP－リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤」

(発明 2) 請求項 7

「リビトールリン酸の異常を検出する、筋ジストロフィーの検出方法」

(発明 3) 請求項 8－10、並びに 17 及び 18 のうち前半部分

「フクチン活性の測定方法及びフクチン活性測定用キット」

(発明 4) 請求項 11－13、並びに 19 及び 20 のうち前半部分

「FKRP 活性の測定方法及び FKRP 活性測定用キット」

(発明 5) 請求項 14

「CDP－リビトール又は核酸トランスフェクション試薬を用いて、ジストログリカン糖鎖を解析して、糖鎖異常の改善効果を解析する方法」

(発明 6) 請求項 15、並びに 17 及び 18 のうち後半部分

「分泌型フクチンを含む試薬、及びこれを用いたフクチン活性測定用キット」

(発明 7) 請求項 16、並びに 19 及び 20 のうち後半部分

「分泌型 FKRP を含む試薬、及びこれを用いた FKRP 活性測定用キット」

請求項 1－6 は、「CDP－リビトールを有効成分として含有する、ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患の治療剤」という特別な技術的事項を有しているので、発明 1 に区分する。

請求項 7 は、発明 1 に区分された請求項 1 と、「筋ジストロフィー」という共通の技術的特徴（「ジストログリカン糖鎖修飾異常に伴う疾患」の下位概念に相当する。）を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献を示すまでもなく公知の疾患であり、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

さらに、請求項 7 は請求項 1 の従属請求項ではない。また、請求項 7 は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項 7 は発明 1 に区分できない。

そして、請求項 7 は、「リビトールリン酸の異常を検出する、筋ジストロフィーの検出方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。

請求項 8－10 は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 7 と、共通の技術的特徴を見出すことができない。

さらに、請求項 8－10 は請求項 1 又は 7 の従属請求項でもない。また、請求項 8－10 は、発明 1 又は 2 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項 8－10 は発明 1 及び 2 のいずれにも区分できない。

そして、請求項 8－10 は、「フクチン活性の測定方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 3 に区分する。

(続葉に続く。)

請求項 1 1－1 3 は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 7 と、共通の技術的特徴を見出すことができない。また、請求項 1 1－1 3 は、発明 3 に区分された請求項 8 と、一見類似しているが、測定している対象物が異なるため、共通の技術的特徴を有しているとはいえない。

さらに、請求項 1 1－1 3 は請求項 1、7 又は 8 の従属請求項ではない。また、請求項 1 1－1 3 は、発明 1－3 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項 1 1－1 3 は発明 1－3 に区分できない。

そして、請求項 1 1－1 3 は、「FKRP 活性の測定方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 4 に区分する。

請求項 1 4 は、発明 1 に区分された請求項 1 と、「CDP－リビトールを用いる」という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、CDP－リビトールが公知であるうえ（CAS 登録番号 3506－17－0）、文献 1 の開示内容（特に、Table 4）に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、発明 2 に区分された請求項 7、発明 3 に区分された請求項 8、及び発明 4 に区分された請求項 1 1 と、共通の技術的特徴を見出すことができない。

さらに、請求項 1 4 は請求項 1、7、8 又は 1 1 の従属請求項でもない。また、請求項 1 4 は、発明 1－4 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項 1 4 は発明 1－4 のいずれにも区分できない。

そして、請求項 1 4 は、「CDP－リビトール又は核酸トランスフェクション試薬を用いて、ジストログリカン糖鎖を解析して、糖鎖異常の改善効果を解析する方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 5 に区分する。

請求項 1 5 は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 7、発明 3 に区分された請求項 8、発明 4 に区分された請求項 1 1、及び発明 5 に区分された請求項 1 4 と、共通の技術的特徴を見出すことができない。

さらに、請求項 1 5 は請求項 1、7、8、1 1 又は 1 4 の従属請求項でもない。また、請求項 1 5 は、発明 1－5 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項 1 5 は発明 1－5 のいずれにも区分できない。

そして、請求項 1 5 は、「分泌型フクチンを含む試薬」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 6 に区分する。

（続葉に続く。）

請求項 16 は、発明 1 に区分された請求項 1 及び発明 2 に区分された請求項 7、発明 3 に区分された請求項 8、発明 4 に区分された請求項 11、及び発明 5 に区分された請求項 14 と、共通の技術的特徴を見出すことができない。また、発明 6 に区分された請求項 15 と「分泌型酵素」という共通の技術的特徴を有しているが、当該技術的特徴は、文献を示すまでもなく公知であり、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。

さらに、請求項 15 は請求項 1、7、8、11、14 又は 15 の従属請求項でもない。また、請求項 16 は、発明 1－6 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にない。

したがって、請求項 16 は発明 1－6 のいずれにも区分できない。

そして、請求項 16 は、「分泌型 F K R P を含む試薬」という特別な技術的特徴を有しているので、発明 7 に区分する。

請求項 17 及び 18 は、それぞれその後半部分において、発明 6 に区分された請求項 15 と「分泌型フクチンを含む試薬」という共通の技術的特徴を有する。

また、請求項 17 及び 18 の前半部分は、発明 3 に区分された請求項 8－10 と実質同一又はそれに準ずる関係にあると認められる。

したがって、請求項 17 及び 18 の前半部分は、発明 3 に区分し、後半部分は発明 6 に区分する。

請求項 19 及び 20 は、それぞれその後半部分において、発明 7 に区分された請求項 16 と「分泌型 F K R P を含む試薬」という共通の技術的特徴を有する。

また、請求項 19 及び 20 の前半部分は、発明 4 に区分された請求項 11－13 と実質同一又はそれに準ずる関係にあると認められる。

したがって、請求項 19 及び 20 の前半部分は、発明 4 に区分し、後半部分は発明 7 に区分する。