

(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
2022年7月7日(07.07.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/145144 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/706 (2006.01) C12N 5/078 (2010.01)
A61P 7/06 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/042347

(22) 国際出願日: 2021年11月11日(11.11.2021)

(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 2020-218557 2020年12月28日(28.12.2020) 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番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 吉田 善紀 (YOSHIDA, Yoshinori); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 森本 有紀 (MORIMOTO, Yuki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 蝶名林 和久

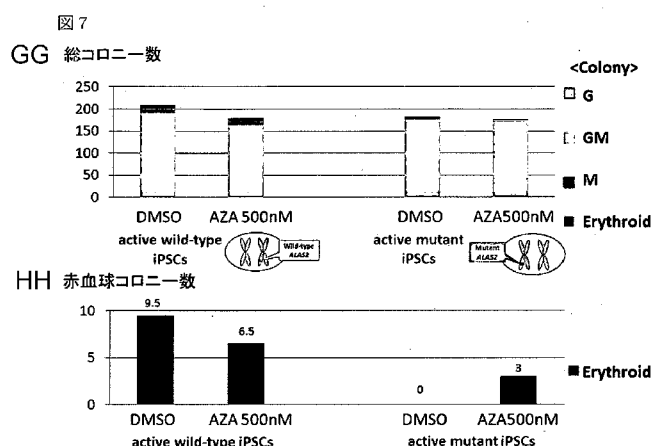
(CHONABAYASHI, Kazuhisa); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 高折 晃史 (TAKAORI, Akifumi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 川端 浩 (KAWABATA, Hiroshi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 梅田阪急ビルオフィスタワー 青山特許事務所 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, IT, 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,

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR X-LINKED SIDEROBLASTIC ANEMIA

(54) 発明の名称: X連鎖性鉄芽球性貧血の治療剤



(57) Abstract: The present invention provides: a pharmaceutical composition for treating X-linked sideroblastic anemia, the composition comprising a demethylating agent, in particular, 5 - azacitidine or a derivative thereof; and normal erythroid cells that are differentiated and induced from iPS cells derived from a patient with X-linked sideroblastic anemia in the presence of a demethylating agent.

(57) 要約: 本発明は、脱メチル化剤、特に5-アザシチジンまたはその誘導体を含む、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬組成物、ならびにX連鎖性鉄芽球性貧血患者由来のiPS細胞から脱メチル化剤の存在下で分化誘導された正常な赤血球を提供する。

[続葉有]

QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： X連鎖性鉄芽球性貧血の治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療剤に関する。

本願は、2020年12月28日に出願された日本国特許出願第2020-218557号に対して優先権を主張するものであり、当該日本国特許出願の内容を本願に一体化させる。

背景技術

[0002] X連鎖性鉄芽球性貧血は、ヘム合成の最初の段階を触媒する酵素ALAS2（赤血球型5-アミノレブリン酸合成酵素）の遺伝子の変異することにより高度の赤血球分化障害を来す遺伝性疾患である。X連鎖性鉄芽球性貧血患者の約半数にはビタミンB6投与が有効であるが、ビタミンB6投与が無効である約半数の患者には輸血や造血幹細胞移植以外に有効な治療法はなく（非特許文献1、2）、代替となる治療法の開発が期待されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Gonzalez MI, Caballero D, Vazquez L, et al. Allogeneic peripheral stem cell transplantation in a case of hereditary sideroblastic anemia. Br J Haematol. 2000;109:658-660.

非特許文献2：Medeiros BC, Kolhouse JF, Cagnoni PJ, et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for congenital sideroblastic anemia. Bone Marrow Transplant. 2003;31:1053-1055.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] X連鎖性鉄芽球性貧血、とりわけビタミンB6投与が無効である患者に対する有効な治療を提供することが必要である。

課題を解決するための手段

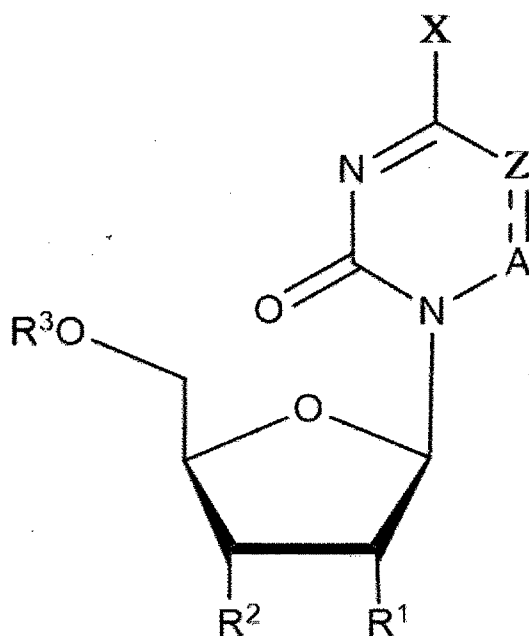
[0005] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねてきた。本発明者らは、 δ -アミノレブリン酸を用いることにより、変異型ALAS2が活性化されているiPS細胞由来の赤芽球の赤血球分化能を改善できることを見いだしたが、必要とされる δ -アミノレブリン酸の量が多いという問題があった。そこで本発明者らは、より少量で効果的な薬剤について検索し、脱メチル化剤、とりわけ5-アザシチジンおよびその誘導体が少量で上記の赤血球分化を改善できることを見だし、本発明を完成させるに至った。本明細書の以下の部分において、5-アザシチジンをAZAと略称する。

[0006] すなわち本発明は以下のものを提供する：

(1) 脱メチル化剤を含む、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬組成物。

(2) 脱メチル化剤が式(1)：

[化1]



(1)

[式中、R¹およびR²はそれぞれ独立して水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルケニル、C₁₋₆アルキニル、ハロゲン、OH、OC₁₋₆アルキル、OC₁₋₆ア

ルケニル、 OC_{1-6} アルキニル、 COC_{1-6} アルキル、 COC_{1-6} アルケニル、または COC_{1-6} アルキニルであり、 R^3 は水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、 COC_{1-6} アルキル、 COC_{1-6} アルケニル、 COC_{1-6} アルキニル、またはリン酸基であり、 A は CR^4 または CR^5R^6 であり、 R^4 は水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、 OH 、またはハロゲンであり、 R^5 および R^6 はそれぞれ独立して水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、 OH 、またはハロゲンであり、 Z は N 、 NR^7 、 CR^8 、または CR^9R^{10} であり、 R^7 は水素、 OH 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、またはハロゲンであり、 R^8 は水素、 OH 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、またはハロゲンであり、 R^9 および R^{10} はそれぞれ独立して水素、 OH 、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、またはハロゲンであり、 X は水素または $\text{NR}^{11}\text{R}^{12}$ であり、 R^{11} および R^{12} はそれぞれ独立して水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、または C_{1-6} アルキニルであり、上記アルキル、アルケニルおよびアルキニルは1個以上の水酸基またはハロゲンで置換されていてもよく、 — は一重結合または二重結合を表す。]で示される化合物である、(1)記載の医薬組成物。

(3) 脱メチル化剤が AZA または5-アザ-2'-デオキシシチジンである、(2)記載の医薬組成物。

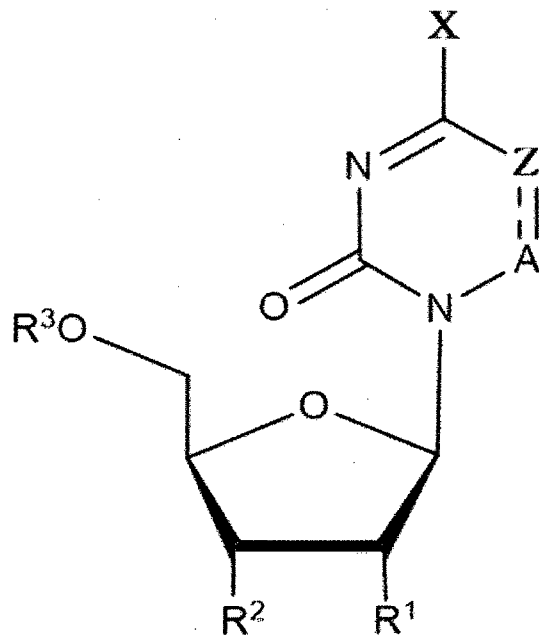
(4) 脱メチル化剤が AZA である、(3)記載の医薬組成物。

(5) ビタミン B_6 投与が無効である X 連鎖性鉄芽球性貧血患者に使用される(1)～(4)のいずれか記載の医薬組成物。

(6) X 連鎖性鉄芽球性貧血患者由来の iPS 細胞から正常な赤血球を製造する方法であって、該 iPS 細胞を赤血球に分化誘導することを含み、分化誘導の際に脱メチル化剤を細胞に添加するものである方法。

(7) 脱メチル化剤が式(1)：

[化2]



(1)

[式中、 R^1 — R^{12} 、A、Z、X、および—は(2)における定義と同じ。
]で示される化合物である、(6)記載の方法。

(8) 脱メチル化剤がAZAまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンである、(7)記載の方法。

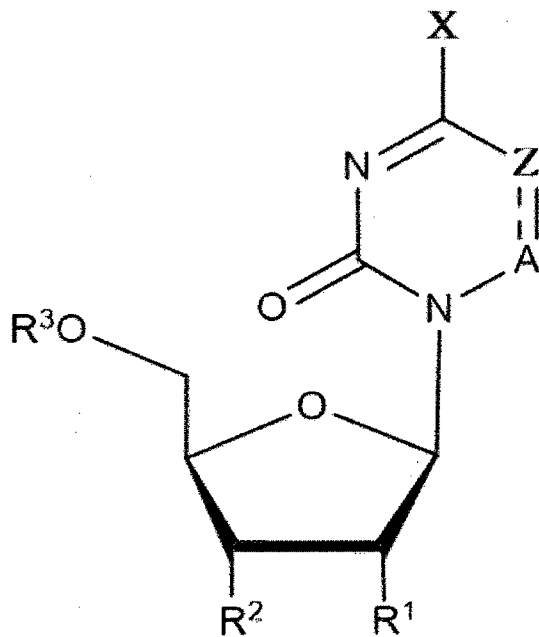
(9) 脱メチル化剤がAZAである、(8)記載の方法。

(10) 患者が、ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者である、(6)～(9)のいずれか記載の方法。

(11) X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための脱メチル化剤の使用。

(12) 脱メチル化剤が式(1)：

[化3]



(1)

[式中、 R^1 、 R^2 、A、Z、X、および—は(2)における定義と同じ。
]で示される化合物である、(11)記載の使用。

(13) 脱メチル化剤がAZAまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンである、(12)記載の使用。

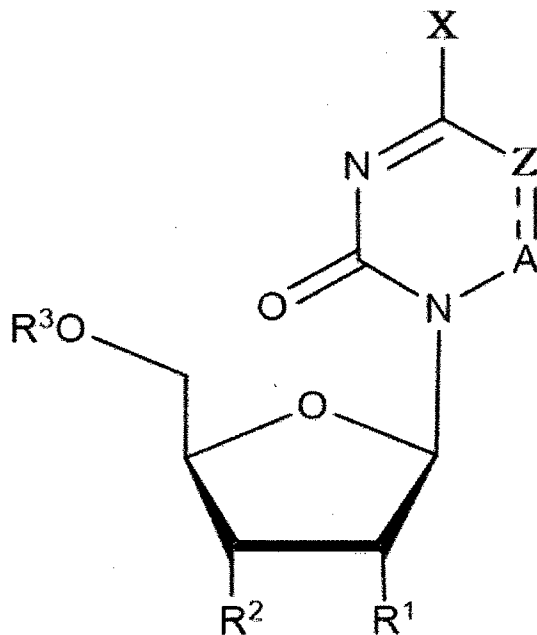
(14) 脱メチル化剤がAZAである、(13)記載の使用。

(15) 治療すべき患者が、ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者である、(11)～(14)のいずれか記載の使用。

(16) X連鎖性鉄芽球性貧血の治療において使用するための脱メチル化剤。

(17) 式(1)：

[化4]



(1)

[式中、 R^1 — R^{12} 、A、Z、X、および—は(2)における定義と同じ。
]で示される化合物である、(16)記載の脱メチル化剤。

(18) AZAまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンである、(17)
)記載の脱メチル化剤。

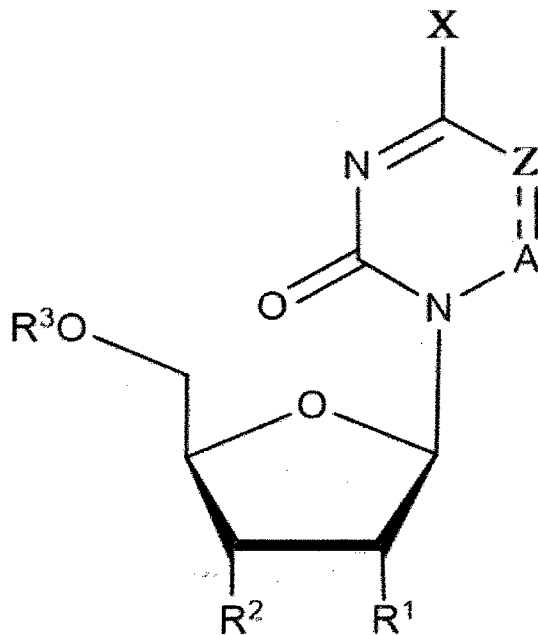
(19) AZAである、(18)記載の脱メチル化剤。

(20) 治療すべき患者が、ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽
球性貧血患者である、(16)～(19)のいずれか記載の脱メチル化剤。

(21) X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬の製造における脱メ
チル化剤の使用。

(22) 脱メチル化剤が式(1)：

[化5]



(1)

[式中、 R^1 — R^{12} 、A、Z、X、および—は(2)における定義と同じ。
]で示される化合物である、(21)記載の使用。

(23) 脱メチル化剤がAZAまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンである、(22)記載の使用。

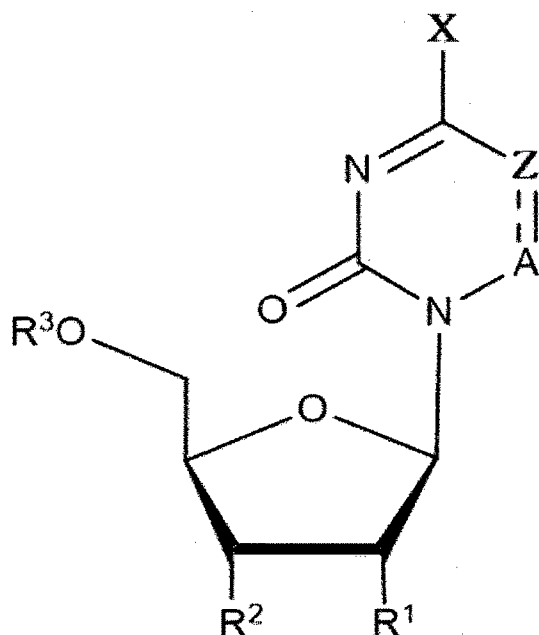
(24) 脱メチル化剤がAZAである、(23)記載の使用。

(25) 治療すべき患者が、ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者である、(21)～(24)のいずれか記載の使用。

(26) X連鎖性鉄芽球性貧血の治療を要する患者に脱メチル化剤を投与することを含む、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療方法。

(27) 脱メチル化剤が式(1)：

[化6]



(1)

[式中、 R^1 — R^{12} 、A、Z、X、および—は(2)における定義と同じ。
]で示される化合物である、(26)記載の方法。

(28) 脱メチル化剤がAZAまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンである、(27)記載の方法。

(29) 脱メチル化剤がAZAである、(28)記載の方法。

(30) 患者が、ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者である、(26)～(29)のいずれか記載の方法。

(31) (6)～(10)のいずれか記載の方法によって得られた正常な赤血球を含む、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬組成物。

(32) (6)～(10)のいずれか記載の方法によって得られた正常な赤血球の、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための使用。

(33) X連鎖性鉄芽球性貧血の治療において使用するための、(6)～(10)のいずれか記載の方法によって得られた正常な赤血球。

(34) (6)～(10)のいずれか記載の方法によって得られた正常な

赤血球の、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬の製造における使用。

(35) (6) ~ (10) のいずれか記載の方法によって得られた正常な赤血球を、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療を要する患者に投与することを含む、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、X連鎖性鉄芽球性貧血、とりわけビタミンB6投与が無効である患者、より好ましくは女性患者に対する有効な治療が提供される。特に、本発明の治療剤の有効成分の1つであるAZAは現在骨髓異形成症候群の治療薬として用いられており、ヒトでの安全性や薬物動態の試験が済んでいるため、使用上の不安が少ない。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1Aは、WT1-iPSC2 (図中、「WT iPSC」と示される) およびMT1-iPSC3 (図中、「MT iPSC」と示される) 由来の赤芽球 (34日目) のペレットおよび鉄染色像を示す。矢印は環状鉄芽球を示す。スケールバーは10 μ mである。図1Bは、WT1-iPSC2 (図中、「WT iPSC」と示される) 由来の赤芽球 (34日目) (上) およびMT1-iPSC4 (図中、「MT iPSC」と示される) 由来の赤芽球 (34日目) (下) のMay Grunwald-Giemsa染色像を示す。スケールバーは25 μ mである。図1Cは、3種類のWT-iPSC株および4種類のMT-iPSC株に由来する多染性巨核球 (Poly-M)、多染性赤芽球 (Poly-E) および正染性赤芽球 (Ortho-E) の割合を示すグラフである。図1Dは、WT1-iPSC3 (図中、「WT iPSC」と示される) 由来の赤芽球 (34日目) およびMT1-iPSC3 (図中、「MT iPSC」と示される) 由来の赤芽球 (34日目) のオー吉安シジン染色ペレット (上) およびオー吉安シジン染色像 (下) である。スケールバーは200 μ mである。

[図2]図2Aは、異なる患者由来のWT-iPSCおよびMT-iPSCから

得られたCD43+細胞の割合を示すグラフである。図2Bは、異なる患者由来のWT-iPSCおよびMT-iPSCから得られたCD235a+細胞の割合を示すグラフである。上記データは、平均±標本平均の標準誤差（SEM）として表される。P値は、対応のない両側スチューデントのt検定を使用して計算した。**** $P < 0.0001$; N. S. 有意差なし。図2Cは、SA3由来の2種類のWT-iPSC株（WT3-iPSC1、WT3-iPSC2）および2種類のMT-iPSC株（MT3-iPSC1およびMT3-iPSC2）に由来するCD235a+細胞の割合を示すグラフである。図2Dは、フィーダー細胞を用いない方法で分化した赤芽球中のCD235およびCD71の同時発現を示すフローサイトメトリーである。

[図3A]図3Aは、iPSCから赤血球分化のプロトコールおよび各サンプル収集時点を示すスキームである。

[図3B]図3Bは、試料間距離を示すヒートマップおよびiPSCのヒエラルキークラスタリングである。

[図3C]図3Cは、3種類のWT-iPSC株および4種類のMT-iPSC株に由来する赤芽球、健康なドナーおよびSA3由来の骨髄赤芽球のPCAの結果である。

[図3D]図3Dは、WT赤芽球（左）およびMT赤芽球（右）に関して濃縮された分子機能タームを示すGO分析の結果である。

[図3E]図3Eは、WT赤芽球で濃縮されたヘム代謝データセットのGSEAの結果を示す。

[図3F]図3Fは、図3Cに関して説明した赤芽球の正染性段階で特徴的に発現される13個の遺伝子のヒートマップである。

[図4]図4Aは、赤血球分化におけるAZA投与のスキームである。図4Bは、DMSOまたはAZAで処理されたCD235a+赤芽球の割合を示す。データは平均±SEMとして表される。P値は、一元配置分散分析とテューキーの検定（Tukey's correction）、および対応のない

両側スチューデントのt検定を使用して計算した。* * $P < 0.01$; N.S. 有意差なし。図4Cは、DMSOまたはAZAを投与して、フィーダー細胞を用いずに分化させたMT1-iPSC2由来の赤芽球のフローサイトメトリーの代表的なデータである。図4Dの上パネルは、DMSOまたはAZAで処理した場合のMT1-iPSC2に由来する赤芽球のオージアニシジン染色されなかったペレット（左）および染色されたペレット（右）を示す。図4Dの中および下パネルは、DMSOまたはAZAで処理されたWT1-iPSC1（左）およびMT1-iPSC2（右）に由来する赤芽球のオージアニシジン染色像である。

[図5]図5は、サンガーシーケンスによるALAS2変異部位の解析結果を示す図である。DMSOはDMSO投与群、AZAはAZA 500 nM投与群を示す。

[図6]図6の右パネルは、変異型ALAS2が活性化されているiPS細胞由来の赤芽球の赤血球分化能を改善するAZAの効果を示すグラフである。図6の左パネルは、変異型ALAS2が活性化されているiPS細胞由来の赤芽球について同様の実験を行った結果を示す。グラフ縦軸はCD235a陽性細胞の割合（%）である。

[図7]図7は、変異型ALAS2が活性化されているiPS細胞由来の赤芽球から赤血球コロニー数を増加させるAZAの効果を示すグラフである。上パネルは、総コロニーに対する各細胞周期にある細胞および赤血球のコロニーの割合を示す。赤血球コロニーの割合は、各バーの最上層の濃色部分で示される。下パネルは、各実験系における赤血球コロニー数を示す。

[図8]図8Aは、DMSOまたはAZAで処理されたWT1-iPSC1およびMT1-iPSC2に由来する造血前駆細胞の分化15日目のコロニー形成アッセイの結果を示す。図8Bは、図8Aにおける赤血球および混合コロニーの数を示す。上記データは平均±SEMとして表される。P値は、一元配置分散分析とテューキーの検定（Tukey's correction）、および対応のない両側スチューデントのt検定を使用して計算した。*

$P < 0.05$; N. S. 有意差なし。図8Cは、AZA処理されたMT1-iPSC2に由来する混合コロニーの代表的な像である。スケールバーは $200\mu\text{m}$ である。

[図9]図9は、DMSOまたはAZAで処理されたWT1-iPSC1およびWT1-iPSC3に由来する造血前駆細胞の分化15日目のコロニー形成アッセイの結果（左）ならびにDMSOまたはAZAで処理されたMT1-iPSC1およびMT1-iPSC2に由来する造血前駆細胞の分化15日目のコロニー形成アッセイの結果（右）を示す。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明は、1の態様において、脱メチル化剤を含む、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬組成物を提供する。

[0010] 本発明において、脱メチル化剤は、DNAのメチル化を阻害する薬剤をいう。

[0011] 本発明において、好ましい脱メチル化剤はAZA誘導体である。具体的には、AZA誘導体は式(1)で示される化合物である。なお、式(1)の化合物は、その構造異性体および立体異性体を包含しうる。

[0012] 式(1)で示される化合物のうち、 R^1 、 R^2 の両方がOHである化合物、あるいは R^1 、 R^2 の一方が水素であり他方がOHである化合物が好ましい。式(1)で示される化合物のうち、 R^3 が水素である化合物が好ましい。式(1)で示される化合物のうち、AがCHまたは CH_2 であり、ZがN、NH、CH、またはC-ハロゲンであり、Xが水素または NH_2 である化合物が好ましい。

[0013] 式(1)における C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニルおよび C_{1-6} アルキニルは、それぞれ炭素数1～6個のアルキル、アルケニルおよびアルキニルを意味する。 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニルおよび C_{1-6} アルキニルは構造異性体を包含する。式(1)における C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニルおよび C_{1-6} アルキニルは未置換であってもよく、あるいは1個以上の水酸基またはハロゲンで置換されていてもよい。ハロゲンはF、Cl、Br、またはI

であり、好ましくはFまたはC Iである。

[0014] 式(1)で示される化合物の例としては、AZA、5-アザ-2'-デオキシシチジン、ファザラビン、デシタビン、5-フルオロ-2'-デオキシシチジン、5,6-ジヒドロ-5-アザシチジン(DHAC)、ゼブラリンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0015] 本発明において好ましい化合物の例としては、AZAおよび5-アザ-2'-デオキシシチジンが挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、より好ましい化合物はAZAである。

[0016] 本明細書において、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療とは、患者における当該疾病に起因する動悸、めまい、疲れやすいなどの貧血関連症状を緩和、軽減、改善または消失させること、および貧血によって生じる心不全、肝障害などを予防することをいう。本明細書において、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療には、X連鎖性鉄芽球性貧血の予防が包含される。

[0017] 本発明の医薬組成物の治療効果は、脱メチル化剤によりALAS2遺伝子の変異に対応している部位のメチル化が外れ、変異型配列に加えて野生型配列が発現することにより発揮される。例えば、ALAS2のcDNAにおいて、R227C変異(ALAS2タンパク質のN末端から227番目のアルギニンがシステインに置換されている)に対応する部位のメチル化が外れ、679番目の塩基の一部でC(変異型)に加えてT(野生型)が発現することにより、本発明の医薬組成物の治療効果が発揮される。特に、ビタミンB6が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者のALAS2遺伝子変異の一つであるR227C変異で有効性が示されたため、本発明の医薬組成物はR227C変異を含め全てのビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者、好ましくは女性患者の治療に有効であると考えられる。

[0018] ビタミンB6投与が無効であるとは、ビタミンB6が全く奏功しない場合、ならびに部分的に奏功するが治療には不十分である場合を包含する。

[0019] 本発明の医薬組成物の奏功を確認するために公知の方法を用いることができる。例えば、患者の問診、および/または赤血球数、MCV、MCH、M

CHCの値、赤血球の形態観察（顕微鏡観察）、赤血球の色調観察、骨髓の形態観察、X染色体不活性化の偏りの確認、赤血球のcDNAによる変異型・野生型ALAS2の発現割合などにより、奏功を確認してもよい。

[0020] 本発明の医薬組成物は、通常、医薬上許容される担体または賦形剤を含む。

[0021] 本発明の医薬組成物の投与経路はいずれの経路であってもよい。好ましくは、本発明の医薬組成物は皮下注射、静脈注射、静脈点滴、または経口投与される。

[0022] 本発明の医薬組成物は、投与経路に応じて公知の方法にて製造することができる。注射剤または点滴剤である本発明の医薬組成物を、注射用水、生理食塩水、ブドウ糖溶液、リンゲル液などの公知の担体に有効成分（例えばAZA）を混合、溶解することにより製造してもよい。経口投与剤である本発明の医薬組成物を、公知の固体、半固体または液体担体と混合することにより製造してもよい。経口投与剤である本発明の医薬組成物の剤形の例としては、錠剤、カプセル剤、粉末、顆粒、錠剤、ゲル、シロップ、ドリンク等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の医薬組成物は、例えばpH調節用の緩衝成分、香料、甘味料等を適宜含んでもよい。

[0023] 本発明の医薬組成物によるAZA等の化合物の投与量は、投与化合物の種類、患者の症状の重さ、年齢、体重、健康状態、既往症、現在受けている治療等を考慮して、医師が決定しうる。例えば、約50～約100mg/m²（体表面積）のAZAを1日1回皮下注射または点滴静注してもよい。

[0024] 本発明の医薬組成物は、脱メチル化剤以外の貧血治療成分、例えば鉄剤を含んでもよい。また、本発明の医薬組成物を、他の貧血治療、例えば鉄剤投与療法と併用してもよい。

[0025] 本発明は、もう1つの態様において、X連鎖性鉄芽球性貧血患者由来のiPS細胞から正常な赤血球を製造する方法であって、該iPS細胞を赤血球に分化誘導することを含み、分化誘導の際に脱メチル化剤を細胞に添加するものである方法を提供する。

[0026] i P S細胞は、体細胞に核初期化因子を導入することにより得ることができる。i P S細胞の作製方法は公知であり、いずれの方法を用いてもよい。核初期化因子は、基本的にはO c tファミリー遺伝子または当該遺伝子産物、K l fファミリー遺伝子または当該遺伝子産物、S o xファミリー遺伝子または当該遺伝子産物、およびM y cファミリー遺伝子または当該遺伝子産物を含む。これらの因子に加えて、L i n 2 8遺伝子または当該遺伝子産物、n a n o g遺伝子または当該遺伝子産物など体細胞に導入して、i P S細胞の誘導効率を高めてもよい。核初期化因子の体細胞への導入方法も公知である。また、核初期化因子導入後にヒストン脱アセチル化酵素（H D A C）阻害剤で細胞を処理することで、i P S細胞の樹立効率を高めてもよい。核初期化因子を導入した体細胞の培養方法、i P S細胞の検出・選択方法についても公知である。

[0027] 体細胞は、身体のいずれの部位に由来するものであってもよい。体細胞は末梢血単核細胞などの血液細胞が好ましい。

[0028] 幹細胞を赤血球へと分化させる方法も公知である。一般的には、適切な因子の存在下での胚様体（E B）形成法が用いられるが、これに限定されない。例えば、B M P 4、R o c kインヒビター、b F G F、V E G F、I L 6、I L 3、I L 1 1、S C F、F L T 3、さらにはT P O、E P Oなどの存在下においてi P S細胞を培養し、胚様体（E B）を形成させることにより赤血球へと分化させてもよい。得られたE Bをステムセルファクター（S C F）およびエリスロポエチン（E P O）を含む培地にて培養して、さらに赤血球へと分化させてもよい。

[0029] 例えば、E B形成開始から一定期間後（例えば1 0～2 0日目）に、造血幹細胞および／または造血前駆細胞に特異的な細胞表面マーカーが陽性である細胞を選択し、選択された細胞をS C FやE P Oを含む培地にて培養して、赤血球が豊富な細胞集団を得てもよい。造血幹細胞および／または造血前駆細胞に特異的な細胞表面マーカーとしては、C D 3 4やC D 4 3が挙げられるが、これらに限定されない。細胞の選択方法は公知であり、例えばセル

ソーターを用いてもよい。

[0030] SCFやEPOを含む培地にて培養する際に、ストロマ細胞と共培養して赤血球分化を促進してもよい。ストロマ細胞と共培養する際に、分化途中の細胞を再度ストロマ細胞に載せ替えて赤血球分化誘導をさらに促進してもよい。ストロマ細胞はいずれのものであってもよいが、好ましくは骨髄由来のストロマ細胞である。骨髄由来のストロマ細胞の例としてはOP9細胞が挙げられるが、これに限定されない。

[0031] 赤血球分化効率は、赤血球前駆細胞および／または赤血球に特異的な細胞表面マーカーを検出することにより調べることができる。かかるマーカーとしてはCD235a、CD71、CD36、CD23、CD234、CD235b、CD236などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいマーカーとしてはCD235a、CD71、CD36が挙げられる。マーカーの検出方法も公知であり、例えば、可視化標識を付したマーカーを用いてもよく、特異的抗体を用いてもよい。分化した赤血球の選択方法も公知であり、例えばセルソーターを用いてもよい。

[0032] 脱メチル化剤の細胞への添加は、細胞と脱メチル化剤が接触する条件下で行われる。通常は、脱メチル化剤を培地に添加する。脱メチル化剤の細胞への添加は、iPS細胞から赤血球分化のいずれの段階で行ってもよい。好ましくは、EB法にてある程度分化が進んだ段階（例えば、EB形成開始から10～20日目）で、脱メチル化剤を添加する。培地交換ごとに脱メチル化剤を添加してもよい。

[0033] 培地中に添加する脱メチル化剤の濃度は、適宜選択、変更することができる。例えばAZAを添加する場合、培地中のAZA濃度は通常約100～約1000nM、好ましくは約300～約700nM、例えば約500nMであってもよい。

[0034] 正常な赤血球であるかどうかの確認は、ALAS2遺伝子の変異が正常化しているかどうかを調べることにより行ってもよい。分化によって得られた赤血球または赤芽球のALAS2遺伝子の塩基配列と、変異のないALAS

2 遺伝子の塩基配列（公知である）とを比較することにより、かかる確認を行ってもよい。遺伝子の塩基配列の解析方法は公知であり、例えば自動シーケンサーを用いてもよい。

[0035] また、正常な赤血球であるかどうかの確認は公知の方法にて行うことができる。例えば、顕微鏡観察、Hmox-1, globinなどの遺伝子発現の確認、o-dianisidine染色、ALAS2変異部位の塩基配列の確認やX染色体不活性化の確認などの方法にて確認してもよい。あるいは、患者のiPS細胞から得られた赤血球の色調を、健常人（赤血球分化における障害を有しない人）の赤血球の色調と比較（例えば肉眼で）することにより、確認を行ってもよい。患者のiPS細胞から得られた赤血球の色調が、健常人の赤血球の色調と同じいかまたはそれに近い濃さであれば、得られた赤血球が正常と判断してもよい。

[0036] 本発明はさらなる態様において、以下のものを提供する。

- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための脱メチル化剤の使用；
- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血の治療において使用するための脱メチル化剤；
- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬の製造における脱メチル化剤の使用；ならびに
- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血の治療を要する患者に脱メチル化剤を投与することを含む、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療方法。

これらの態様における脱メチル化剤、患者については上で説明したとおりである。

[0037] 本発明はさらなる態様において、以下のものを提供する：

- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血患者由来のiPS細胞から正常な赤血球を製造する方法であって、該iPS細胞を赤血球に分化誘導することを含み、分化誘導の際に脱メチル化剤を細胞に添加するものである方法によって得られた正常な赤血球を含む、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬組成物；
- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための前記正常な赤血球の使用；
- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血の治療において使用するための、前記正常な赤血球；

- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬の製造における前記正常な赤血球の使用；ならびに

- ・ X連鎖性鉄芽球性貧血の治療を要する患者に前記正常な赤血球を投与することを含む、X連鎖性鉄芽球性貧血の治療方法。

これらの態様における脱メチル化剤、患者については上で説明したとおりである。

[0038] 以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例の記載は本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

[0039] X連鎖性鉄芽球性貧血患者からの i P S 細胞の取得

X染色体上の A L A S 2 遺伝子ヘテロに R 2 2 7 C 変異が入った X連鎖性鉄芽球性貧血患者（42歳（i P S 細胞樹立当時）、女性、以下「S A 1」ともいう）、その妹（40歳（i P S 細胞樹立当時）、女性、以下「S A 2」ともいう）、およびその母（70歳（i P S 細胞樹立当時）、女性、以下「S A 3」ともいう）の血液細胞（末梢血単核細胞）から i P S 細胞を作製した。S A 1と同様に、S A 2およびS A 3もX染色体上の A L A S 2 遺伝子ヘテロに R 2 2 7 C 変異が入った X連鎖性鉄芽球性貧血患者である。S A 1はビタミン B 6 投与が無効であった。i P S 細胞の作製手順は以下のとおりであった。

[0040] 患者から末梢血を採血し、F i c o l l - P a q u e P l u s (G Eヘルスケア)を用いて末梢血単核細胞を分離した。M A C S C D 3 M i c r o B e a d s (M i l t e n y i B i o t e c、130-050-101)を用いて、C D 3 陽性の T 細胞と C D 3 陰性の非 T 細胞に分離した。A m a x a k i t (L o n z a)を用い、p C X L E - h O C T 3 / 4 - s h p 5 3 - F、p C X L E - h S K、p C X L E - h U L、p C X W B - E B N A 1を用いて遺伝子導入を行った（これらのベクターは米国 A d d g e n e から得た）（T細胞については A m a x a H u m a n T C e l l N u c l e o f e c t o r K i t (L o n z a)を用い、非 T 細胞につ

いてはAmaxa Human Monocyte Nucleofector Kit (Lonza) を用いた)。T細胞については、血球培地X VIVO-10 (Lonza) 1ccに50 μ LMのDynabeads CD3/CD28を1.5mlのチューブに加えて溶解し、チューブをDynaMag-2に静置し、上清を取り除いた。その後、X VIVO-10に3ng/mlのIL-2を加えた培地中、MEF feeder上で細胞を培養した。非T細胞は、 α MEMに10%FBS、各10ng/mlのIL3、IL-6、G-CSF、GM-CSF加えた培地を用いて培養を行った。

[0041] ALAS2遺伝子はX染色体上にあるため、2つのALAS2遺伝子のうち1つは、女性患者においてX染色体不活性化によってランダムに不活性化される。そのため、各患者から得られたiPS細胞は以下の2種類であった：

- ・ALAS2変異のあるX染色体が不活性化し、野生型ALAS2のみを発現しているiPS細胞（「野生型ALAS2がactiveなiPS細胞」または「active wild-type iPSCs」または「WT-iPSC」という）

- ・ALAS2変異のないX染色体が不活性化し、変異型ALAS2のみを発現しているiPS細胞（「変異型ALAS2がactiveなiPS細胞」または「active mutant iPSCs」または「MT-iPSC」という）。

本明細書においてiPS細胞を「iPSC」ということがある。

SA1から58のiPSC株を得た。SA2から94のiPSC株を得た。SA3から47のiPSC株を得た。

本明細書において、SA1から得たWT-iPSC株を、「WT1-iPSC1」、「WT1-iPSC2」、「WT1-iPSC3」といい、SA1から得たMT-iPSC株を、「MT1-iPSC1」、「MT1-iPSC2」、「MT1-iPSC3」、「MT1-iPSC4」という。同様

に、SA3から得たWT-iPSC株を、「WT3-iPSC1」、「WT3-iPSC2」といい、SA3から得たMT-iPSC株を、「MT3-iPSC1」、「MT3-iPSC2」という。

健康なドナーから得た1のiPSC株(692D2)を対照として使用した。

本明細書において、細胞があるマーカーに関して陽性であることを「陽性」または「+」で、陰性であることを「陰性」または「-」で表す。例えばCD235a陽性細胞を「CD235a陽性細胞」または「CD235a+細胞」と表記する。

[0042] iPSCの維持

4 ng/mLの組換えbFGFを補足した霊長類用ES細胞培地(Rep roCell)中、STOフィーダー細胞上ですべてのiPSC株を維持した。フィーダー細胞を除去するためにMatrigelで被覆したプレート上で1継代培養後、iPSC株を分化させた。

実施例 2

[0043] iPSC細胞の赤血球分化誘導

1. 実験方法

EB法(Grigoriadis AE et.al Blood. Apr. 8; 115(14): 2769-76 (2010))を用いてiPSC細胞をStem Pro-34培地(gibco)で分化させた。0日目はBMP4、Rockインヒビターを含む培地にて、1日目～4日目はBMP4、bFGFを含む培地にて、4日目～8日目はVEGF、IL6、IL3、IL11、SCF、bFGFおよび所望によりFlt3aを含む培地にて、8日目～15日目はVEGF、IL6、IL3、IL11、SCF、TPO、EPOおよび所望によりFlt3aを含む培地にて培養した。

[0044] フローサイトメトリー分析および細胞ソーティング

iPSC由来の造血細胞をフローサイトメトリー分析およびソーティングに供するために、0.25%トリプシンを用いて胚葉体を解離させ、次い

で10~20回ピペッティングした。細胞を、FACS ARIA II (Becton-Dickinson) を用いるフローサイトメトリー分析およびソーティングに供した。7-AAD (BD Pharmingen) を用いて死細胞を除去した。

造血前駆細胞 (HPC) のソーティングに用いた抗体は、CD34-PE (BD Biosciences, 348057) およびCD43-FITC (BD Biosciences, 555475) であった。

[0045] OP9間質フィーダー細胞上で赤血球分化を行った。FACSによりソーティングされた15日目の造血前駆細胞を、OP9細胞上にプレーティングし、10% ウシ胎児血清、100mM グルタミン (Invitrogen)、100μM モノチオグリセロール (Sigma Aldrich)、5μg/mL トランスフェリン (Roche) および50μg/mL アスコルビン酸 (Sigma Aldrich) を補足したアルファ最小必須培地 (Invitrogen) 中で培養し、維持した。分化に使用したサイトカインおよび化合物は以下のものであった: 15~20日目、hSCF (100ng/mL)、ヒトFms様チロシンキナーゼ3リガンド (hFlt-3; 100ng/mL, R&D Systems)、hEPO (4U/mL) およびヒトスロンボポイエチン (hTPO; 50ng/mL, R&D Systems); 20~27日目、hSCF (100ng/mL) およびhEPO (4U/mL); 27~34日目、hEPO (4U/mL) およびクエン酸第一鉄 (SFC; 250μM, Nihon Generic Co., Ltd)。

[0046] May Grunwald-Giemsa染色

ギムザ染色液 (Wako) およびギムザ液 (Wako) を用い、製造者の説明書に従ってMay Grunwald-Giemsa染色を行った。

[0047] ベルリン青染色

Fe stain kit (Muto Pure Chemicals Co., Ltd.) を用い、製造者の説明書に従ってベルリン青染色を行

った。

[0048] oージアニシジン染色

0.01M 酢酸ナトリウム、0.65% 水、40% エタノール、および0.6mg/mL oージアニシジン (Sigma) 中で、oージアニシジン染色を15分間行った。

[0049] 11. 実験結果

active wild-type iPSCに由来する赤芽球 (WT 赤芽球) のペレットは赤色であったが、active mutant iPSCに由来する赤芽球 (MT 赤芽球) のペレットは白色であった (図1A)。鉄染色により、環状鉄芽球はMT 赤芽球中に存在するがWT 赤芽球中には存在しないことが示された (図1A)。May Grunwald-Giemsa染色により、大部分のWT 赤芽球は成熟しているが、大部分のMT 赤芽球は未成熟な形態学的表現型を示すことが示された。さらに、MT 赤芽球において、患者の赤芽球と同様に、核辺縁不整や核崩壊などの異形成の変化が観察された (図1B)。大部分のWT 赤芽球は正染性赤芽球であったが、大部分のMT 赤芽球は多染性赤芽球および巨赤芽球であった (図1C)。さらに、WT 赤芽球のoージアニシジン染色は正常であったが、MT 赤芽球はわずかに染色されるだけであり (図4D)、MT 赤芽球においてヘム合成が大きく妨げられていることが示唆された。

[0050] また、フィーダー細胞のない赤血球培養条件下で、MT-iPSCの赤血球分化能を調べた。

フィーダー細胞のない条件下で赤血球分化を行うために、蛍光活性化セルソーティング (FACS) によりソーティングされたiPSC由来の15日目の造血前駆細胞を、StemPro-34培地 (Invitrogen) 中で分化させた。分化に使用したサイトカインは以下のものであった: 15~23日目、ヒト幹細胞因子 (hSCF; 100ng/mL, R&D Systems)、ヒトエリスロポイエチン (hEPO; 4U/mL, Kyowa Kirin Co., Ltd.) およびヒトIL-3 (hIL-3;

5 ng/mL, R&D Systems) ; 23~26日目、hSCF (100 ng/mL) およびhEPO (4 U/mL) ; 26~29日目、hEPO (4 U/mL)。

[0051] 造血分化能は2種類のiPSC株間で同等であった(図2A)。しかしながら、SA1およびSA3の両方から得られたWT-iPSC株と比較すると、MT-iPSC株では、CD235+赤血球細胞へのさらなる分化が有意に妨げられていた(図2B、図2Cおよび図2D)。

実施例 3

[0052] 赤芽球における赤血球成熟関連遺伝子の発現

1. 実験方法

RNA-seq

あらかじめFACSを用いてソーティングされた3種類のWT-iPSC株および4種類のMT-iPSC株から得られたTRA1-60+iPSC、8日目のCD34+細胞、15日目のCD43+CD34+CD38-Lin-細胞および34日目のCD235a+赤芽球からRNAを抽出した。Ficoll-Paque (GE Healthcare) を用いて単離された患者骨髓単核細胞中のMACSによりソーティングされたCD235a+赤芽球、および健康なドナーの骨髓単核細胞(Lonza)からもRNAを抽出した。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep Kit, Sets A and B (Illumina) を用いて、製造者の説明書に従って、ライブラリーを構築した。NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75サイクル) (Illumina) を用いて配列決定を行った。cutadapt-1.15を用いてリードに含まれるアダプター配列をトリミングした。Bowtie2およびSamtoolsを用いて、リボソームRNAにマップされたリードの除去を行った。STAR (version 2.5.4a) を用いてリードをヒトゲノム (GRCh38 from the UCSC Genome B

rowser) にマッピングし、RSeQC (version 2.6.4) をクオリティーチェックに使用した。HTSeq (version 0.9.1) を用いて、GENCODE アノテーションファイル (version 27) に従ってリードをカウントした。そして R (version 3.6.1) 中のパッケージである DESeq2 (version 1.24.0) を用いてカウントを正規化した。DESeq2 パッケージ、clusterProfiler (version 3.12.0) および enrichplot (version 1.6.1) パッケージを用いて、GO 分析、GSEA、PCA および Wald 検定を行った。

[0053] II. 実験結果

WT 細胞および MT 細胞において、赤血球分化過程における転写発現パターンを比較するために、3 種類の WT-iPSC 株および 4 種類の MT-iPSC 株において、iPSC、8 日目の CD34+ 細胞、15 日目の CD43+CD34+CD38-Lin- 細胞、および 34 日目の CD235a+ 赤芽球の RNA-seq を行った (図 3A)。iPSC、CD34+ 細胞、および CD43+CD34+CD38-Lin- 細胞の段階では WT と MT との間に相違は観察されなかった。しかしながら、ヒエラルキークラスタリングによると、赤芽球は 2 つのクラスターに分けられた (図 3B)。5 種類の iPSC 株から分化した赤芽球ならびに健康なドナーおよび SA3 から得た骨髓赤芽球の主成分分析 (PCA) により、iPSC 由来の赤芽球は、対応する患者の骨髓赤芽球と類似のクラスターパターンを有することが示された。MT 赤芽球および SA3 由来の骨髓赤芽球は PC2 のポジティブ側に存在したが、WT 赤芽球および健康なドナーの骨髓赤芽球はネガティブ側に存在した (図 3C)。この観察結果を証明するために、RNA-seq データの Gene Ontology (GO) 分析を用いて細胞を評価した。WT 細胞においてアップレギュレートされた遺伝子は、Ras GTPase 結合、Rho GTPase 結合およびアクチン結合を含む成熟赤芽球に関連した GO ターム、ならびに遷移金属イオン膜貫通トランスポーター活性のよ

うな鉄トランスポーターによりレギュレートされるGOタームの豊富化を示した(図3D)。この分析により、同じ分化方法であるにもかかわらず、MT赤芽球よりもWT赤芽球のほうが、より成熟した段階へと分化することが示された。gene set enrichment analysis (GSEA)を用いて、赤血球分化の間に異なって発現される遺伝子のセットに関して、WT赤芽球とMT赤芽球における遺伝子発現の豊富化についても調べた。WT赤芽球においてヘム代謝データセットが有意に豊富化されていた(図3Eおよび表1)。初期の正染性赤芽球で特異的に発現された遺伝子についてiPSC由来の赤芽球および骨髄由来の赤芽球のヒエラルキークラスター分析を行った(図3F)。これらの遺伝子の発現は、WT赤芽球および健康なドナーの骨髄赤芽球よりもMT赤芽球およびSA3骨髄赤芽球において低かった。これらの遺伝子発現データは表現型実験での知見を支持するものであり、MT-iPSC由来の赤芽球は未成熟な赤血球段階で分化を停止することが示された。

[表1]

ID	Set size	Enrichment score	NES	p value	p-adjust	q values
HALLMARK_COAGULATION	137	0.590111815	1.525603	0.001015	0.033738	0.028411
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	200	0.534257692	1.398473	0.002006	0.033738	0.028411
HALLMARK_UV_RESPONSE_DN	144	0.554095302	1.438537	0.002024	0.033738	0.028411
HALLMARK_HYPOXIA	200	0.519666952	1.36028	0.003009	0.037613	0.031674
HALLMARK_HEME_METABOLISM	199	0.508982159	1.332112	0.004012	0.04012	0.033786
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	198	0.502152014	1.314011	0.005015	0.041792	0.035193

実施例 4

[0054] A Z A によるヘム合成および赤血球分化の変化について調べた。

I. 実験方法

A Z A での処理

赤血球分化の開始時から、100 nM または 500 nM の A Z A (N a c a l a i T e s q u e) を培地に添加した。培地交換時に A Z A を培地に添加した (E B 法でフィーダー細胞を用いない方法にて、19、23 および 26 日目)。

[0055] II. 実験結果

赤血球分化段階において A Z A を添加したところ (図 4 A)、MT 造血前駆細胞において C D 2 3 5 + 赤芽球の生成が有意に改善された (図 4 B および 4 C)。さらに、o - ジアニシジン染色において、A Z A 不存在下で MT 造血前駆細胞から分化したかなりの数の赤芽球は陽性でなかったが、A Z A 存在下で MT 造血前駆細胞から分化したかなりの数の赤芽球は陽性であった (図 4 D)。

実施例 5

[0056] A Z A による A L A S 2 遺伝子のヌクレオチド配列の変化について調べた。

I. 実験方法

i P S 細胞の赤血球分化誘導

実施例 1 で得られた S A 1 由来の W T - i P S C および M T - i P S C を用いた。E B 法 (Grigoriadis AE et.al Blood. Apr. 8; 115(14): 2769-76 (2010)) を用いて i P S 細胞を S t e m P r o - 3 4 培地 (g i b c o) で分化させた。0 日目は B M P 4、R o c k イnhibitターを含む培地にて、1 日目～4 日目は B M P 4、b F G F を含む培地にて、4 日目～8 日目は V E G F、I L 6、I L 3、I L 1 1、S C F、b F G F および所望により F l t 3 a を含む培地にて、8 日目～15 日目は V E G F、I L 6、I L 3、I L 1 1、S C F、T P O、E P O および所望により F l t 3 a を含む培地

にて培養した。

[0057] 15日間分化させた細胞をFITC CD43 (BD Biosciences, 555475) / PE CD34 (BD Biosciences, 348057) と反応させ、CD43+CD34+細胞をFACSソーティングした。ソーティングした細胞を14日間赤血球分化させた。EB形成開始から15日目～23日目は、Stem Pro-34培地 (gibco) にSCF、EPO、IL3を含む培地にて、23日目～26日目は、SCF、EPOを含む培地にて、26日目～29日目は、EPOを含む培地にて培養した。培養はフィーダーフリー条件下で行った。培地交換毎に、AZA投与群では500 nMのAZA (ナカライテスク株式会社) を含む培地を用い、コントロール群ではAZAのかわりにDMSOを含む培地を用いた。

[0058] サンガーシーケンスによるALAS2変異部位の解析

29日間分化誘導した細胞をQIAzolに溶解し、miRNeasy Micro kit (QIAGEN N.V.) を用いてRNA抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社) を用いて逆転写し、ALAS2のエクソン6の変異部位を、Big Dye反応を用いるサンガーシーケンスにて配列解析した。

[0059] 11. 実験結果

結果を図5に示す。野生型ALAS2がactiveなiPS細胞由来の赤芽球では、DMSO投与群でシーケンス配列が正常配列CGCのみであった。AZA 500 nM投与群では、正常配列CGCに加えて、変異配列TGCが発現していた。一方で、変異型ALAS2がactiveなiPS細胞由来の赤芽球では、DMSO投与群でシーケンス配列が変異配列TGCのみであった。AZA 500 nM投与群では、変異配列TGCに加えて、正常配列CGC配列が発現していた。これらのことから、AZAの投与により、野生型ALAS2がactiveなiPS細胞由来の赤芽球と、変異型A

L A S 2 が a c t i v e な i P S 細胞由来の赤芽球いずれにおいても、本来の野生型、変異型の発現に加えて、それぞれ変異型、野生型の発現が見られ、不活性化されていた A L A S 2 のメチル化が外れていることが考えられる。

実施例 6

[0060] A Z A による赤血球分化能の改善について調べた。

[0061] I. 実験方法

実施例 1 で得られた S A 1 由来の i P S 細胞を用い、実施例 5 と同様に E B 法にて 29 日間分化誘導した。C D 4 3 + C D 3 4 + 細胞のソーティングも実施例 1 と同様に行った。A Z A の投与も実施例 5 と同様に行った。得られた細胞を A P C C D 2 3 5 a を指標として F A C S により解析した。

[0062] II. 実験結果

野生型 A L A S 2 が a c t i v e な i P S 細胞由来の赤芽球では、DMSO 投与群（図 6 の一番左）、A Z A 500 nM 投与群（図 6 の左から二番目）のいずれにおいても赤血球分化能が良好であった。一方で、変異型 A L A S 2 が a c t i v e な i P S 細胞由来の赤芽球では、DMSO 投与群（図 6 の右から二番目）では赤血球分化能が著しく低下していたが、A Z A 500 nM 投与群（図 6 の一番右）では赤血球分化能の顕著な改善が認められた。

実施例 7

[0063] A Z A による赤血球コロニー数の増加について調べた。

I. 実験方法

実施例 1 で得られた S A 1 由来の i P S 細胞を用い、実施例 5 と同様に E B 法にて 29 日間分化誘導した。C D 4 3 + C D 3 4 + 細胞のソーティングも実施例 5 と同様に行った。ソーティング後の細胞を M e t h o C u l t （H 4 4 3 5）に溶解して播き、14 日間培養した。A Z A 投与群では 100 nM または 500 nM の A Z A を含む培地を用い、コントロール群では A Z A のかわりに DMSO を含む培地を用いた。コロニー数は以下の C F U アッセイにより計測した。

[0064] CFUアッセイ

Nishizawa MらによるCell Stem Cell. 2016;19(3):341-354.に記載された方法に基づいてCFUアッセイを行った。形態学的分析により系統アサインメントを決定し、いくつかの典型的なコロニー（特に赤血球および混合コロニー）をピックアップし、May Grunwald-Giemsa染色を用いて評価した。

[0065] II. 実験結果

野生型ALAS2がactiveなiPS細胞では、DMSO投与群（図7上段および下段の一番左）、AZA 500 nM投与群（図7上段および下段の左から二番目）のいずれにおいても赤血球コロニー数は正常範囲内であった。一方で、変異型ALAS2がactiveなiPS細胞由来の赤芽球では、DMSO投与群（図7上段および下段の右から二番目）では赤血球コロニーが認められなかったが、AZA投与群（図7上段および下段の一番右）では赤血球コロニーの出現が認められ、コロニー数は野生型ALAS2がactiveなiPS細胞のAZA投与群の約半分にまで改善された。

[0066] 複数の株を用いて、AZA投与によるMT-iPSC由来のHPCの赤血球系コロニー形成能の変化を調べた。CFUアッセイは、上述の手順に従って行った。AZA投与群およびコントロール群で全コロニー数に違いはなかった（図8A）。コントロール群のMT造血前駆細胞において、赤血球コロニーは観察されず、わずかな混合コロニーが観察された。他方、AZA投与群のMT造血前駆細胞において、赤血球コロニーおよび混合コロニーの形成が有意に改善された（図8B、図8C）。WT-iPSC3およびMT-iPSC1についても同じ手順で実験を行って、上と同様の結果を得た（図9）。これらの結果は、AZA投与が、MT造血前駆細胞における欠陥のあるヘム合成および無効造血を改善することを示すものである。

産業上の利用可能性

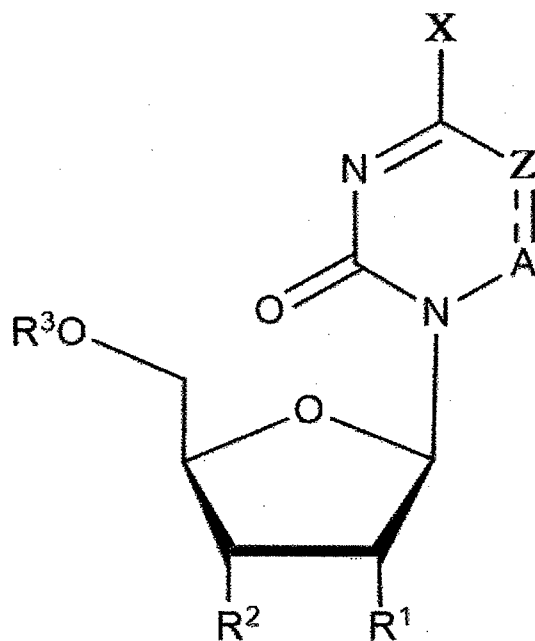
[0067] 本発明は、遺伝性疾患、特に造血疾患の治療用医薬品およびこのような疾患の研究分野等において有用である。

請求の範囲

[請求項1] 脱メチル化剤を含む、X連鎖性鉄芽球性貧血を治療するための医薬組成物。

[請求項2] 脱メチル化剤が式(1)：

[化1]



(1)

[式中、R¹およびR²はそれぞれ独立して水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルケニル、C₁₋₆アルキニル、ハロゲン、OH、OC₁₋₆アルキル、OC₁₋₆アルケニル、OC₁₋₆アルキニル、OCOC₁₋₆アルキル、OCOC₁₋₆アルケニル、またはCOC₁₋₆アルキニルであり、R³は水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルケニル、C₁₋₆アルキニル、COC₁₋₆アルキル、COC₁₋₆アルケニル、COC₁₋₆アルキニル、またはリン酸基であり、AはCR⁴またはCR⁵R⁶であり、R⁴は水素、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルケニル、C₁₋₆アルキニル、OH、またはハロゲンであり、R⁵およびR⁶はそれぞれ独立して水素

、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、OH、またはハロゲンであり、ZはN、 NR^7 、 CR^8 、または CR^9R^{10} であり、 R^7 は水素、OH、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、またはハロゲンであり、 R^8 は水素、OH、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、またはハロゲンであり、 R^9 および R^{10} はそれぞれ独立して水素、OH、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、 C_{1-6} アルキニル、またはハロゲンであり、Xは水素または $NR^{11}R^{12}$ であり、 R^{11} および R^{12} はそれぞれ独立して水素、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルケニル、または C_{1-6} アルキニルであり、上記アルキル、アルケニルおよびアルキニルは1個以上の水酸基またはハロゲンで置換されていてもよく、—は一重結合または二重結合を表す。]で示される化合物である、請求項1記載の医薬組成物。

[請求項3] 脱メチル化剤が5-アザシチジン(AZA)または5-アザ-2'-デオキシシチジンである、請求項2記載の医薬組成物。

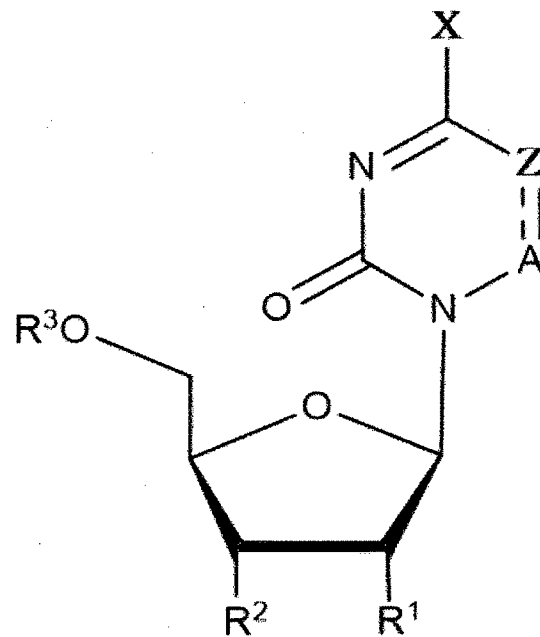
[請求項4] 脱メチル化剤がAZAである、請求項3記載の医薬組成物。

[請求項5] ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者に使用される請求項1～4のいずれか1項記載の医薬組成物。

[請求項6] X連鎖性鉄芽球性貧血患者由来のiPS細胞から正常な赤血球を製造する方法であって、該iPS細胞を赤血球に分化誘導することを含み、分化誘導の際に脱メチル化剤を細胞に添加するものである方法。

[請求項7] 脱メチル化剤が式(1)：

[化2]



(1)

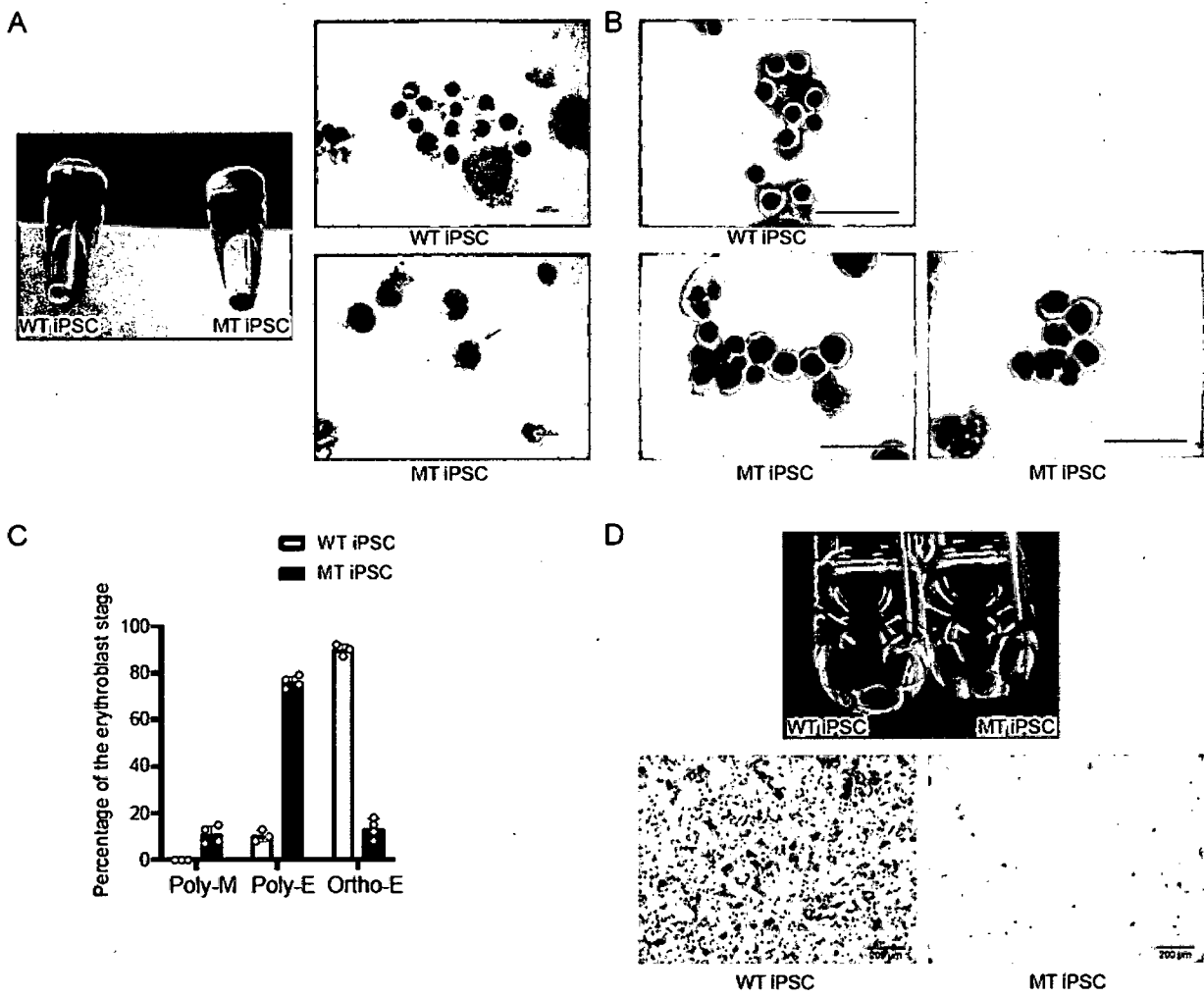
[式中、 R^1 — R^{12} 、A、Z、X、および—は請求項2における定義と同じ。]で示される化合物である、請求項6記載の方法。

[請求項8] 脱メチル化剤がA Z Aまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンである、請求項7記載の方法。

[請求項9] 脱メチル化剤がA Z Aである、請求項8記載の方法。

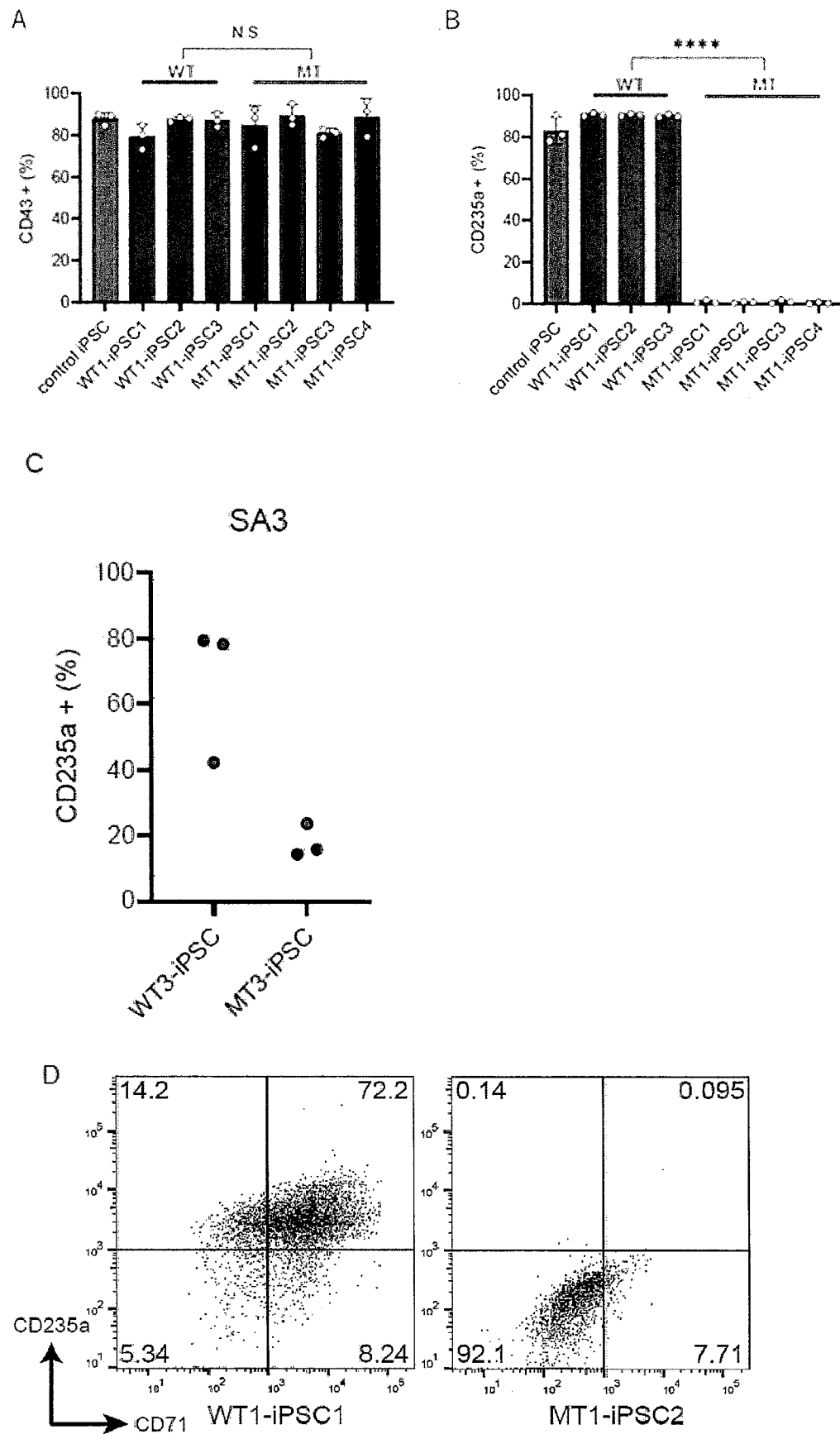
[請求項10] 患者が、ビタミンB6投与が無効であるX連鎖性鉄芽球性貧血患者である、請求項6～9のいずれか1項記載の方法。

☒ 1

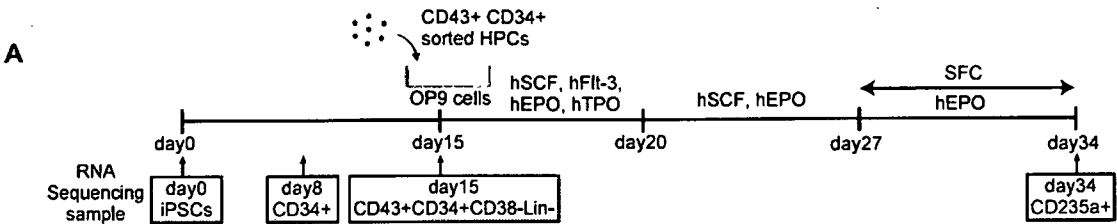


2 / 11

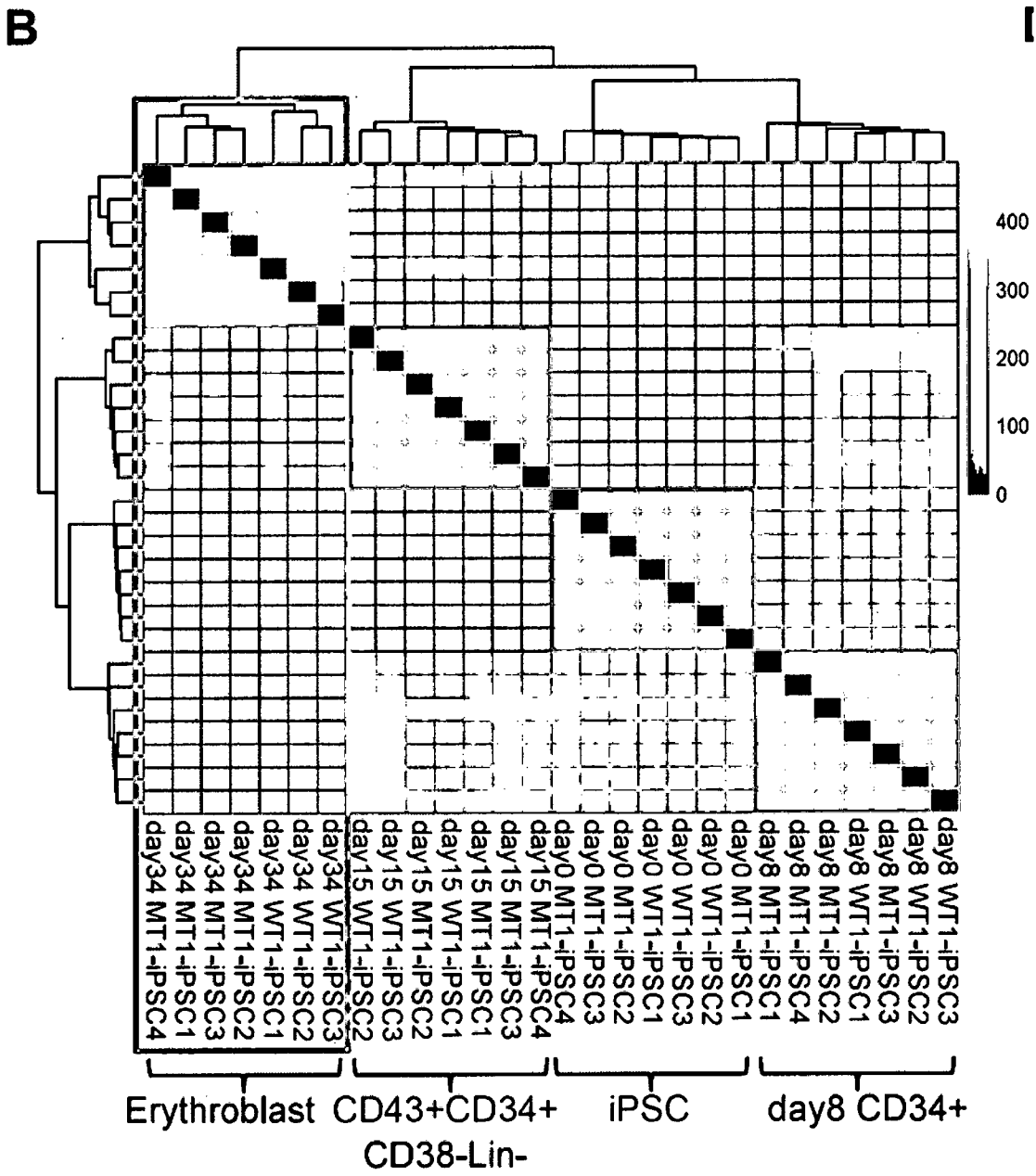
図 2



3 A



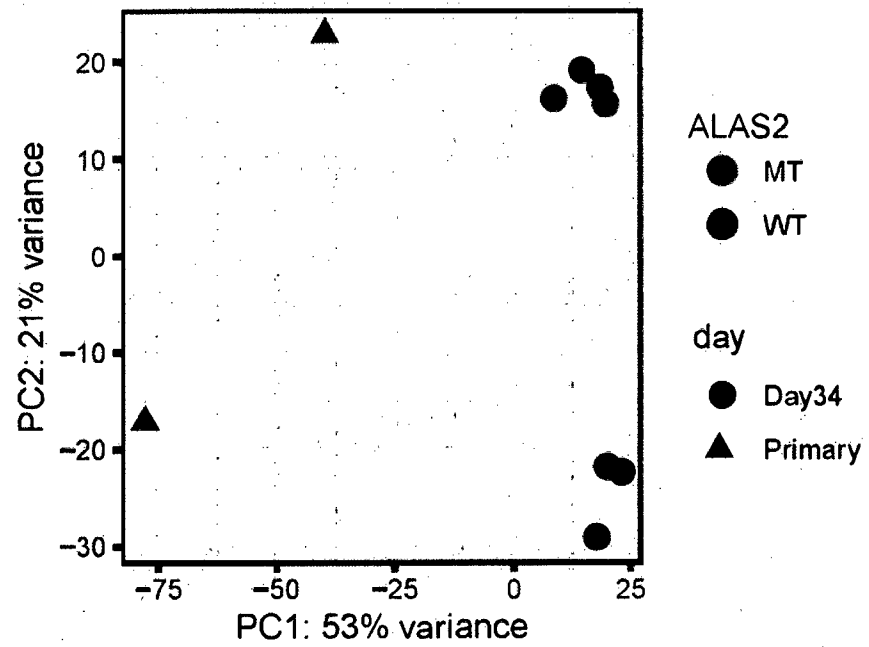
3 B



4 / 11

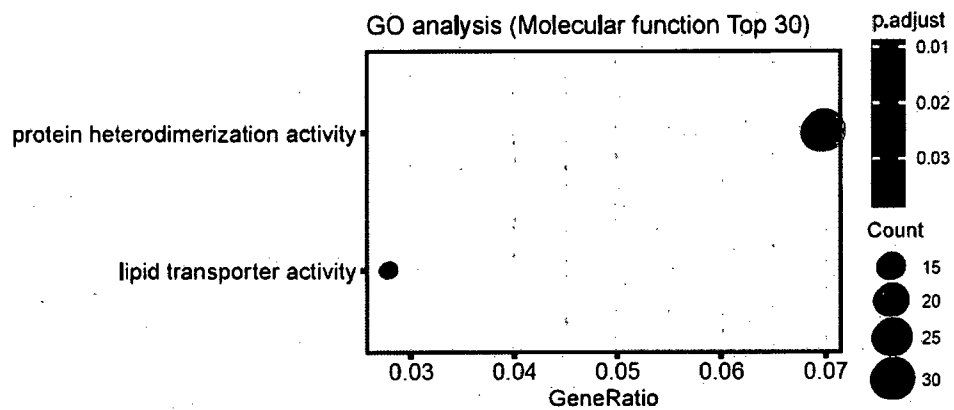
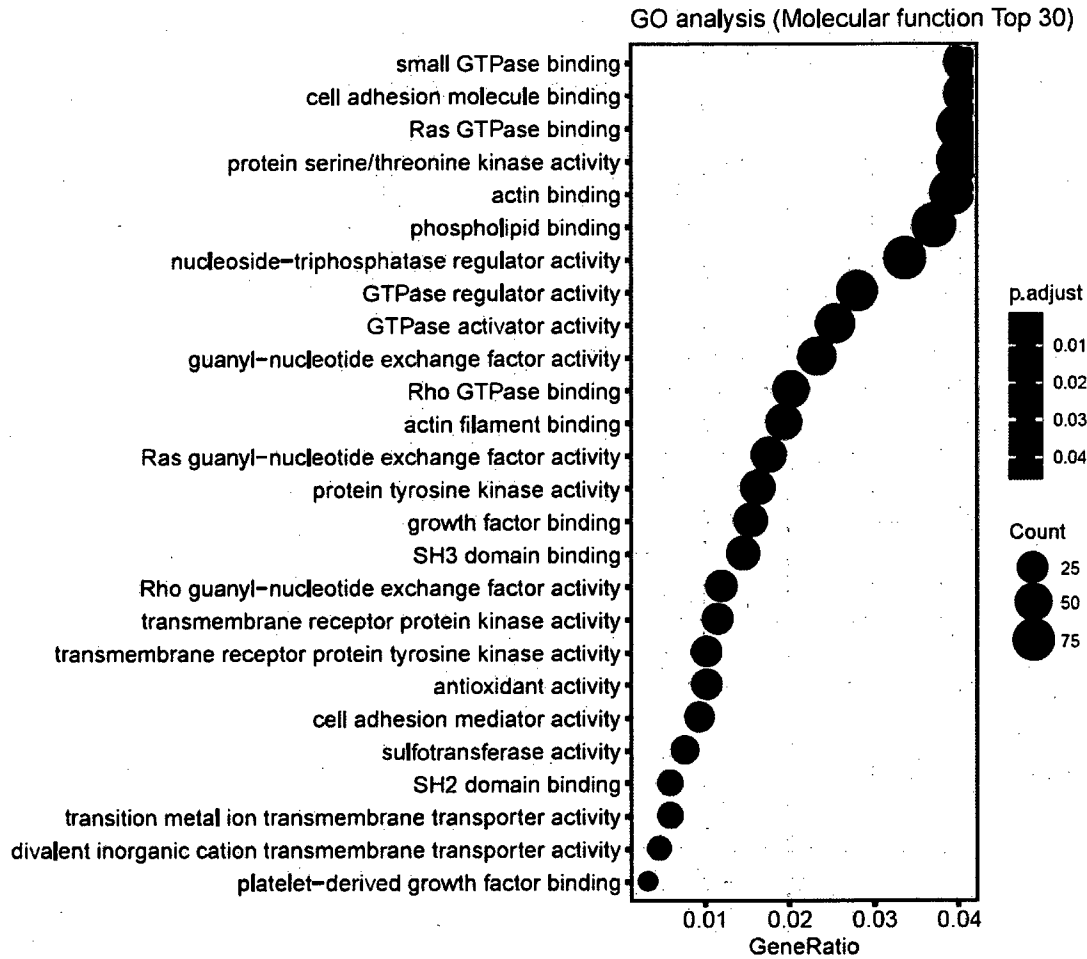
3 C

C



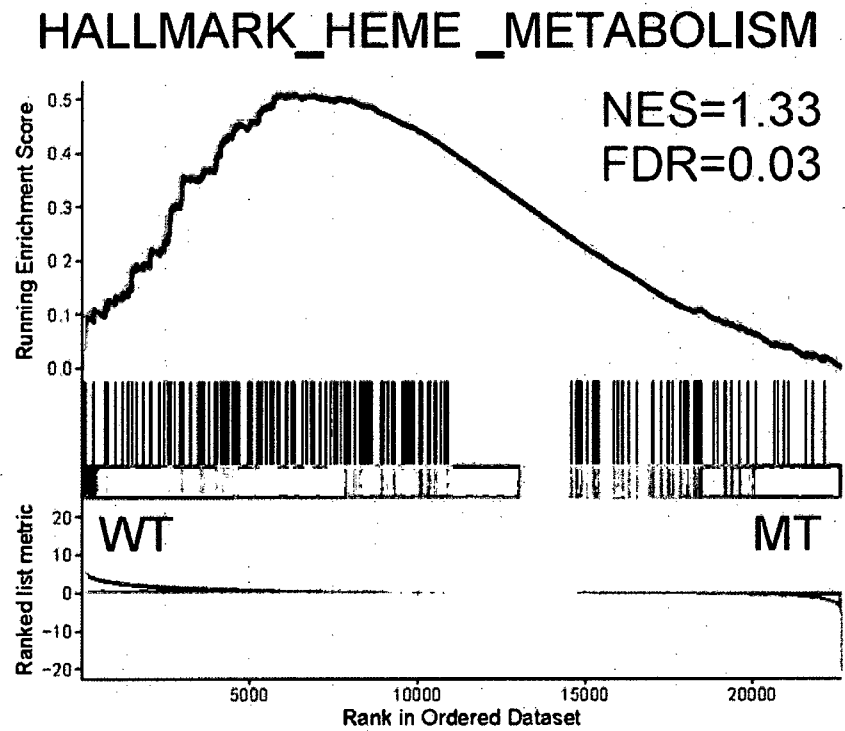
3 D

D



6 / 11

図 3 E

E

3 F

F

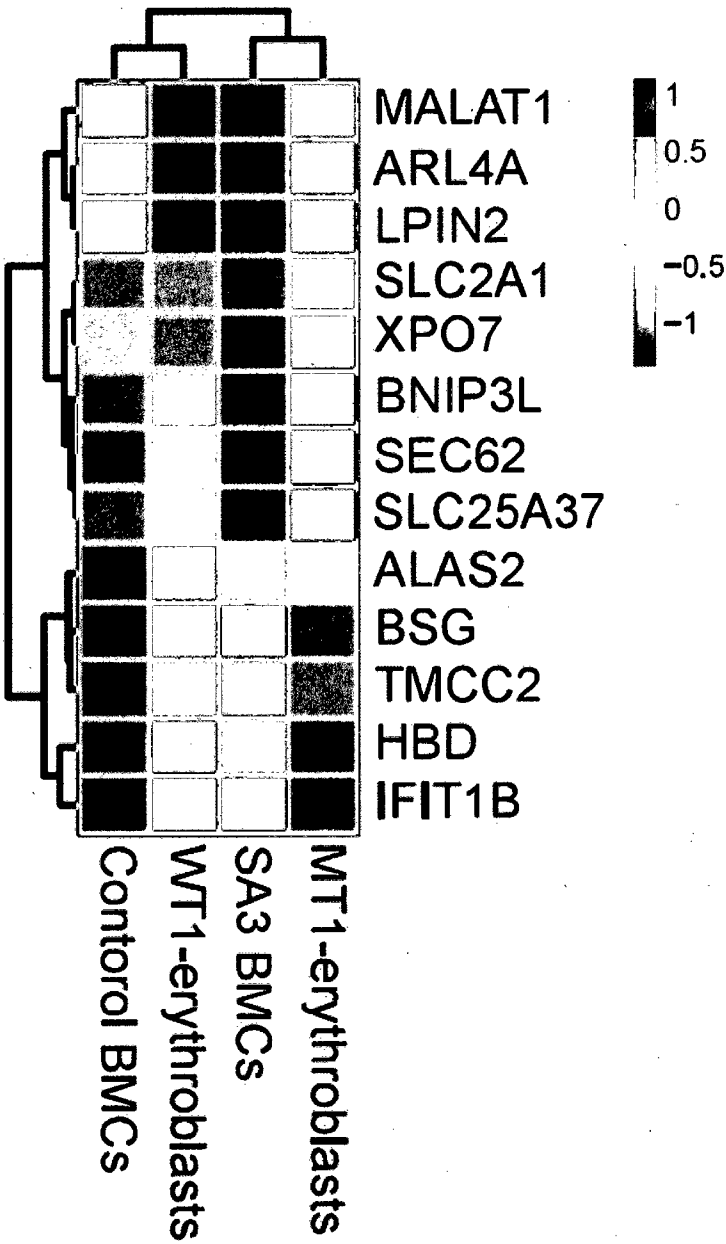
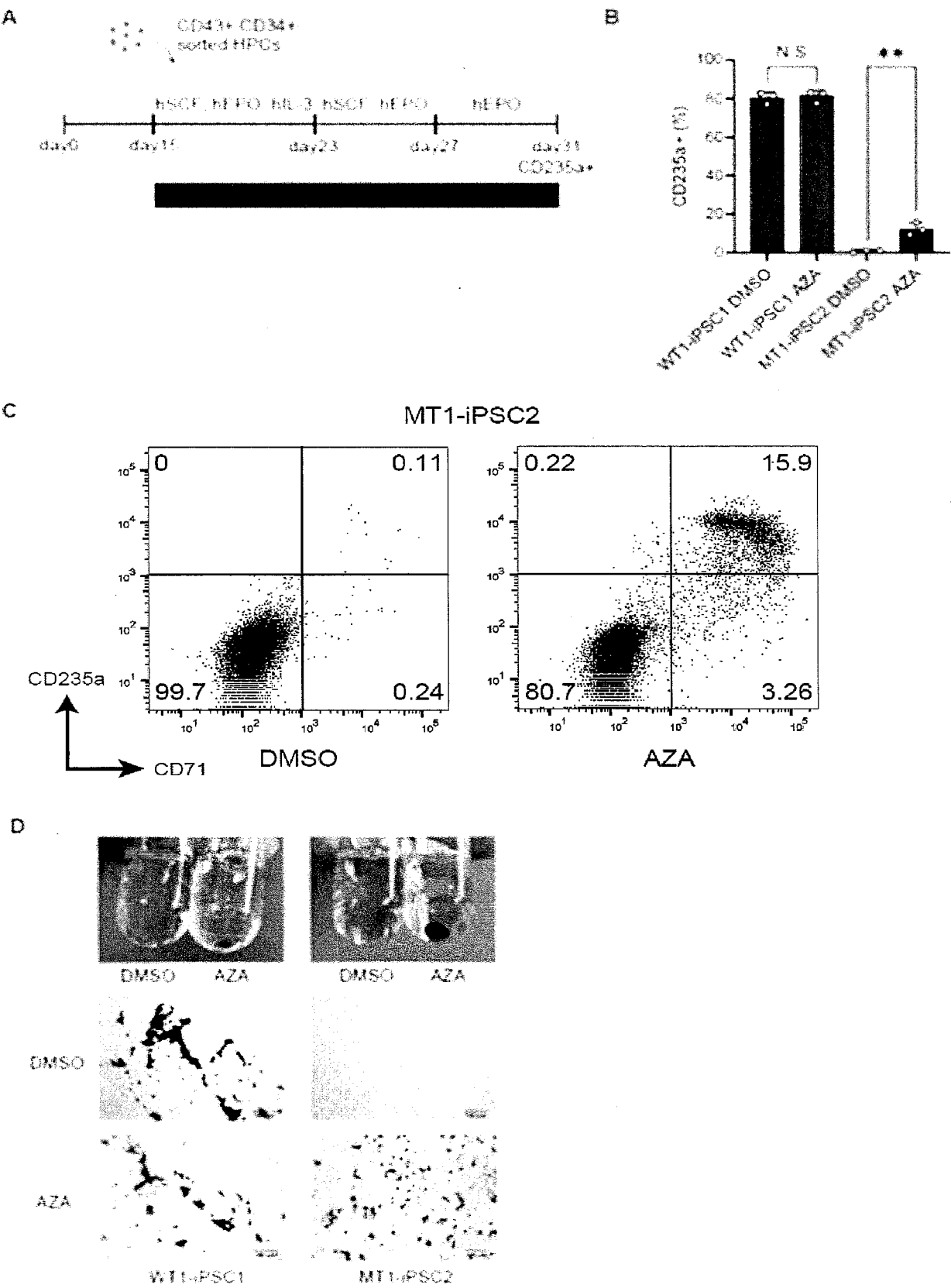


図 4



9 / 11

図 5

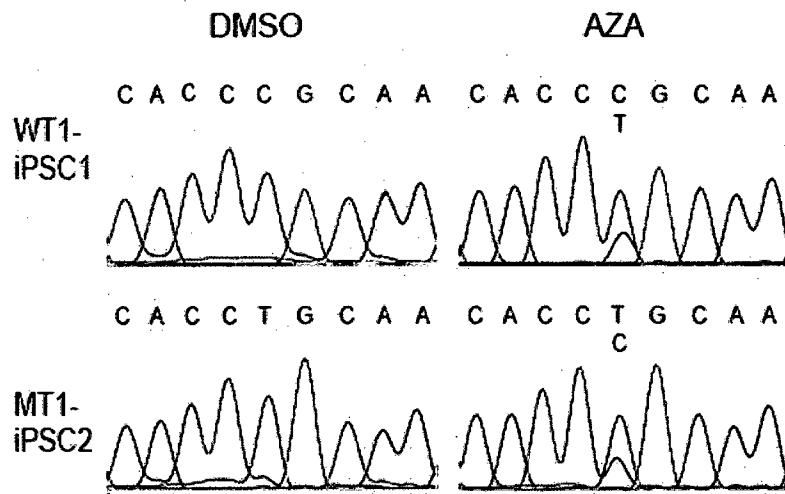


図 6

CD235a-positive ratios (%)

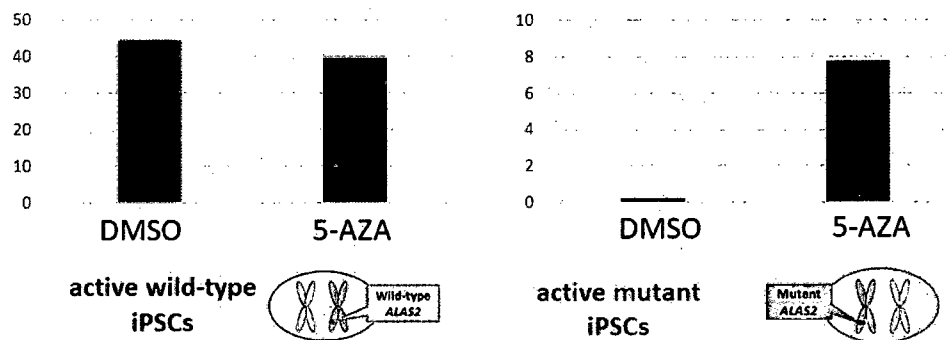
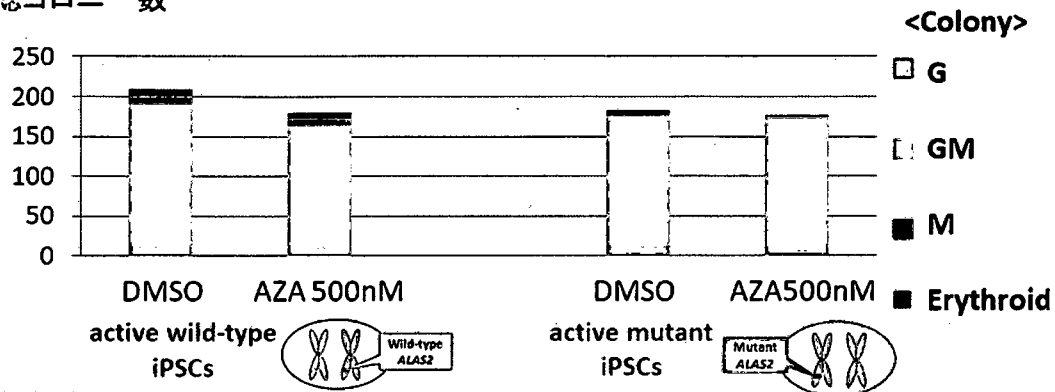


図 7

総コロニー数



赤血球コロニー数

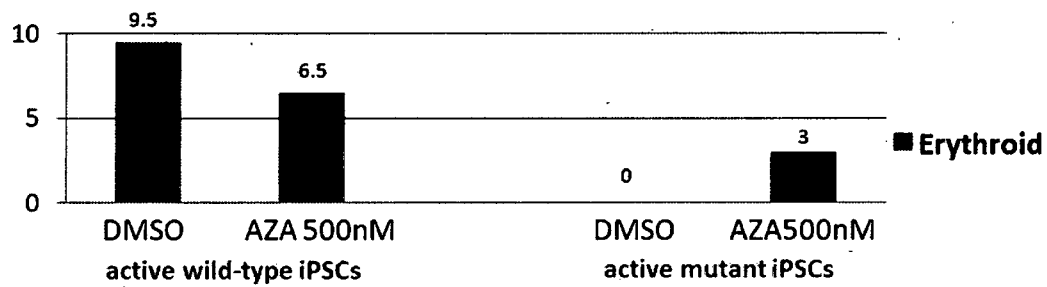


図 8

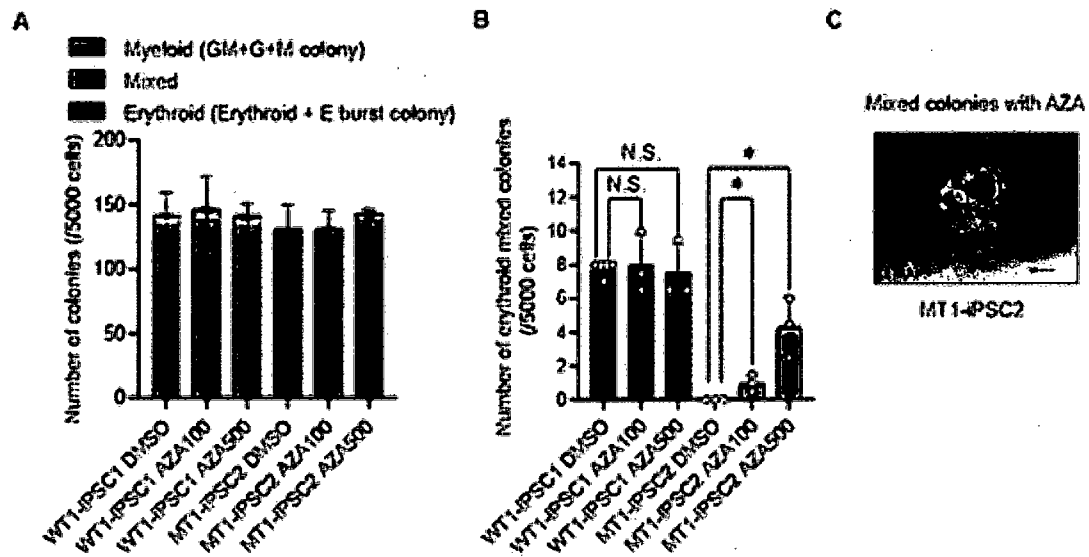
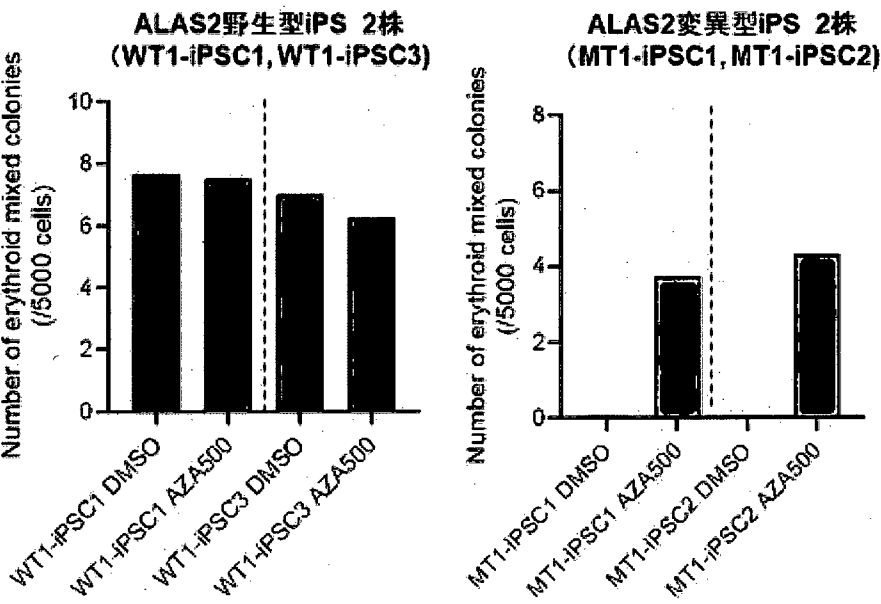


図 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/042347

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; **A61K 31/706**(2006.01)i; **A61P 7/06**(2006.01)i; **A61P 43/00**(2006.01)i; **C12N 5/078**(2010.01)i; **C12N 5/10**(2006.01)i

FI: A61K45/00; C12N5/10; C12N5/078; A61K31/706; A61P7/06; A61P43/00 111

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)

A61K45/00; A61K31/706; A61P7/06; A61P43/00; C12N5/078; C12N5/10

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 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

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.
Y	WO 2018/230505 A1 (UNIV KYOTO) 20 December 2018 (2018-12-20)	1, 5, 6, 10
A	claims, paragraphs [0003]-[0006], examples	2-4, 7-9
Y	CAZZOLA, M. et al. Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females. BLOOD. 96(13) (2000), 4363-4365	1, 5, 6, 10
A	fig. 1	2-4, 7-9
Y	INOKURA, K. et al. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. Experimental Hematology 49 (2017), 56-67	1, 5, 6, 10
A	fig. 4, discussion	2-4, 7-9

☒ 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

01 December 2021

Date of mailing of the international search report

14 December 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/042347

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MORITA, Y. et al. Five-day regimen of azacitidine for lower-risk myelodysplastic syndromes (refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts): A prospective single-arm phase 2 trial. Cancer Science 109 (2018), 3209-3215 abstract, introduction	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/042347

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2018/230505	A1	20 December 2018	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 45/00(2006.01)i; A61K 31/706(2006.01)i; A61P 7/06(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 5/078(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i FI: A61K45/00; C12N5/10; C12N5/078; A61K31/706; A61P7/06; A61P43/00 111		
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）） A61K45/00; A61K31/706; A61P7/06; A61P43/00; C12N5/078; C12N5/10 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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021年 国際調査で利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） CAlus/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
Y A	WO 2018/230505 A1 (国立大学法人京都大学) 20.12.2018 (2018-12-20) 請求の範囲、[0003]-[0006]、実施例	1, 5, 6, 10 2-4, 7-9
Y A	CAZZOLA M. et al., "Familial-skewed X-chromosome inactivation as a predisposing factor for late-onset X-linked sideroblastic anemia in carrier females", BLOOD, 96(13) (2000), 4363-4365 Figure 1.	1, 5, 6, 10 2-4, 7-9
Y A	INOKURA K. et al., "Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts", Experimental Hematology 49 (2017), 56-67 Figure 4, Discussion	1, 5, 6, 10 2-4, 7-9
☒ 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、一般的な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抵触するものではなく、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 01.12.2021		国際調査報告の発送日 14.12.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 小川 知宏 4U 3344 電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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
A	MORITA Y. et al., "Five-day regimen of azacitidine for lower-risk myelodysplastic syndromes (refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts): A prospective single-arm phase 2 trial", Cancer Science 109 (2018), 3209-3215 ABSTRACT, INTRODUCTION	1-10

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/042347

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
W0	2018/230505	A1	20.12.2018	(ファミリーなし)	