

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6570053号  
(P6570053)

(45) 発行日 令和1年9月4日(2019.9.4)

(24) 登録日 令和1年8月16日(2019.8.16)

(51) Int.Cl. F I  
**A 6 1 K 31/661 (2006.01)** A 6 1 K 31/661 ZMD  
**A 6 1 P 9/10 (2006.01)** A 6 1 P 9/10  
**C 1 2 N 5/0775 (2010.01)** C 1 2 N 5/0775

請求項の数 5 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2015-63396 (P2015-63396)	(73) 特許権者	304019399 国立大学法人岐阜大学
(22) 出願日	平成27年3月25日 (2015.3.25)		岐阜県岐阜市柳戸1番1
(65) 公開番号	特開2016-183119 (P2016-183119A)	(74) 代理人	110000110 特許業務法人快友国際特許事務所
(43) 公開日	平成28年10月20日 (2016.10.20)	(72) 発明者	湊口 信也 岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内
審査請求日	平成29年12月21日 (2017.12.21)	(72) 発明者	出澤 真理 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1 国立大学法人東北大学内
		(72) 発明者	吉田 正順 秋田県秋田市中通5-5-34 株式会社Clio内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スフィンゴシン-1-リン酸受容体2活性化化合物含有非傷害部位投与製剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

スフィンゴシン-1-リン酸を有効成分とし、心筋傷害の治療のために非傷害部位に皮下注射又は筋肉注射により投与する、心筋傷害の治療のための製剤。

【請求項2】

多能性幹細胞の移植を伴わないで前記心筋傷害を治療する、請求項1に記載の製剤。

【請求項3】

前記心筋傷害は、急性心筋梗塞である、請求項1又は2に記載の製剤。

【請求項4】

1日投与量が1mg/kg以上10mg/kg以下である、請求項1～3のいずれかに記載の製剤。 10

【請求項5】

前記製剤は、内因性多能性幹細胞を血流に動員するための製剤であって、

前記内因性多能性幹細胞は、以下の特徴；(a) SSEA3及び/又はCD105に関して陽性である、及び(b) CD117及び/又はCD146に関して陰性であるの1種又は2種を有する、請求項1～4のいずれかに記載の製剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 2 活性化化合物含有非傷害部位投与製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

間葉系細胞画分に存在し、誘導操作なしに得られる、SSEA-3 (Stage-Specific Embryonic Antigen -3) を表面抗原として発現している多能性幹細胞 (Multilineage-differentiating Stress Enduring cells; Muse 細胞) が間葉系細胞画分の有する多能性を担っていることが知られている (特許文献 1、非特許文献 1、2)。また、経脈管的に投与された Muse 細胞が、スフィンゴシン - 1 - リン酸 (S1P) 受容体 2 (S1PR2) を活性化する化合物 (例えば、S1P 自体) の投与部位に誘導されることから、当該化合物が Muse 細胞の遊走因子であることが報告されている (特許文献 2)。

10

【0003】

また、S1P の投与部位に Muse 細胞は、組織再生に基づく各種疾患の治療に適用できる可能性があることがわかってきている。なかでも、心筋梗塞に対して、Muse 細胞を経静脈的に投与すると、疾患部位である心臓に集積して、当該部位において梗塞領域を低減することが報告されている (特許文献 3)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】国際公開 WO2011/007900 パンフレット

20

【特許文献 2】国際公開 WO2014/133170 パンフレット

【特許文献 3】国際公開 WO2014/027684 パンフレット

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献 1】: Dezawa, M., et al., J. Clin. Invest., Vol. 113, p. 1701 - 1710 (2004):

【非特許文献 2】Dezawa, M., et al., Science, Vol. 309, p. 314 - 317 (2005)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0006】

Muse 細胞の疾患治療への使用形態としては、特許文献 3 に示すように、疾患に罹患している患者個体から採取し、あるいは採取・培養して、再び個体に移植するという、細胞移植の形態を採る使用形態が挙げられる。

【0007】

しかしながら、細胞移植を伴うにあたっては、必要な細胞数まで増殖させること、培養細胞の品質管理などにおいて困難を伴う場合もある。

【0008】

また、S1PR2 活性化化合物が遊走因子であったとしても、当該化合物を傷害部位に投与する必要がある。しかしながら、当該化合物の傷害部位への投与やデリバリーは必ずしも容易ではない。

40

【0009】

以上のように、細胞治療はその有用性は高いものの、適切な Muse 細胞の調製は依然として困難であり、治療へのハードルは低くはない。また、S1PR2 活性化化合物の投与についても困難性があつた。

【0010】

本明細書は、上記問題に鑑みて、より実用的な形態で Muse 細胞を利用できる製剤を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0011】

50

本発明者らは、Muse細胞は、ヒトなどにおいて内在する多能性幹細胞であるため、本来的に個体内に内在する又は傷害時に骨髄から誘導されるMuse細胞（以下、これらを内因性Muse細胞という。）を、そのまま傷害部位に一層効果的にデリバリーさせるのに好適な製剤を見出した。本明細書は、こうした知見に基づき以下の手段を提供する。

【0012】

(1) スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 2 (S1PR2) を活性化する化合物を有効成分とする、心筋傷害の治療のための非傷害部位投与製剤。

(2) 多能性幹細胞の移植を伴わないで前記心筋障害を治療する、(1) に記載の製剤。

(3) 前記心筋傷害は、急性心筋梗塞である、(1) 又は(2) に記載の製剤。

(4) 経皮投与製剤である、(1) ~ (3) のいずれかに記載の製剤。

10

(5) 皮下注射剤又は筋肉注射剤である、(1) ~ (4) のいずれかに記載の製剤。

(6) 1日投与量が1mg/kg以上10mg/kg以下である、(1) ~ (5) のいずれかに記載の製剤。

(7) 前記化合物は、スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 2 に対するアゴニストである、

(1) ~ (6) のいずれかに記載の製剤。

(8) 前記内因性多能性幹細胞は、以下の特徴；

(a) SSEA3 及び/又はCD105 に関して陽性である、及び

(b) CD117 及び/又はCD146 に関して陰性である

の1種又は2種を有する、(1) ~ (7) のいずれかに記載の製剤。

(9) S1PR2 を活性化する化合物を有効成分とする、内因性多能性幹細胞を傷害部位へ送達するための非傷害部位投与製剤。

20

(10) 経皮投与製剤である、(9) に記載の製剤。

(11) 前記化合物は、スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 2 に対するアゴニストである、(10) に記載の製剤。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ウサギ心筋梗塞モデルを用いたS1P投与試験のプロトコールの概要を示す図である。

【図2】ウサギ心筋梗塞モデルの血中のMuse細胞の測定結果を示す図である。

【図3】ウサギ心筋梗塞モデルに対するS1P投与の効果を示す図である。

30

【図4】血中のS1P量の評価結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書の開示は、心筋傷害の治療用の製剤及び内因性多能性幹細胞の傷害部位への送達用の製剤に関する。

【0015】

本開示の製剤（以下、単に、本製剤という。）は、S1PR2活性化化合物（以下、単に、本化合物という。）を含有することができる。本製剤によれば、本化合物を非傷害部位に投与して血流中に含有させることにより、内因性Muse細胞などの多能性幹細胞を血流中に動員して傷害部位に送達することができる。

40

【0016】

本製剤の投与部位は、個体において組織や細胞の傷害が生じている傷害部位とは異なる部位である。本製剤は、本化合物を、いわゆる遊走因子としてではなく、内因性Muse細胞等の多能性幹細胞を血流中に動員させるために用いている。このため、Muse細胞を集積させたい部位ではない部位に投与することによって、内因性Muse細胞を傷害部位に集積させることができる。

【0017】

このため、本製剤は、細胞移植を伴うことなく、また、傷害部位に本化合物を投与することなく、内因性Muse細胞などの内因性多能性幹細胞を血流に動員し傷害部位に集積させて、傷害部位における組織や細胞の再生に寄与させることができる。

50

## 【 0 0 1 8 】

本製剤は、心筋障害治療に用いることができる。本製剤を心筋障害の傷害部位でない部位に投与することで、内因性多能性幹細胞を血流中に動員し、心筋傷害部位へと送達して梗塞領域の拡大を抑制又は梗塞領域を縮小させることができる。これにより、心筋障害を治療し又は改善することができる。

## 【 0 0 1 9 】

以下、本開示の実施形態について詳細に説明する。

## 【 0 0 2 0 】

( S 1 P R 2 活性化化合物を含有する、心筋障害の治療のための非傷害部位投与製剤 )

本開示の心筋障害治療のための非傷害部位投与製剤 ( 以下、本治療用製剤という。 ) は、 S 1 P R 2 活性化化合物を有効成分として含有することができる。本治療用製剤は、内因性幹細胞を血流中に動員し、心筋障害部位に送達することができる。以下、まず、内因性多能性幹細胞について説明する。

## 【 0 0 2 1 】

( 内因性多能性幹細胞 )

本治療用製剤は、生体内に予め存在する内因性である多能性幹細胞に対して作用することができる。なお、本明細書において、「内因性多能性幹細胞」とは、移植によらないで、本来的に生体内に存在するか又は生体において生じた傷害に起因して誘導された多能性幹細胞を意味している。

## 【 0 0 2 2 】

内因性多能性幹細胞としては、本発明者らの一人である出澤が、ヒト生体内にその存在を見出し、「 Muse ( Multilineage - differentiating Stress Enduring ) 細胞」と命名した細胞が挙げられる。 Muse 細胞は、骨髄液や真皮結合組織等の皮膚組織から得ることができ、各臓器の結合組織にも散在する。また、この細胞は、多能性幹細胞と間葉系幹細胞の両方の性質を有する細胞である。

## 【 0 0 2 3 】

Muse細胞などの内因性多能性幹細胞は、少なくとも S S E A 3 陽性及び C D 1 0 5 陽性のいずれかであることが好ましい。

## 【 0 0 2 4 】

例えば、 Muse 細胞は、それぞれの細胞表面マーカーである「 S S E A - 3 ( Stage - specific embryonic antigen - 3 ) 」と「 C D 1 0 5 」のダブル陽性として同定される。したがって、 Muse 細胞又は Muse 細胞を含む細胞集団は、例えば、これらの抗原マーカーを指標として生体組織から分離することができる。 Muse 細胞の分離法、同定法、及び特徴などの詳細は、国際公開第 W O 2 0 1 1 / 0 0 7 9 0 0 号に開示されている。また、 W a k a o ら ( 2 0 1 1、上述 ) によって報告されているように、骨髄、皮膚などから間葉系細胞を培養し、それを Muse 細胞の母集団として用いる場合、 S S E A - 3 陽性細胞の全てが C D 1 0 5 陽性細胞であることが分かっている。すなわち、生体の間葉系組織又は培養間葉系幹細胞から Muse 細胞を分離する場合は、単に S S E A - 3 を抗原マーカーとして Muse 細胞を精製し、使用することができる。

## 【 0 0 2 5 】

なお、本明細書においては、 S S E A - 3 を抗原マーカーとして、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織から分離された多能性幹細胞 ( Muse 細胞 ) 又は Muse 細胞を含む細胞集団を単に「 S S E A - 3 陽性細胞」と記載することがある。また、本明細書においては、「非 Muse 細胞」とは、生体の間葉系組織又は培養間葉系組織に含まれる細胞であって、「 S S E A - 3 陽性細胞」以外の細胞を指す。

## 【 0 0 2 6 】

より具体的には、 Muse 細胞又は Muse 細胞を含む細胞集団は、細胞表面マーカーである S S E A - 3 に対する抗体を単独で用いて、又は S S E A - 3 及び C D 1 0 5 に対するそれぞれの抗体を両方用いて、生体組織 ( 例えば、間葉系組織 ) から分離することが

10

20

30

40

50

できる。ここで、「生体」とは、哺乳動物の生体をいう。本開示において、生体には、受精卵や胞胚期より発生段階が前の胚は含まれないが、胎児や胞胚を含む胞胚期以降の発生段階の胚は含まれる。哺乳動物には、限定されないが、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等のげっ歯類、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ロバ、ヤギ、フェレット等が挙げられる。

【0027】

なお、本開示においてM u s e細胞は、生体の組織由来である点で、胚性幹細胞（E S細胞）や胚性生殖幹細胞（E G細胞）と明確に区別される。また、「間葉系組織」とは、骨、滑膜、脂肪、血液、骨髄、骨格筋、真皮、靭帯、腱、歯髄、臍帯などの組織及び各種臓器に存在する結合組織をいう。例えば、M u s e細胞は、骨髄や皮膚から得ることができる。例えば、生体の間葉系組織を採取し、この組織からM u s e細胞を分離し、利用することが好ましい。また、上記分離手段を用いて、培養間葉系細胞からM u s e細胞を分離してもよい。

10

【0028】

また、M u s e細胞などの内因性多能性幹細胞は、C D 3 4（E P及びA D S Cのマーカ）、C D 1 1 7（c - k i t）（M Bのマーカ）、C D 1 4 6（P C及びA D S Cのマーカ）、C D 2 7 1（N G F R）（N C S Cのマーカ）、N G 2（P Cのマーカ）、v W F因子（フォンビルブランド因子）（E Pのマーカ）、S o x 1 0（N C S Cのマーカ）、S n a i 1（S K Pのマーカ）、S l u g（S K Pのマーカ）、T y r p 1（M Bのマーカ）、及びD c t（M Bのマーカ）からなる群から選択される11個のマーカのうち少なくとも1個、例えば、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個又は11個のマーカの新発現を指標に分離することができる。例えば、限定されないが、C D 1 1 7及びC D 1 4 6の新発現を指標に分離することができる。さらに、C D 1 1 7、C D 1 4 6、N G 2、C D 3 4、v W F及びC D 2 7 1の新発現を指標に分離することができる。さらに、上記の11個のマーカの新発現を指標に分離することができる。

20

【0029】

上記のように、M u s e細胞又はM u s e細胞を含む細胞集団は、例えば、S S E A - 3陽性又はS S E A - 3陽性とC D 1 0 5陽性の二重陽性を指標にして生体組織から分離することができる。ヒト成人皮膚等には、種々のタイプの幹細胞及び前駆細胞を含むことが知られている。しかしながら、M u s e細胞は、これらの細胞と区別されるものである。すなわち、このような幹細胞及び前駆細胞には、皮膚由来前駆細胞（S K P）、神経堤幹細胞（N C S C）、メラノblast（M B）、血管周囲細胞（P C）、内皮前駆細胞（E P）、脂肪由来幹細胞（A D S C）が挙げられる。したがって、これらの細胞に固有のマーカの「新発現」を指標として、M u s e細胞を分離することができる。

30

【0030】

また、本発明において対象とされる上記特徴を有するM u s e細胞は、以下：

- ( i ) テロメラーゼ活性が低い又は無い；
- ( i i ) 三胚葉のいずれの胚葉の細胞に分化する能力を持つ；
- ( i i i ) 腫瘍性増殖を示さない；及び
- ( i v ) セルフリニューアル能を持つ

40

からなる群から選択される少なくとも1つの性質を有してもよい。好ましくは、2以上、より好ましくは3以上、さらに好ましくはすべての特徴を有している。

【0031】

上記( i )について、「テロメラーゼ活性が低い又は無い」とは、例えば、T R A P E Z E X L t e l o m e r a s e d e t e c t i o n k i t（M i l l i p o r e社）を用いてテロメラーゼ活性を検出した場合に、低い又は検出できないことをいう。テロメラーゼ活性が「低い」とは、例えば、体細胞であるヒト線維芽細胞と同程度のテロメラーゼ活性を有しているか、又はH e l a細胞に比べて1 / 5以下、好ましくは1 / 10以下のテロメラーゼ活性を有していることをいう。

50

## 【0032】

上記(i i)について、Muse細胞は、*in vitro*及び*in vivo*において、三胚葉(内胚葉系、中胚葉系、及び外胚葉系)に分化する能力を有し、例えば、*in vitro*で誘導培養することにより、肝細胞、神経細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、骨細胞、脂肪細胞等に分化し得る。また、*in vivo*で精巣に移植した場合にも三胚葉に分化する能力を示す場合がある。さらに、静注により生体に移植することで損傷を受けた臓器(心臓、皮膚、脊髄、肝、筋肉等)に遊走及び生着し、分化する能力を有する。

## 【0033】

上記(i i i)について、Muse細胞は、浮遊培養では増殖速度約1.3日で増殖するが、10日間程度で増殖が止まるという性質を有し、さらに精巣に移植した場合、少なくとも半年間は癌化しないという性質を有する。

10

## 【0034】

上記(i v)について、Muse細胞は、セルフリニューアル(自己複製)能を有する。ここで、「セルフリニューアル」とは、1個のMuse細胞を浮遊培養することにより得られる胚様体様細胞塊に含まれる細胞を培養し、再度胚様体様細胞塊を形成させることをいう。セルフリニューアルは1回又は複数回のサイクルを繰り返せばよい。

## 【0035】

(S1PR2活性化化合物)

本治療用製剤は、S1PR2活性化化合物を有効成分とすることができる。S1PR2は、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)に対する受容体の1つである。内因性多能性幹細胞であるMuse細胞において特異的に発現していることが報告されている(特許文献1等)。

20

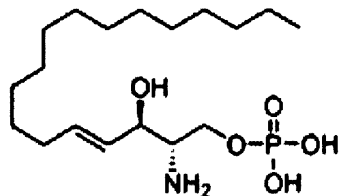
## 【0036】

S1PR2受容体活性化化合物としては、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)、スフィンゴシン-1-リン酸誘導体、並びにスフィンゴシン-1-リン酸受容体のアゴニストが挙げられる。ここで、「スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)」とは、下記式で表される。S1Pは、細胞膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物であり、ある種の酵素によって細胞膜から切り出されて遊離した後、細胞膜上に発現しているGタンパク質共役受容体に結合することにより、細胞遊走などを引き起こす生理活性物質として知られている。また、S1Pに対する受容体としては、Gタンパク質共役受容体であるS1P受容体が知られ、これまでにS1PR1~S1PR5の5種類が存在することが分かっている。

30

## 【0037】

【化1】



## 【0038】

S1PR2活性化化合物としては、S1Pのほか、内因性多能性幹細胞の血流への動員能を有している限り、そのS1P誘導体も使用可能である。S1P誘導体としては、特に限定されないが、スフィンゴシルコリン、ガラクトシルスフィンゴシン(サイコシン)、グルコシルスフィンゴシン(グルコサイコシン)、スルホガラクトシルスフィンゴシン(リゾスルファチド)、N,N-ジメチルスフィンゴシン1-リン酸、N,N,N-トリメチルスフィンゴシン1-リン酸、セラミド1-リン酸、ジヒドロスフィンゴシン1-リン酸、フィトスフィンゴシン1-リン酸、及びデハイドロフィトスフィンゴシン1-リン酸、並びにそれらの塩を挙げることができる。

40

## 【0039】

また、S1PR2活性化化合物としては、S1PR2に対するアゴニストを用いること

50

ができる。このようなアゴニストとしては、以下の化合物(1)~(5)が挙げられる。

(1) 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2 , 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - オキソエチル) - 5 - (トリフルオロメチル)ピリジン - 2 (1 H) - オン (例えば、Park, S. W., et al., J. Am. Soc. Nephrol., 23, p. 266 - 80 (2012) 参照)

(2) 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2 , 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - オキソエチル)ピロリジン - 2 , 5 - ジオン

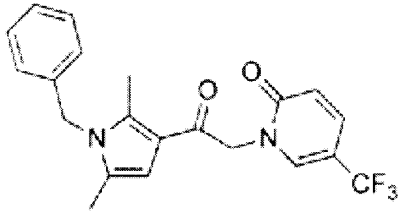
(3) 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2 , 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - オキソエチル) - 3 - メチルイミダゾリジン - 2 , 4 , 5 - トリオン

(4) 1 - (1 - ベンジル - 2 , 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - ( (1 - メチル - 1 H - テトラゾール - 5 - イル) チオ) エタノン

(5) (S) - 1 - (2 - (1 - ベンジル - 2 , 5 - ジメチル - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 2 - オキソエチル) - 2 ' , 3 ' - ジヒドロスピロ [イミダゾリジン - 4 , 1 ' - インデン] - 2 , 5 - ジオン

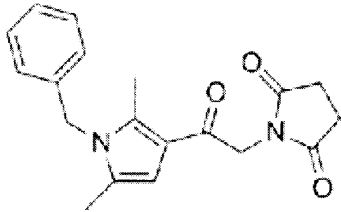
【0040】

## 【化2】



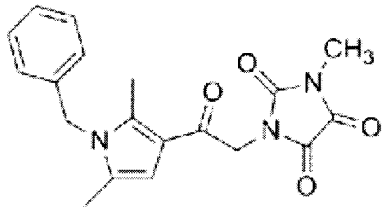
(1)

10



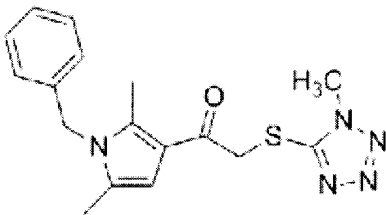
(2)

20



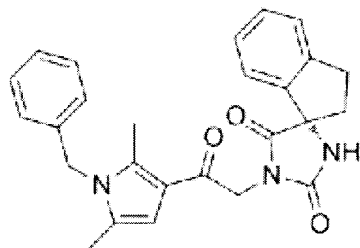
(3)

30



(4)

40



(5)

## 【0041】

S1PR2 活性化化合物としては、脱リン酸化反応を担うS1Pリアーゼを阻害する物質が挙げられる。また、S1Pは、生体内において、小胞体に存在するスフィンゴシン -

50



1 - リン酸リアーゼにより脱リン酸化され、trans - 2 - ヘキサデセナールとエタノールアミンリン酸に分解されるが、通常、この脱リン酸化反応と、trans - 2 - ヘキサデセナールにリン酸を付加する反応とは平衡状態にあることが知られている。

【0042】

こうした阻害剤としては、以下の化合物(6)～(8)が挙げられる。

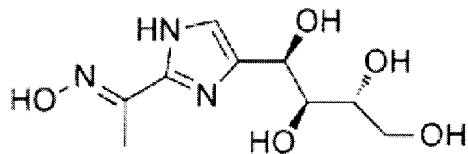
(6) (E) - 1 - (4 - ((1R, 2S, 3R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキシブチル) - 1H - イミダゾール - 2 - イル) エタノンオキシム (例えば、Bagdanoff, J. T., et al., J. Med. Chem., vol. 53, p. 8650 - 8662 (2010) を参照)

(7) (1R, 2S, 3R) - 1 - (2 - (イソキサゾール - 3 - イル) - 1H - イミダゾール - 4 - イル) ブタン - 1, 2, 3, 4 - テトラオール (Bagdanoffら、上述)

(8) 1 - (5 - ((1R, 2S, 3R) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロキシブチル) - 1H - イミダゾール - 2 - イル) エタノン (例えば、Cayman Chemical Item Number 13222 Cayman Chemical Com., Michigan, USA)

【0043】

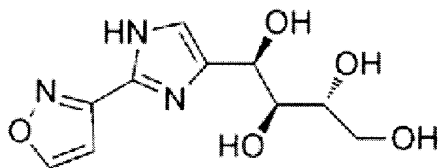
【化3】



(6)

20

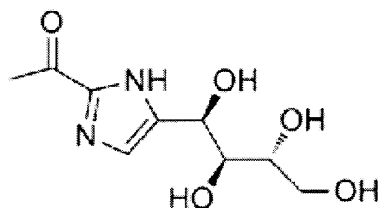
構造:



(7)

30

構造:



(8)

40

【0044】

本治療用製剤は、心筋障害治療のために用いることができる。本明細書において、心筋障害とは、心筋障害とは、冠動脈の狭窄や閉塞によって生じる、心筋への血流の減少又は停止に起因する傷害をいう。例えば、狭心症、不安定狭心症及び心筋梗塞が挙げられる。

50

心筋梗塞は、特に、重症大型心筋梗塞、及びそれに伴う心不全を含む。ここで、「心筋梗塞」とは、冠動脈の閉塞によってもたらされる心筋壊死をいう。また、「心不全」とは、十分量の血流を押し出す心機能の不全に原因する症候群をいい、心拍出量の低下とそれに伴う静脈圧の増大、またその結果として生じる種々の臨床症状が含まれる。心筋梗塞は、急性心臓死及び慢性心臓死を引き起こす原因となる。

【 0 0 4 5 】

本治療用製剤の適用対象である心筋障害は、急性心筋梗塞とすることが有利である。本治療用製剤は、発症後迅速に処置するのに好適な製剤であるからである。急性心筋梗塞の場合、死亡率は35～50%と高く、その死亡例の60～70%は発症後1～2時間以内の死亡である。また、初回発作の心筋壊死巣が大きい場合には、心筋梗塞を再発する危険性が高い。したがって、心筋梗塞の治療においては、発作が起きたときに迅速に処置することが求められ、壊死した心筋の大きさ、すなわち梗塞サイズを可及的小にとどめることが重要とされている。

10

【 0 0 4 6 】

また、本治療用製剤の適用対象である心筋障害は、重症大型心筋梗塞とすることが有利である。なかでも、心筋の左室リモデリングが進行する程度的心筋梗塞とすることが有利である。心筋梗塞の重症度判定には、種々の分類がある。そのような分類としては、例えば、時間的経過による分類、形態学的分類（心筋層内範囲、部位、壊死の大きさなど）、心筋の壊死形態、梗塞後の心室再構築、血行動態的分类（治療、予後などに関連する）、臨床的重症度による分類などが挙げられる。ここで、重症度が高く、より広範囲に心筋壊死に陥った心筋梗塞を特に「重症大型心筋梗塞」という。例えば、左冠動脈の近位部の完全閉塞が挙げられる。また、重症大型心筋梗塞では、心筋の左室リモデリングが進行し、心不全に陥るため生命予後は悪いことが知られている。心筋梗塞後の「左室リモデリング」とは、心筋梗塞後に生じる梗塞部位の非薄化による心機能低下の代償として起こる非梗塞部位の心筋細胞の肥大、間質（細胞外マトリックス）の増加、心内腔の拡大などの一連の変化を指す。心筋梗塞後の長期予後は、左室機能不全の程度と相関するため、左室リモデリングを抑制することは左室の機能を維持及び保存するために不可欠である。

20

【 0 0 4 7 】

本治療用製剤は、S1P R2活性化化合物を非傷害部位に投与する製剤である。ここで非傷害部位とは、心筋障害の傷害部位とな異なる部位をいう。本明細書において、心筋障害の傷害部位とは、心筋組織又は細胞において、外傷、炎症、疾患、虚血、壊死、腫瘍形成、又は加齢等を原因とした各種細胞及び組織との変性又は脱落によって失われた特定の部位を意味する。例えば、心筋における傷害部位は、心筋において血管の狭窄や閉塞によって血流が減少又は停止したことによって細胞や組織が損傷された部位が挙げられる。

30

【 0 0 4 8 】

本製剤は、傷害部位とは異なる部位、すなわち、非傷害部位に投与される。非傷害部位とは、上記した傷害部位以外の部位である。すなわち、本治療用製剤は、傷害部位とは異なる部位に投与することで、多能性幹細胞を移植することなく、傷害部位に対して内因性多能性幹細胞を集積させることができるものである。

【 0 0 4 9 】

投与部位としての非傷害部位は、特に限定するものではないが、心臓以外の部位であることが好ましい。したがって、例えば、一般的な製剤の投与経路に適用される投与部位であって局所としての心臓以外であればよい。

40

【 0 0 5 0 】

本治療用製剤は、経口投与のほか、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、髄腔内投与、舌下、経直腸、経膣、経鼻、吸入、経皮、口腔粘膜、インプラント等、非経口投与を意図した製剤形態を採ることができる。製剤形態としても、特に限定するものではないが、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、髄腔内投与については、注射剤などの注入剤等が挙げられる。また、経皮、口腔粘膜、インプラント等においては、パッチやフィルム等も可能である。

50

## 【0051】

本治療用製剤は、静脈投与製剤以外の製剤形態が好適であり、例えば、皮下投与製剤、筋肉内投与製剤、経皮製剤が好適である。なかでも、皮下注射剤や筋肉注射剤などの経皮的投与製剤が好適である。これらの製剤は、Muse細胞を血流中に動員するのに好適な製剤形態であるからである。例えば、皮下注射剤や筋肉注射剤の場合には、特に限定するものではないが、上腕部や臀部を投与部位とすることができる。

## 【0052】

本治療用製剤は、投与形態等に応じて、公知の製剤方法を利用して製造することができる。注射剤を調製する場合は、pH調節剤、緩衝剤、安定化剤、等張化剤、局所麻酔剤等を添加し、常法を利用して局所用注射剤を製造することができる。pH調製剤及び緩衝剤としては、例えば、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸ナトリウム等が挙げられる。安定化剤としては、例えば、ピロ亜硫酸ナトリウム、EDTA（エデト酸ナトリウム）、チオグリコール酸、チオ乳酸等が挙げられる。局所麻酔剤としては、例えば、塩酸プロカイン、塩酸リドカイン等が挙げられる。等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、ブドウ糖等が挙げられる。

10

## 【0053】

本治療用製剤に含めるS1PR2活性化化合物の濃度は、傷害部位における損傷の程度等によって適宜変更することができる。例えば、Muse細胞を血流に動員させ傷害部位に集積させるために有効なS1PR2活性化化合物の濃度は、特に限定するものではないが、例えば、1nM～100μMである。

20

## 【0054】

本治療用製剤の投与量は、心筋障害の重症度、発症経過日数、個体年齢等によっても異なるが、1mg/kg体重、日以上10mg/kg体重、日以下とし、こうした投与を、例えば、1回から適回数（例えば、10回以下程度、2回以上8回以下程度など）にわたって実施することができる。投与量は、3mg/kg体重、日以上8mg/kg体重、日以下であってもよいし、好ましくは4mg/kg体重、日以上6mg/kg体重、日以下であってもよい。また、例えば、急性心筋梗塞発症後においては、発症後24時間以内に少なくとも1回投与することが好ましい。

## 【0055】

本治療用製剤は、S1PR2活性化化合物を有効成分とし、心筋障害の非傷害部位に投与することにより、心筋障害を治療することができる。すなわち、本治療用製剤は、非傷害部位に投与しつつ、生体内に内在するMuse細胞及び/又は傷害時に生体内に誘導されるMuse細胞を傷害部位に集積させることができ、内因性のMuse細胞の再生能を利用して傷害部位を修復し、傷害の進行を抑制し又は傷害を低減させることができる。

30

## 【0056】

推論であって本開示を拘束するものではないが、本治療用製剤は、S1PR2活性化化合物の血中濃度を増大させることにより、骨髄中のMuse細胞などの内因性多能性幹細胞を、血流中に動員することができる。一旦、血流中に動員されたMuse細胞は、その遊走能に基づいて障害部位に集積するものと考えられる。本発明者の一部は、既に、S1PR2活性化化合物を遊走因子として用いてMuse細胞を傷害部位に集積させることを見出している。しかしながら、遊走因子は、その因子の濃度勾配に応じて、遊走因子高濃度側に被遊走要素（ここではMuse細胞）を誘導するものである。

40

## 【0057】

これに対して、本治療用製剤は、S1PR2活性化化合物を遊走因子として使用するものではない。その結果、本治療用製剤は、傷害部位でない非傷害部位にS1PR2活性化化合物を投与し、かつ内因性多能性幹細胞を傷害部位に集積させるものである。本治療用製剤は、S1PR2活性化化合物を傷害部位に投与しない点、非傷害部位に投与するのに内因性多能性幹細胞を傷害部位に集積させることができる点において、特許文献2に記載の医薬組成物によりも有利であるといえる。また、特許文献2等に接した当業者といえども、非傷害部位へのS1PR2活性化化合物によるMuse細胞の傷害部位への送達程度は、

50

当業者といえども予測することができないものである。また、このような用法及び用量により心筋障害を治療できることも想到しえないものである。

【0058】

(内因性多能性幹細胞を傷害部位へ送達するための非傷害部位投与製剤)

本開示の非傷害部位投与製剤(以下、単に本送達用製剤という。)は、スフィンゴシン-1-リン酸受容体2を活性化する化合物を有効成分とすることができる。本送達用製剤は、非傷害部位への投与により、内因性多能性幹細胞を傷害部位へ送達することができる。本送達用製剤における、S1PR2活性化化合物、非傷害部位については、既に本治療用製剤について説明した各種実施態様をそのまま適用できる。

【0059】

本送達用製剤は、特に、疾患等の適用対象を想定するものではない。生体内において傷害部位が発生しているような疾患や、傷害が発生しているようなあるいはそのような障害が予見されるような状態に適用される。ここでいう、傷害部位は、上記した心筋障害に限定されず、生体内における各種の臓器、器官、及び組織において、外傷、炎症、疾患、虚血、壊死、腫瘍形成、又は加齢等を原因とした各種細胞及び組織との変性又は脱落によって失われた特定の部位を意味する。

【0060】

(生体における傷害の診断を補助する方法又は生体における傷害の検査方法)。

本明細書によれば、血中のS1P量を測定する工程を備える、生体における傷害の診断を補助する方法又は生体における傷害の検査方法を提供することができる。この方法によれば、血中S1P量を測定することによって、生体のいずれかの箇所における損傷の発生に対して肯定的に判断するか又は肯定的な判断を補助することができる。血中におけるS1P量の増大は、Muse細胞の動員を意味している。すなわち、生体における要修復箇所の発生を意味しているからである。

【0061】

血中のS1P量は特に限定しないで、公知の方法、例えば、MS、HPLC、呈色(蛍光)法等の当業者に公知の方法により測定することができる。

【実施例】

【0062】

以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【実施例1】

【0063】

本実施例では、ウサギ心筋梗塞モデルについて、図1に示すプロトコールに基づき、S1Pを皮下注により投与し、血中Muse細胞及び梗塞領域について評価した。なお、本実施例におけるウサギを用いた実験プロトコールは、岐阜大学の動物実験に関する倫理委員会によって承認されたものであり、米国国立衛生研究所(NIH)によって刊行された「実験動物の管理と使用に関する指針」(1996年改定版)に沿って実施された。

【0064】

(ウサギ心筋梗塞モデルの作製)

日本白色種ウサギ(約2~3kg/匹)は、30mg/kgペントバルビタールナトリウムを用いて麻酔された。ウサギにおいて、連続的に動脈ガス分析を行い、動脈ガスを生理学的範囲に維持するように換気条件を適宜調整した。左頸動脈及び頸静脈にカニューレトし、動脈圧を監視した。3番目の肋間腔において左開胸後、心臓を露出させ、左室の外側前面の中央を下行する大冠動脈枝下で4-0絹糸結紮を行った。縫合糸の両末端に細いビニルチューブを通し、その縫合糸を引くことによって冠動脈枝を閉塞した。次に、モスキート止血鉗子を用いてこのチューブをクランプすることによって固定した。心筋虚血は、局所的チアノーゼ及び心電図の変化によって確認した。閉塞(虚血)時間は適宜調整される。縫合糸を開放後、危険領域全体での心筋の赤色への変化によって確認した(Yasudaら, Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol., 29

10

20

30

40

50

6 : H 1 5 5 8 - 1 5 6 5 , 2 0 0 9 を参照されたい)。

【 0 0 6 5 】

( S 1 P R 2 アゴニスト皮下投与による血中 M u s e 細胞及び心筋梗塞サイズの縮小効果 )

図 1 に示すプロトコールに基づき、ウサギにおいて、結紮による梗塞（虚血）時間を 30 分間（ヒトにおいては虚血 3 時間に対応する）とし、その後、縫合糸を開放し、再還流を開始した。再還流 2 4 時間後に、コントロール群は、生理食塩水を、S 1 P 投与群は、スフィンゴシン - 1 - リン酸受容体 2 に対するアゴニストである S I D 46371153（既述の化合物（1））を 5 m g / k g となるようにウサギの背中に筋肉内に対して注射を実施した。

10

【 0 0 6 6 】

( 血中 Muse 細胞の測定 )

再灌流から 4 8 時間後に、各群から血液を採取して、F A C S により S S E A 3 及び C D 4 4 陽性細胞をカウントした。結果を図 2 に示す。

【 0 0 6 7 】

図 2 に示すように、S 1 P 投与群は、コントロール群に対して約 1 . 5 倍の Muse 細胞が血中に動員されていることがわかった。

【 0 0 6 8 】

( 梗塞領域の評価 )

再還流から 1 4 日後に、各群における梗塞サイズの縮小効果を比較検討した。より具体的には、再灌流 1 4 日後のウサギをヘパリン（5 0 0 U / k g）処理し、過剰量のペントバルビタールを静脈注射することによって安楽死させた。心臓を摘出し、心筋組織における梗塞サイズの縮小効果をまた、マッソントリクローム染色により、組織化学的に検討した。

20

【 0 0 6 9 】

摘出した心臓を 1 0 % ホルマリン液中で固定し、パラフィン包埋後、房室輪が得られるように各標本から横断面方向に切片を作製した。その後、常法に従ってマッソントリクローム（M T）染色し、心筋梗塞領域を視覚化した。この M T 染色では、生細胞からなる組織では赤く染色され、一方、膠原線維化された組織は青白く、色が抜けたように観察される。結果を図 3 に示す。

30

【 0 0 7 0 】

図 3 上段に示すように、生理食塩水を投与されたコントロール群では、M T に染色されない膠原線維化された組織（梗塞部位）が広がっていることがわかる。一方、S 1 P 投与群の左室組織は、対照と比較して青白い部分が小さく、梗塞サイズが減少しているのがわかる。また、特徴的に、乳頭筋についても梗塞から回復していることが観察された。

【 0 0 7 1 】

また、図 3 の下段に示すように、コントロール群の梗塞領域は、3 3 . 4 6 % であったのに対し、S 1 P 投与群では 1 8 . 2 6 % であった。すなわち、約半分程度にまで梗塞領域が減少していることがわかった。

【 0 0 7 2 】

以上のことから、皮下から投与した S 1 P R 2 アゴニストは、Muse 細胞を血中に動員して、心臓の傷害部位に到達して梗塞領域を低減できることがわかった。

40

【 実施例 2 】

【 0 0 7 3 】

本実施例では、急性心筋梗塞発症後の血中 S 1 P の評価を行った。コントロール群（健常人群；6 3 人、平均年齢 6 2 . 4 ± 1 2 . 9、男性 3 8 人、女性 2 2 人）、冠動脈疾患（C A D）群（健常人群；6 3 人、平均年齢 6 2 . 4 ± 1 2 . 9、男性 3 8 人、女性 2 2 人）及び急性心筋梗塞（A M I）発症群（健常人群；6 3 人、平均年齢 6 2 . 4 ± 1 2 . 9、男性 3 8 人、女性 2 2 人）のうち、コントロール群 7 名、C A D 群 5 名及び A M I 群 7 人につき、血中濃度を測定した。A M I 群については、発症後 2 8 日まで定期的に血

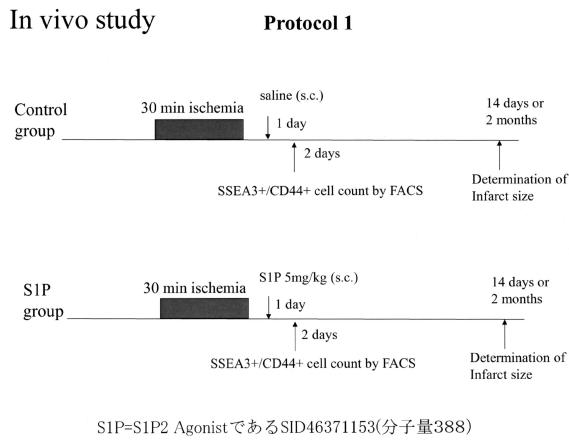
50

液を採取し、その最大値を平均した。なお、S 1 P は、L C / M S / M S を用いて一般的なプロトコルにより測定した。結果を図 4 に示す。

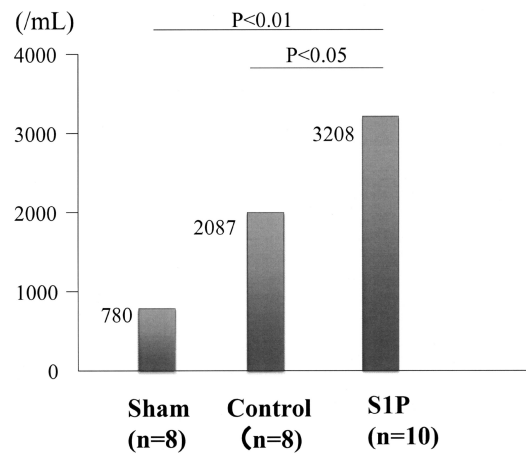
【 0 0 7 4 】

図 4 に示すように、A M I 群においては、血中 S 1 P 量が高値になっていることがわかった。したがって、血中 S 1 P は、生体における心筋梗塞などによる傷害部位の発生に対応して上昇することがわかった。

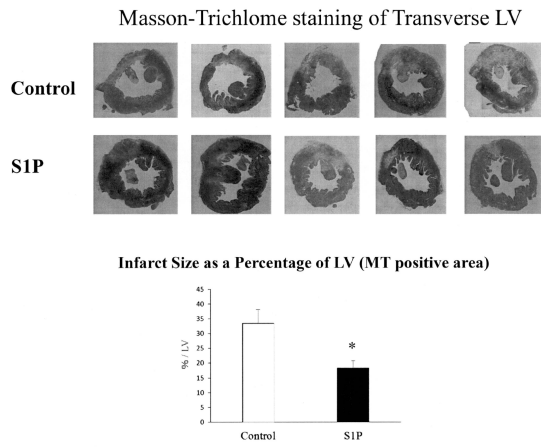
【 図 1 】



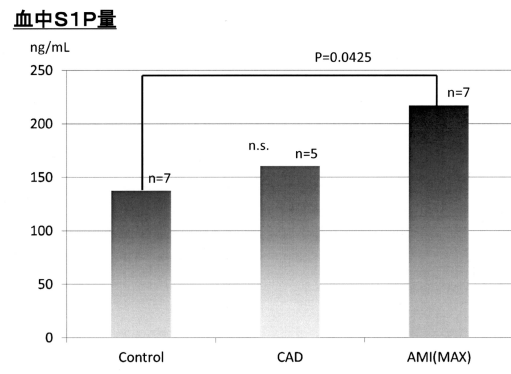
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



---

フロントページの続き

審査官 岩下 直人

(56)参考文献 国際公開第2014/133170(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K	3 1 / 6 6 1
A 6 1 P	9 / 1 0
C 1 2 N	5 / 0 7 7 5