

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-508758
(P2014-508758A)

(43) 公表日 平成26年4月10日(2014.4.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/145 (2006.01)	A 6 1 K 31/145	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/185 (2006.01)	A 6 1 K 31/185	
A 6 1 P 25/16 (2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁)

(21) 出願番号 特願2013-554768 (P2013-554768)
 (86) (22) 出願日 平成24年2月23日 (2012. 2. 23)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年10月21日 (2013. 10. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2012/050106
 (87) 国際公開番号 W02012/113079
 (87) 国際公開日 平成24年8月30日 (2012. 8. 30)
 (31) 優先権主張番号 2, 732, 440
 (32) 優先日 平成23年2月23日 (2011. 2. 23)
 (33) 優先権主張国 カナダ (CA)
 (31) 優先権主張番号 61/445, 577
 (32) 優先日 平成23年2月23日 (2011. 2. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

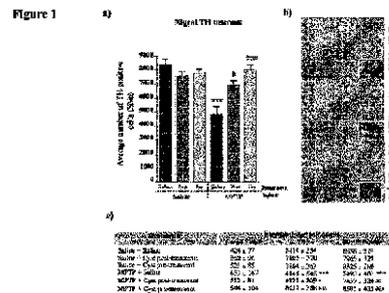
(71) 出願人 508063989
 ユニバルシテ ラバル
 カナダ国 ジー1ヴィー Oエイ6 ケベック、リュ デ ビブリオテークス、232 O、パヴィリオン デ サイエンス ド レデュカシオン、ヴィスーレクタラ フォー リサーチ アンド イノヴェイション
 (74) 代理人 110001601
 特許業務法人英和特許事務所
 (72) 発明者 チケッティ、フランチェスカ
 カナダ国 ジー2シー Oシー6 ケベック、ケベック、リュ デ バッフアロー、7309

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病を治療するためのシスタミン類似体

(57) 【要約】

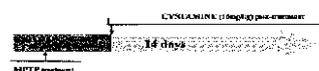
本発明は、パーキンソン病治療のためのシスタミン類似体の使用に関する。本発明はまた、シスタミン類似体及びシステインを含む組成物の使用にも関する。本発明はパーキンソン病の進行を改善するための方法に関し、該方法は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体又はシスタミン類似体の薬剂的に許容されるそれらの塩を、必要に応じて患者に投与することを含む。



PRE-TREATMENT SCHEDULE



POST-TREATMENT SCHEDULE



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者におけるパーキンソン病の進行を改善するための、治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の使用。

【請求項 2】

患者におけるパーキンソン病の進行を改善するための、治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の神経救出剤としての使用。

【請求項 3】

患者におけるパーキンソン病の進行を改善するための、治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の神経修復剤としての使用。

10

【請求項 4】

パーキンソン病患者の疲労を軽減するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

パーキンソン病患者の非運動系症状の重篤化を低減するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

パーキンソン病患者の機能低下を低減するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

パーキンソン病の臨床的進行を低減するための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

20

【請求項 8】

パーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 9】

患者が早期ステージのパーキンソン病患者である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

パーキンソン病患者が H o e h n 及び Y a h r の評価に従ったステージ I I I 又は I V の患者である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

30

【請求項 11】

パーキンソン病患者が H o e h n 及び Y a h r の評価に従ったステージ I I I の患者である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 12】

少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の治療上有効な量が体重あたり 1 日に約 0 . 1 ないし約 7 5 0 m g / k g の範囲である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 13】

少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の治療上有効な量が約 0 . 5 ないし約 6 0 m g / k g / 日の範囲である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

40

【請求項 14】

少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の治療上有効な量が約 1 ないし約 2 0 m g / k g / 日の範囲である、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 15】

少なくともひとつのシタミン類似体、又は薬剤的に許容されるその塩の治療上有効な量が、一単位剤形あたり 5 ないし 2 0 0 0 m g の有効成分を含む単位剤形によって投与されるように適合される、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の使用。

50

【請求項 16】

少なくともひとつのシスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩の治療上有効な量が、一単位剤形あたり10ないし1500mgの有効成分を含む単位剤形によって投与されるように適合される、請求項1～11のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 17】

少なくともひとつのシスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩の治療上有効な量が、一単位剤形あたり20ないし1000mgの有効成分を含む単位剤形によって投与されるように適合される、請求項1～11のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 18】

少なくともひとつのシスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩の治療上有効な量が、一単位剤形あたり50ないし700mgの有効成分を含む単位剤形によって投与されるように適合される、請求項1～11のいずれか一項に記載の使用。

10

【請求項 19】

パーキンソン病の進行を改善するための、少なくともひとつのシスタミン類似体及びシステイン又は薬剂的に許容されるそれらの塩を含む配合物。

【請求項 20】

シスタミン類似体及びシステインそれぞれが10：1ないし1：10の比で存在する、請求項19に記載の配合物。

【請求項 21】

シスタミン類似体及びシステインが1：1の比で存在する、請求項19に記載の配合物。

20

【請求項 22】

シスタミン類似体及び追加の薬剤が連続的に使用されるように適合される、請求項19、20、又は21に記載の配合物。

【請求項 23】

シスタミン類似体及び追加の薬剤が同時に使用されるように適合される、請求項19、20、又は21に記載の配合物。

【請求項 24】

少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩、及びシステイン又は薬剂的に許容されるその塩を含む医薬組成物。

30

【請求項 25】

シスタミン類似体及びシステインそれぞれが10：1ないし1：10の比で存在する、請求項24に記載の組成物。

【請求項 26】

シスタミン類似体及びシステインが1：1の比で存在する、請求項24に記載の組成物。

【請求項 27】

シスタミン類似体及び追加の薬剤が連続的に使用されるように適合される、請求項24、25、又は26に記載の組成物。

【請求項 28】

シスタミン類似体及び追加の薬剤が同時に使用されるように適合される、請求項24、25、又は26に記載の組成物。

40

【請求項 29】

シスタミン類似体がシステアミン、シスタミン、タウリンもしくはヒポタウリン、又は薬剂的に許容されるそれらの塩である、請求項1～18のいずれか一項に記載の使用、請求項24～28のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項19～23のいずれか一項に記載の配合物。

【請求項 30】

シスタミン類似体がシスタミンもしくはシステアミン、又は薬剂的に許容されるそれらの塩である、請求項1～18のいずれか一項に記載の使用、請求項24～28のいずれか

50

一項に記載の組成物、又は請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の配合物。

【請求項 31】

シスタミン類似体がシスタミン又は薬剤的に許容されるその塩である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用、請求項 24 ~ 28 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の配合物。

【請求項 32】

シスタミン類似体がシステアミン又は薬剤的に許容されるその塩である、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の使用、請求項 24 ~ 28 のいずれか一項に記載の組成物、又は請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の配合物。

【発明の詳細な説明】

10

【背景技術】

【0001】

今日、パーキンソン病 (PD) の治療の大半は対症療法的なものであり、疾病の進行の元となる神経細胞の変性を阻止するものではない。パーキンソン病及びハンチントン病におけるシスタミンの特性が、様々な動物モデルによって研究されてきた。ハンチントン病 (HD) の動物モデルにおいて、シスタミンは、ハンチントン病遺伝子を保有するマウスの寿命の延長や運動系の症状の軽減といった神経保護効果を示している (Dedeoglou et al. 2002; Karpur et al. 2002)。ハンチントン病タンパク質の変異型のような、タンパク質の凝集に關与する酵素であるトランスグルタミナーゼに対するシスタミンの阻害能が、*in vitro* 及び *in vivo* で証明されている (Green 1993; Jeitner et al. 2005; Wang et al. 2005)。脳内における脳由来神経栄養因子 (BDNF) の濃度の上昇もまた、このような神経細胞の保護効果の鍵となる要素の一つとして特定されてきた (Borrelli-Pages et al. 2006)。飲用水を通して投与された高用量のシスタミンは、ミトコンドリア機能に対する 1-メチル-4-フェニル-1, 2, 3, 6-テトラヒドロピリジン (MPTP) の酸化ストレス及び有害効果を軽減する (Stack et al. 2008)。シスタミン及び/又はシステアミンの効果は、パーキンソン病の MPTP マウスモデルにおいて報告されている (Sun et al. 2010, Tremblay et al. 2006; Stack et al. 2008; Gibrait et al. 2010)。

20

30

【0002】

シスタミンの代謝により、システアミンのみならず、ヒポタウリン及びタウリンも含む幾つかの中間体が産生される。シスタミン及びシステアミンはどちらも有機化合物であり、最初は放射線防護物質として記述された (Bacq and Beaumariage 1965)。システアミンはシステインの脱炭酸型であるが、代謝過程、特にクレブス回路での ATP の生成 (Leonardi et al. 2005) に關与するコエンザイム A の分解を通じた、全ての組織による恒常的な産生が主な供給源である (Pitari et al. 1992)。システインはほとんどのタンパク質の共通成分であるが (Lee et al. 2004)、そのチオールが酸化されやすく、ジスルフィド誘導体であるシスチンが誘導されるため、通常は血漿中のシステインの基礎濃度は低い。

40

【0003】

シスタミンの還元型であるシステアミン (2-アミノエタンチオール) は、シスチンの細胞内への蓄積による腎不全を引き起こす幼児期の疾患である、シスチン蓄積症の治療用に承認された (Dohil et al. 2009)。システアミンはハンチントン病のマウスモデルにおいて著しい有効性を示し (Borrelli-Pages et al. 2006)、かつその安全性が実証されていることから、その分子はこの疾患を患う患者のために開発が進められている (Dubinsky and Gray 2006)。

【0004】

最近、システアミン酒石酸水素塩 (CYSTAGON (登録商標)) による予備試験が、安全な治療用の用量を確立するため、ハンチントン病患者に対して行われた (Dubin

50

n s k y a n d G r a y , 2 0 0 6) 。 ハンチントン病患者 9 名が、単一施設における非盲検の第 I 相臨床試験に登録された。被験者は、1 日あたり 1 0 m g / k g 、かつ 1 週間ごとにさらに 1 0 m g / k g ずつ増加させたシステアミンによる治療を、最大用量 7 0 m g / k g まで、又は許容不可能な副作用 (悪心及び運動障害) が出現するまで受けた。この臨床試験により、ハンチントン病患者には 1 日あたり 2 0 m g / k g 用量のシステアミンが許容されると結論付けられた (D u b i n s k y a n d G r a y , 2 0 0 6) 。しかし、臨床的な有効性は示されなかった。このことが全てヒトに取り入れられるものではないとしても、ハンチントン病の動物モデルによって行われた研究により、有意な治療上の効果を達成するにはかなり高い用量のシスタミン又はシステアミンを要することが示された。さらに、システアミンは血液脳関門 (B B B) を通過できるが、脳におけるシステアミン又はその代謝産物の変動を検出するためにはより高用量のシスタミン又はシステアミン (i . p . 又は p . o .) が必要となる (B o u s q u e t e t a l . , 2 0 1 0) 。パーキンソン病の進行を改善するシスタミン及びシステアミンの有効性、及びそれらの脳への輸送特性については不明である。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

現存するパーキンソン病の治療法は主に症状への対応のために意図されており、これまでに疾病の進行を軽減させるための治療は得られていない。従って、パーキンソン病の進行率を改善できる治療薬の開発が必要とされている。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、パーキンソン病の進行を改善するためにシスタミン類似体を使用できることを初めて示した。

【0007】

本発明はパーキンソン病の進行を改善するための方法を提供するものであり、その方法は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体、薬剂的に許容されるその塩、すなわち本発明の組成物又は配合物を、必要としている患者に対して投与することを含んでいる。

30

【0008】

本発明は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体、薬剂的に許容されるその塩、すなわち本発明の組成物又は配合物を、必要としている患者に対してパーキンソン病の進行を改善するために使用することを提供するものである。

【0009】

本発明は、治療上有効な量の少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を、神経救出剤及び / 又は神経修復剤として、患者に対してパーキンソン病の進行を改善するために使用することを提供するものである。

【0010】

本発明は、少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を含み、かつシステイン又は薬剂的に許容されるその塩を含む、パーキンソン病の進行を改善するための配合物又は医薬組成物を提供するものである。

40

【0011】

本発明は、神経救出剤及び / 又は神経修復剤として少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩を含み、かつシステイン又は薬剂的に許容されるその塩を含む、パーキンソン病の進行を改善するための配合物又は医薬組成物を提供するものである。

【0012】

さらに別の態様によれば、本明細書に記載する薬剤を製造するための、シスタミン類似体、又は薬剂的に許容されるその塩、すなわち本発明の組成物又は配合物の使用が提供される。

50

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】黒質チロシン水酸化酵素陽性神経細胞におけるシスタミンの有益な効果を示した図である。a) 黒質緻密部 (SNpc) におけるチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置したMPTPマウスにおけるTH陽性神経細胞の総数が、生理食塩水+生理食塩水で処置した動物と比較して有意に減少することが明らかとなった ($p < 0.001$)。a) MPTP及びシスタミンによる前及び後処置マウスでは、生理食塩水処置動物と同等数のTH陽性神経細胞が示された。b) SNpcの顕微鏡写真は、生理食塩水、ならびにMPTP及びシスタミンによる後処置マウスにおけるクレシル染色されたTH陽性神経細胞の数が、MPTP及び生理食塩水による処置マウスと比較して増加している (生理食塩水に対して同程度である) ことを示す。c) の表に、クレシル及びTH陽性神経細胞の立体的細胞計数を要約する。下部のパネルに、前及び後処置のスケジュールを時系列で示す。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水+生理食塩水群との有意差： $** = p < 0.001$ 。MPTP+生理食塩水群との有意差： $\# = p < 0.05$ ； $\#\# = p < 0.01$ ； $\#\#\# = p < 0.001$ 。b)のスケールバー=400 μ m、挿入図=25 μ m。略語：Pre-Tx (MPTP及びシスタミンによる前処置)；Post-Tx (MPTP及びシスタミンによる後処置)。

10

【図2】黒質におけるNurr1 mRNAの発現におけるシスタミンの有益な効果を示した図である。a) SNpcにおけるNurr1 mRNAレベル (ドーパミン (DA) 表現型の発現及び維持に関与する遺伝子) のデンシトメトリーを用いた測定により、3つの対照群 (生理食塩水+生理食塩水；生理食塩水+シスタミン Pre-Tx、生理食塩水+シスタミン Post-Tx) 及びシスタミンにより処置したMPTP動物は同様の結果を示したが、生理食塩水により処置したMPTP動物のNurr1 mRNAレベルは有意に減少することが明らかとなった ($p < 0.01$)。b) SNpcにおけるレベルを示す顕微鏡写真 (矢印を参照) は、対照ならびにMPTP及びシスタミンによる後処置マウスのNurr1 mRNAレベルが、MPTP及び生理食塩水により処置されたマウスb)に比較して正常レベルにあることを示す。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水+生理食塩水群との有意差： $** = p < 0.01$ 。MPTP+生理食塩水群との有意差： $\# = p < 0.05$ ； $\#\# = p < 0.01$ 。b)のスケールバー=1mm。

20

30

【図3】黒質DAT陽性細胞におけるシスタミンの有益な効果を示した図である。DATトランスポーター (DAT) mRNAの発現を、*in situ* ハイブリダイゼーションにおいても明らかにした。a) SNpcにおけるDAT発現細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置したMPTPマウスにおける神経細胞の総数が、生理食塩水+生理食塩水で処置した動物と比較して有意に減少することが示された ($p < 0.001$)。a) MPTP及びシスタミンによる前及び後処置マウスでは、生理食塩水処置動物と同等数のDAT陽性細胞が示された。b) SNpcの顕微鏡写真はDAT mRNA発現細胞を示す。挿入図は、感光乳剤前の、DAT mRNAのオートラジオグラフィを表す (デンシトメトリーにより測定)。c) の表に、立体的細胞計数、及びSNpcにおけるDAT mRNA発現のデンシトメトリーによる測定を要約する。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水+生理食塩水群との有意差： $* = p < 0.05$ ； $*** = p < 0.001$ 。MPTP+生理食塩水群との有意差： $\# = p < 0.05$ ； $\#\# = p < 0.01$ 。b)のスケールバー=400 μ m、挿入図=500 μ m。

40

【図4】亜急性MPTPモデルにおける、黒質TH陽性細胞の減少の時間経過を示した図である。a) SNpcにおけるTH陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、最終のMPTP注射後7及び14日のTH陽性神経細胞の総数が、生理食塩水 ($p < 0.01$) 及びMPTP処置後1日の群に比較して有意に減少することが明らかとなったが ($p < 0.001$)、MPTP処置後1日の群に対しては神経細胞数の減少傾向のみが示された ($p =$

50

0.063)。b) SNpcの顕微鏡写真は、MPTP処置後7及び14日の群における、クレシル染色されたTH陽性神経細胞数の減少を表す。c)の表に、クレシル及びTH陽性神経細胞の立体的細胞計数を要約する。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。生理食塩水群との有意差： $** = p < 0.01$ 。b)のスケールバー = 400 μ m。

【図5】垂急性MPTPモデルにおける、Nurr1及びDAT mRNA発現の減少の時間経過を示した図である。デンストメトリーを用いたa) Nurr1及びb) DAT mRNA発現の測定により、両DAマーカーのSNpcにおけるレベルが、MPTPによる処置後24時間から有意に減少を始めていることが示された(それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.05$)。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。対照群との有意差： $** = p < 0.01$ 、 $* = p < 0.05$ 。

【図6】垂急性MPTPモデルにおける、黒質DAのアポトーシス過程の時間経過を示した図である。腹側中脳におけるa) BAX及びb) Bcl-2タンパク質レベルのウェスタンブロット分析。c) BAX/Bcl2の比は、最終のMPTP注射後24時間に有意に増大したことから($p < 0.05$)、MPTP送達のためのこの特定の投与計画では、この時点でアポトーシス過程は既に開始されていたことが示唆される。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。対照群との有意差： $* = p < 0.05$ 。

【図7】脳のシステアミンのレベルの増大を示した図である。大脳のシステアミンb)及びシステインc)のレベルを、蛍光検出を組み合わせたHPLCによって測定した。システアミン(2)ならびにシステイン(1)の標準溶液の分子構造及びHPLC溶出特性をAに示す。マウスに50 mg/kgのシスタミンを単回でi.p.注射して1時間後に屠殺すると、システアミンはこれに応答し、同時点で屠殺したビヒクルマウスと比較して有意に増大した($p < 0.05$)B。200 mg/kgの用量によってもまた、シスタミン注射後1時間及び3時間にシステアミンの有意な増大が引き起こされる($p < 0.01$)B。大脳におけるシステインのレベルは、用量及び灌流時間に関わらず安定であるC。データは平均(nmol/mgタンパク質) \pm S.E.M.として表す。 $* p < 0.05$ ； $** p < 0.01$ 。

【図8】脳のヒポタウリン及びタウリンのレベルが一定であることを示した図である。大脳のヒポタウリン(2)及びタウリン(1)の濃度を、UV検出を組み合わせたHPLCによって測定した。1 ng/mLのタウリン(1)又はヒポタウリン(2)を含む標準溶液の分子構造及びHPLC溶出特性をAに示す。脳において、ヒポタウリン(2)及びタウリン(1)は安定した量で観察された。データは平均(nmol/mgタンパク質) \pm S.E.M.として表す。

【図9】システイン存在下での、システアミンの脳への取り込みの増大を示した図である。in situでの大脳灌流技術を用いたシステアミン及びシステインの脳への取り込み、及びHPLC法による定量化を示す。Aは、in situ大脳灌流法の模式図である。適切な連結(青色の導管)後に100%の灌流液が右半球に到達するように、カテーテルは直接右内頸動脈に挿入するA。各分子のクリアランス係数(μ L/g/s)が示すように、システイン(1)及びシステアミン(2)の両方はBBBを通過できる。共灌流の際、システイン及びシステアミンクリアランス係数は有意に増大する。データは平均 \pm S.E.M.として表す(μ L/g/s)。 $* p < 0.05$ 。

【図10】シスタミンが、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいてドーパミン作動性神経細胞を救出することを示した図である。パネル(E)に実験の時間経過を示す。全てのマウスに対し、一側性線条体内への6-OHDA(4 μ g)又は同量のビヒクル(偽物質)の注射を行った。3日後、DA作動性の変性過程の進行中に、マウスを毎日10 mg/kgのシスタミン(又は生理食塩水)によって14日間処置した。最終のシスタミン注射後に、マウスに経心腔的灌流を24時間行い、死後の分析のために脳を処理した。(A)SNpcにおけるTH陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数が、偽物質+生

10

20

30

40

50

理食塩水で処置した動物に比較して有意に72%減少することが明らかとなった ($p < 0.001$)。シスタミンで処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数は、偽物質+シスタミンで処置した動物に比較して27%のみ減少することが示される ($p < 0.05$)。6-OHDA+生理食塩水群は、6-OHDA+シスタミン群とは有意に異なっていた ($p < 0.001$)。(B)及び(C)それぞれ、デンシトメトリーを用いたSNpcにおけるNurr1及びDAT mRNAレベルの測定。完全なDA作動性を示すこれら2つのさらなるマーカーでは、(A)におけるTHの染色で見られたものと同様のパターンが明らかとなり、シスタミンの神経救出特性が確認された。(D)HPLCによって行った線条体DAの含有量の測定は、対照マウスに比較して、生理食塩水で処置した6-OHDAマウスにおいてのみDAのレベルが有意に減少していることを示した ($p < 0.01$)。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ 。

【図11】マウスにおける6-OHDAを用いた線条体の損傷による行動障害を、シスタミンが逆転させることを示した図である。パネル(D)に実験の時間経過を示す。全てのマウスに対し、一側性線条体内への6-OHDA ($4 \mu\text{g}$)又は同量のピヒクル(偽物質)の注射を行った。3週間後、損傷が安定して変性が最大に達した際に、マウスを毎日 $10 \text{mg}/\text{kg}$ のシスタミン(又は生理食塩水)によって6週間処置した。実験の間を通し、3つの異なる時点、すなわちシスタミン処置開始前(手術後3週)、損傷発生後6週及び9週に、3つの異なる行動試験によってマウスを評価した。行動試験は、一側性のDA作動性の損傷範囲を示す、感覚運動の非対称性を評価するために選択した。(A)蓄積したアポモルヒネにより誘導される対側性回転を、ロータメーター装置によって測定した。6-OHDAによる一側性の損傷によって誘導された損傷後3、6及び9週の対側性回転の増加は、手術後6及び9週間のシスタミン処置によって有意に減少した ($p < 0.05$)。(B)ステップ試験により、歩みを調節するパーセンテージが、対側の前足において減少(同側に比較して)することが明らかとなった。(C)円筒試験では肢の非対称的な使用もまた示され、ここでは6-OHDA損傷マウスが、偽物質により処置したマウスに比較して、手術後3週、6週及び9週に対側性接触の有意な減少を示した。この非対称性は、6-OHDA損傷マウスを、損傷後6及び9週にシスタミンで処置した場合には観察されなかった。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散分析法を用いて行った。* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ 。

【図12】シスタミンが、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいて、ドーパミン作動性の黒質系の幾つかの状況を回復させ、かつ線条体のカテコールアミン作動性の量及び動態を変化させることを示した図である。パネル(D)に実験の時間経過を示す。図11に示すように、全てのマウスに対して一側性線条体内への6-OHDA ($4 \mu\text{g}$)又は同量のピヒクル(偽物質)の注射を行い、かつ3週間後に開始したシスタミン(又は生理食塩水)による処置を6週間行った。最終のシスタミン注射後に、マウスに経心腔的灌流を24時間行い、死後の分析のために脳を処理した。(A)SNpcにおけるTH陽性神経細胞の立体的な細胞計数により、生理食塩水で処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数が、偽物質+生理食塩水で処置した動物に比較して有意に93%減少することが明らかとなった ($p < 0.001$)。シスタミンで処置した6-OHDAマウスのTH陽性神経細胞の総数は、偽物質+シスタミンで処置した動物に比較して65%のみ減少することが示される ($p < 0.001$)。6-OHDA+生理食塩水群は、6-OHDA+シスタミン群とは有意に異なる ($p < 0.01$)。(B)HPLCによって測定した、6-OHDA損傷マウスにおけるDAレベルは、生理食塩水及びシスタミンで処置した動物について、それぞれ88%及び84%減少した ($p < 0.001$)。シスタミンは、破壊された線条体のDA量を有意に回復させなかった。(C)しかしながらシスタミンは、行動による損傷評価試験と有意に関連する(データ未提示)生理食塩水によって処置した6-OHDAマウスと比較して、DAの代謝回転を正常化する強い傾向を発揮した。値は平均 \pm S.E.M.として表す。統計解析は一元配置分散

10

20

30

40

50

分析法を用いて行った。 * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0014】

使用及び方法

一実施形態によれば、シスタミン類似体及び薬剂的に許容されるその塩は神経救出及び/又は神経回復剤として使用できる。この神経救出/神経回復活性は、神経保護剤の活性とは区別できる。

【0015】

本明細書で用いられる「神経保護剤」により、変性過程で残された「健常」神経細胞を保護できる。従って、神経保護剤は診断時に投与され得ることが理解される。

10

【0016】

本明細書で用いられる「神経救出剤」により、損傷したが死んではいない神経細胞の神経変性過程を、機能的回復を有するか又は有さない状態で停止できる。従って、神経救出剤は可能な限り早期に投与する必要があるが、PDの診断後であっても投与できることが理解される。

【0017】

本明細書で用いられる「神経回復剤」により、損傷した神経細胞の機能的及び/又は構造的回復ならびに再生によって機能を再確立できる。従って、神経回復剤は診断後に最大の有効性を示し得ることから、PDに対する臨床での使用に大きく関連することが理解される。

20

【0018】

さらなる実施形態によれば、シスタミン類似体及び薬剂的に許容されるその塩は、パーキンソン病の進行を改善するために使用できる。

【0019】

一実施形態によれば、「パーキンソン病の進行を改善する」ことはa) 損傷したが死んではいない神経細胞における抗アポトーシス作用による、機能的回復を有するか又は有さない状態での神経変性過程の減少；及び/又はb) 機能的及び/又は構造的回復ならびに再生により特徴付けられる。

【0020】

さらなる実施形態によれば、「パーキンソン病の進行を改善する」ことは以下の機構の一つによって特徴付けられる：

30

a) 損傷したが死んではいない神経細胞における抗アポトーシス作用による、機能的回復を有するか又は有さない状態での神経変性過程の減少；及び/又は

b) 損傷した神経細胞の機能的及び/又は構造的回復ならびに再生、及び/又は

c) 神経発生の促進。

【0021】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病の進行は総パーキンソン病統一スケール(総UPDRS)スコアによって定量化され、総UPDRSスコアの増加はパーキンソン病の症状の進行を表し、かつ期間を通しての総UPDRSスコアの増加はパーキンソン病の進行率を表す。例えば、Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R et al. (2008) Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. Mov Disord 23: 2129-2170を参照されたい。

40

この方法のさらに別の実施形態によれば、該期間はシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩の投与開始後12、24、又は36週である。

50

【0022】

本明細書で用いられるパーキンソン病患者のステージは、Hoe hn及びYahrによって記載された、症状に従った以下の5段階の異なるステージである（Hoe hn M M, Yahr M D, Parkinsonism: onset, progression and mortality. Neurology 1967, 17: 427-42）。

ステージI：（軽度又は早期の疾病）：症状は身体の片側のみに影響する。

ステージII：身体の両側が影響されるが、姿勢は正常を保つ。

ステージIII：（中程度の疾病）：身体の両側が影響され、かつ起立及び歩行の間に軽度の不均衡がみられるが、患者はなお自立している。

ステージIV：（進行した疾病）：身体の両側が影響され、かつ起立及び歩行の間に無力な不安定性が見られる。このステージの患者は相当な援助を必要とする。

ステージV：重篤かつ完全に進行した疾病。患者はベッド又は椅子で過ごすように制限される。

【0023】

本明細書で用いられる、「早期ステージのパーキンソン病患者」は、Hoe hn及びYahrによって定義されたパーキンソン病のステージI又はIIにあり、かつ対症的な抗パーキンソン病療法を必要としないパーキンソン病患者である。一実施形態によれば、このようなパーキンソン病患者は対症的な治療を少なくとも次の9か月間必要としない。早期ステージのパーキンソン病患者は、関連する試験の実施などにより同定され得る。

【0024】

一実施形態によれば、患者は早期ステージのパーキンソン病患者である。

【0025】

さらに別の実施形態によれば、早期ステージのパーキンソン病患者は、Hoe hn及びYahrの評価に従ったステージIの患者である。

【0026】

さらに別の実施形態によれば、早期ステージのパーキンソン病患者は、30未満、25未満、23未満、21未満、又は20未満のUPDRS総スコアを有する患者である。

【0027】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoe hn及びYahrの評価に従ったステージI、II、III、IV又はVの患者である。

【0028】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoe hn及びYahrの評価に従ったステージIII、IV又はVの患者である。

【0029】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoe hn及びYahrの評価に従ったステージIII又はIVの患者である。

【0030】

さらに別の実施形態によれば、パーキンソン病患者は、Hoe hn及びYahrの評価に従ったステージIIIの患者である。

【0031】

本発明は、

パーキンソン病患者の疲労を減少させるための；

パーキンソン病患者の非運動系症状の重症度を低下させるための；

パーキンソン病患者の機能低下を減少させるための；

疾病の臨床的進行を低減させるための；もしくは

疾病の臨床的進行を遅延させるための使用又は方法に関する。

【0032】

対象の発明はさらにパーキンソン病を呈する患者を治療するための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病を呈する患者の同定、及びそのように同定された患者に、患者を治

10

20

30

40

50

療するために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【0033】

本発明は、患者におけるパーキンソン病の進行を遅延させるか又は低減するための方法に関し、該方法は、患者に治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩、本発明の組成物又は配合物を投与することを含む。

【0034】

本発明は、患者におけるパーキンソン病の進行を遅延させるか又は低減するための、治療上有効な量の少なくともひとつのシタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩、本発明の組成物又は配合物の使用に関する。

10

【0035】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

【0036】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための方法を提供し、該方法は、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を患者に投与することを含む。

【0037】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

20

【0038】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための方法を提供し、該方法は、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を患者に投与することを含む。

【0039】

対象の発明はさらに、ステージ I、II、III、IV 又は V (Hoe hn 及び Y a h r の評価に従う) のパーキンソン病患者を治療するための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病を呈する患者の同定、及びそのように同定された患者に、患者を治療するために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を定期的に投与することを含む。

30

【0040】

対象の発明はさらに、パーキンソン病の初期兆候を呈する患者の治療のために使用する、シタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を提供する。

【0041】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者におけるパーキンソン病の進行率低下のために使用する、薬剤的に有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を含む医薬組成物を提供する。

40

【0042】

対象の発明はさらに、パーキンソン病の初期兆候を呈する患者を治療するための、治療上有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

【0043】

対象の発明はさらにパーキンソン病の初期兆候を呈する患者を治療するための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病の初期兆候を呈する患者の同定、及びそのように同定された患者に、患者を治療するために有効な量のシタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を定期的に投与することを含む。

50

【 0 0 4 4 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるために使用する、シスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物もしくは配合物を提供する。

【 0 0 4 5 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるための、治療上有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物の使用を提供する。

【 0 0 4 6 】

対象の発明はさらに初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるための方法を提供し、該方法は、患者を初期ステージのパーキンソン病患者であると同定すること、及びそのように同定された患者に、疲労を減少させるために有効な量のシスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩を定期的に投与することを含む。

10

【 0 0 4 7 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための方法を提供し、該方法は、患者を初期ステージのパーキンソン病患者であると同定すること、及びそのように同定された患者に、非運動系症状の重症度を低下させるために有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【 0 0 4 8 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者の疲労を減少させるための方法を提供し、該方法は、初期ステージのパーキンソン病患者に、疲労を減少させるために有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

20

【 0 0 4 9 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者における非運動系症状の重症度を低下させるための方法を提供し、該方法は、初期ステージのパーキンソン病患者に、非運動系症状の重症度を低下させるために有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

【 0 0 5 0 】

対象の発明はさらに、パーキンソン病患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるための方法を提供し、該方法は、パーキンソン病患者に、該患者におけるパーキンソン病の臨床的進行を遅延させるために有効な量のシスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を定期的に投与することを含む。

30

【 0 0 5 1 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者におけるパーキンソン病の進行率低下のために使用する、シスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を提供する。

【 0 0 5 2 】

対象の発明はさらに、初期ステージのパーキンソン病患者における機能低下を減少させるために使用する、シスタミン類似体若しくは薬剤的に許容されるその塩、又は本発明の組成物若しくは配合物を提供する。

40

【 0 0 5 3 】

医薬組成物及びシスタミン類似体

一態様によれば、シスタミン類似体はシステアミン、シスタミン、タウリン若しくはヒポタウリン、又は薬剤的に許容されるそれらの塩である。

【 0 0 5 4 】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシスタミン若しくはシステアミン、又は薬剤的に許容されるそれらの塩である。

【 0 0 5 5 】

50

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシステアミン酒石酸水素塩である。

【0056】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシステアミン塩酸塩である。

【0057】

さらなる態様によれば、シスタミン類似体はシスタミン二塩酸塩である。

【0058】

別の態様によれば、少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩、及び少なくともひとつの薬剂的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

【0059】

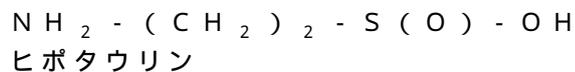
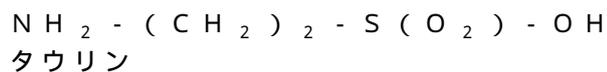
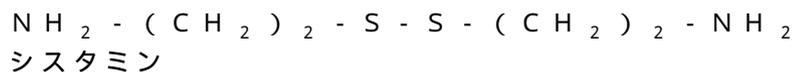
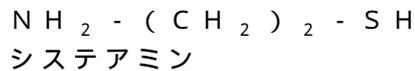
別の態様によれば、シスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩及び1以上の追加の薬剤、例えばプロモクリプチン、ベンゾトロピン、レボドパ、ロビニロール、プラミペキソール、ロチゴチン、カベルゴリン、エンタカポン、トルカポン、アマンタジン、セレギリン及びラサギリンを含む配合物が提供される。

【0060】

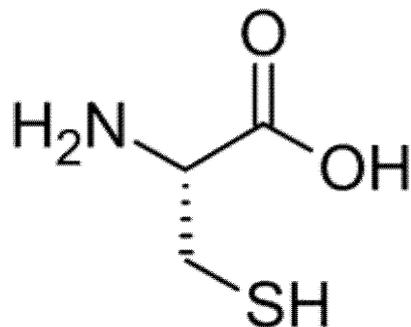
さらに別の態様によれば、患者におけるパーキンソン病の進行を改善する薬剤を製造するための、シスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩、本発明の組成物又は配合物の使用が提供される。

【0061】

さらなる実施形態によれば、本発明の化合物は以下の式：



【化1】



L-システイン

により表されるか、又は薬剂的に許容されるそれらの塩である。

【0062】

シスタミン類似体又は薬剂的に許容されるその塩は、当該技術分野において公知の方法によって得ることができる。化合物は様々な供給源、例えばSigma-Aldrich、米国ミズーリ州セントルイスから市販されている。

10

20

30

40

50

【0063】

一実施形態によれば本発明は、本明細書に記載する少なくともひとつのシスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩を含み、かつ少なくともひとつの追加の薬剤をさらに含む医薬組成物を提供し、ここで該追加の薬剤とはシステインである。

【0064】

一実施形態によれば本発明は、本明細書に記載する少なくともシスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩を含み、かつ少なくともひとつの追加の薬剤をさらに含む医薬組成物を提供し、ここで該追加の薬剤とはL-システインである。

【0065】

別の実施形態によれば、本明細書に記載する少なくともひとつのシスタミン類似体、及び1以上の追加の薬剤を含む配合物が提供される。

10

【0066】

一実施形態によれば、該追加の薬剤とはシステインである。

【0067】

一実施形態によれば、該追加の薬剤とはL-システインである。

【0068】

一実施形態によれば、シスタミン類似体及びシステインは、シスタミン類似体及びシステインそれぞれが10:1ないし1:10の比で存在する。さらなる実施形態によれば、シスタミン類似体及びシステインが1:1の比で存在する。

【0069】

配合物の一実施形態によれば、シスタミン類似体及び追加の薬剤は、連続的に使用されるように適合される。

20

【0070】

配合物の別の実施形態によれば、シスタミン類似体及び追加の薬剤は、同時に使用されるように適合される。

【0071】

上記の配合物は、医薬製剤の形態で使用するために都合のよいものであってよく、従って上記の配合物を薬剤的に許容される担体と共に含む医薬製剤が、本発明のさらなる態様を構成する。

【0072】

本発明の方法又は本発明の配合物において使用する個々の成分は、別々又は組み合わせた医薬製剤によって、連続的又は同時に投与されてよい。

30

【0073】

一実施形態によれば本発明は、薬剤を製造するための、本明細書に記載した化合物、組成物又は配合物の使用を提供する。

【0074】

他に記載のない限り、本明細書に示される構造は、該構造の全ての異性体（例えば鏡像異性体、ジアステレオマー、及び幾何異性体（又は配座異性体））；例えば各不斉中心のR及びS立体配置、（Z）及び（E）二重結合異性体、ならびに（Z）及び（E）配座異性体を含むことも意図される。従って、本化合物の単一の立体化学異性体、ならびに鏡像異性体、ジアステレオマー、及び幾何異性体（又は配座異性体）の混合物も本発明の範囲内である。単一の光学異性体又は鏡像異性体は、キラルHPLC、酵素による変換、及びキラル補助剤のような当該技術分野において公知の方法によって得ることができる。

40

【0075】

一実施形態によれば、適用可能な場合に、シスタミン類似体又はシステインは、対応する立体異性体を少なくとも75%、85%、90%、95%、97%及び99%含まない、単一の立体異性体の形態で提供される。

【0076】

薬剤的に許容されるシスタミン類似体又はシステインの塩もまた提供される。薬剤的に許容される化合物の塩とは、薬剤的に許容される無機及び有機の酸ならびに塩基に由来す

50

るものを意味する。適切な酸として、塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、過塩素酸、フマル酸、マレイン酸、リン酸、グリコール酸、乳酸、サリチル酸、コハク酸、p-トルエンスルホン酸、酒石酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、安息香酸、マロン酸、2-ナフタレンスルホン酸及びベンゼンスルホン酸が挙げられる。その他の酸、例えばシュウ酸はそれ自体が薬剂的に許容されるものではないが、シスタミン類似体及び薬剂的に許容されるそれらの酸付加塩を得るための中間体として有用であり得る。

【0077】

アミノ酸に由来する塩もまた含まれる（例えばL-アルギニン、L-リジン）。

【0078】

塩基に由来する塩には、アルカリ金属類（例えばナトリウム、リチウム、カリウム）及びアルカリ土類金属類（例えばカルシウム、マグネシウム）が挙げられる。

【0079】

以下、シスタミン類似体又はシステインに言及する際には、化合物及び薬剂的に許容されるその塩も含む。

【0080】

一実施形態によれば、塩は酒石酸水素塩である。

【0081】

一実施形態によれば、塩は塩酸塩である。

【0082】

薬剂的に許容される塩に関しては、その開示が参照により本明細書に取り込まれる、Berger et al., *Pharmaceutical Salts*, J. of Ph. Sci., vol. 66, no. 1, January 1977, pp. 1-19、の表1に示される、FDAに承認された市販の塩のリストも参照されたい。

【0083】

当業者は、化合物は異なった多形として存在し得ることを理解するであろう。当該技術分野において公知であるように、多形性は、1を超えて異なる結晶へと結晶化する化合物の能力、又は「多形性の」種である。多形は少なくとも2の異なる配置による化合物の固体の結晶相、又はその化合物分子の固体の状態での多形である。いずれかの所定の化合物の多形は同一の化学式又は組成物によって定義されるが、2つの異なる化学化合物の結晶構造としての化学構造において異なる。

【0084】

当業者はさらに、本発明に従った化合物が、異なる溶媒和物の形態、例えば水和物として存在し得ることを理解するであろう。シスタミン類似体又はシステインの溶媒和物は、結晶化過程の間に、溶媒分子が化合物分子の結晶性の格子構造内に取り込まれる際にも形成され得る。

【0085】

他に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。加えて、材料、方法、及び実施例は単なる例示であり、限定を意図するものではない。

【0086】

本発明の目的のために、化学元素は、元素周期表、CAS版、*Handbook of Chemistry and Physics*, 75th Edに従って同定した。さらに、有機化学の一般的原理は"*Organic Chemistry*", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, 及び"*March's Advanced Organic Chemistry*", 5th Ed., Ed.: Smith, M.B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001に記載される。

【0087】

50

10

20

30

40

50

加えて、他に記載のない限り、本明細書に示されるシスタミン類似体又はシステインは、同位体が濃縮された1以上の原子の存在下においてのみ異なる化合物を含むことも意図される。例えば、1以上の水素原子が重水素もしくはトリチウムによって置換されているか、又は1以上の炭素原子が、 ^{13}C もしくは ^{14}C が濃縮された炭素によって置換されているシスタミン類似体又はシステインは、本発明の範囲内である。このような化合物は、例えば分析用ツール、生物学的アッセイのプロープ、又は改良された治療用の特性を有する化合物として有用である。

【0088】

治療に用いるために必要とされるシスタミン類似体の量は、選択される特定の化合物によってのみではなく、投与経路、治療が必要とされる状態の性質、ならびに患者の年齢及び状態によっても異なる可能性があり、最終的には担当医師の決定によるであろうことが理解され得る。しかしながら一般的に適切な用量は、体重あたり1日に約0.1ないし約750 mg/kgの範囲、例えば0.5ないし60 mg/kg/日の範囲、又は例えば1ないし20 mg/kg/日の範囲であり得る。

10

【0089】

所望の用量は、単一用量、又は適切な間隔で投与される分割用量、例えば1日あたり2, 3, 4、又はそれ以上の用量によって好都合に提供されてよい。

【0090】

シスタミン類似体は単位剤形によって好都合に投与され、例えば一単位剤形あたり5ないし2000 mg、10ないし1500 mg、好都合には20ないし1000 mg、最も好都合には50ないし700 mgの有効成分が含まれる。一実施形態によればシスタミン類似体は、600 mgの単位剤形によって1日あたり2回、好都合に投与される。

20

【0091】

シスタミン類似体又は薬剤的に許容されるその塩を、パーキンソン病に対して有効な第2の治療薬と併用する場合、各化合物の用量は、該化合物を単独で用いる際と同じか、又は異なってよい。当業者は適切な用量を容易に理解するであろう。

【0092】

治療法において使用する際、シスタミン類似体は未精製の化学物質として投与されてもよいが、有効成分は医薬組成物として提供されることが好ましい。従って本発明はさらに、シスタミン類似体又は薬剤的に許容される本発明の塩を含む医薬組成物を、1以上の薬剤的に許容される担体と共に、かつ任意にその他の治療用及び/又は予防用成分と共に提供する。単数又は複数の担体は、製剤のその他の成分と適合し、かつそのレシピエントに対して有害ではないという意味で「許容可能」でなければならない。

30

【0093】

医薬組成物として、経口、経直腸、経鼻、局所（経頬及び舌下を含む）、経皮、経膈、又は非経口（筋肉内、皮下、及び静脈内を含む）投与に適したものの、又は吸入もしくは吹送による投与に適した形態が挙げられる。適切な場合には、組成物は別々の用量単位で好都合に投与されてよく、かつ薬学の技術分野において公知であるいずれかの方法によって調製されてよい。全ての方法は、有効成分を液体担体もしくは微粉化した固体担体又は両方と合わせる工程、及び次に必要に応じて産物を所望の組成物に成形する工程を含む。

40

【0094】

経口投与に適した医薬組成物は、それぞれが所定量の有効成分を粉末又は顆粒として、溶液として、懸濁液又はエマルジョンとして含む、カプセル、カシェ剤又は錠剤のような別々の単位として好都合に提供されてよい。有効成分はまた、ポーラス、舐剤又はペーストとして提供されてもよい。経口投与のための錠剤及びカプセルは、結合剤、注入剤、潤滑剤、崩壊剤、又は湿潤剤のような従来賦形剤を含んでよい。錠剤は、当該技術分野において公知の方法によってコートされてもよい。経口用液剤は、例えば水性又は油性の懸濁液、溶液、エマルジョン、シロップもしくはエリキシル剤の形態であってよいが、又は使用前に水もしくはその他の適したビヒクルによって構成するための乾燥製品として提供されてもよい。このような液剤は、懸濁剤、乳化剤、非水性ビヒクル（食用油を含み得る

50

)、又は保存料のような従来 of 添加物を含んでもよい。

【0095】

シスタミン類似体は非経口投与（例えば注射、例えばボーラス投与又は持続点滴による）のために処方されてよく、かつ保存料を添加したアンプル、プレフィルドシリンジ、少量点滴、又は複数回用量用容器内での単位用量の形態として提供されてよい。組成物は油性もしくは水性ビヒクル中の懸濁液、溶液、又はエマルションのような形態であってよく、かつ懸濁剤、安定剤及び/又は分散剤のような処方用薬剤を含んでよい。あるいは有効成分は、無菌固体の無菌的な分離によって、又は使用前に適切なビヒクル、例えば発熱物質を含まない無菌水によって構成するための、溶液からの凍結乾燥によって得た粉末の形態であってよい。

10

【0096】

表皮への局所投与のために、シスタミン類似体は軟膏、クリームもしくはローション、又は経皮パッチとして処方されてよい。このような経皮パッチは、リナロール、カルバクロール、チモール、シトラール、メントール及び ϵ -アネトールのような浸透促進剤を含んでよい。軟膏及びクリームは、例えば適切な増粘剤及び/又はゲル化剤を添加した水性又は油性の基剤と共に処方されてよい。ローションは水性又は油性の基剤と共に処方されてよく、かつ一般的には1以上の乳化剤、安定剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、又は着色料も含み得る。

【0097】

口中への局所投与に適した組成物として、通常はスクロース及びアカシア又はトラガカントである、香味の付いた基剤中の有効成分を含む舐剤；ゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシアのような不活性基剤中の有効成分を含むトローチ；及び適切な液体担体中の有効成分を含む口腔洗浄薬が挙げられる。

20

【0098】

直腸内投与に適した、担体が固体である医薬組成物は、例えば単位用量坐薬として提供される。適切な担体として、ココアバター及び当該技術分野で通常用いられるその他の材料が挙げられ、坐薬は、有効化合物を軟化もしくは融解した単数又は複数の担体と混合し、続いて冷却後に鑄型で成形することによって、好都合に形成されてよい。

【0099】

膈内投与に適した組成物は、有効成分に加えて、その適切性が当該技術分野において公知であるような担体を含むベッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレーとして提供されてよい。

30

【0100】

経鼻投与のために、化合物又は配合物は液体スプレーもしくは分散性の粉末として、又は液滴の形態で使用してよい。液滴は、1以上の分散剤、可溶化剤又は懸濁剤を含む、水性又は非水性の基剤と共に処方されてよい。液体スプレーは、加圧バックから好都合に送達される。

【0101】

吸入による投与のために、化合物又は配合物は、吹送器 (insufflator)、噴霧器もしくは加圧バック、又はエアロゾルスプレー送達用のその他の好都合な手段から好都合に送達される。加圧バックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又はその他の適切なガスのような、適切な噴霧剤を含んでよい。加圧エアロゾルの場合に、投与量単位は、定量を送達するためのバルブを用いた調節によって決定されてよい。

40

【0102】

あるいは、吸入又は吹送による投与のために、化合物又は配合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合物とラクトース又はデンプンのような適切な粉末基剤との粉末混合物の形態であってよい。粉末組成物は、例えば、吸入器又は吹送器 (insufflator) を用いてそこから粉末が投与され得る、カプセルもしくはカートリッジ、又は例えばゼラチンもしくはプリスターパックによる単位剤形として提供されてよい。

50

【0103】

所望により、有効成分の持続性又は改変された放出が為されるように適合させた上記組成物を用いてよい。システアミン製剤の例は、例えば米国特許出願公開第20090076166号に記載されている。

【0104】

驚くべきことに本発明者らは、病変を引き起こす毒素であるMPTPよりも前及び後にシスタミンを投与した際、パーキンソン病の動物において有益な効果をもたらすことを見出した。本発明者らは、開始された神経変性過程がシスタミンによって覆されることを見出した。

実施例に記載するように、MPTP 20mg/kgの7回i.p.注射による5日投与計画に従ってマウスに亜急性中毒を起こし、シスタミン 10mg/kgを、1)MPTP注射開始の2日前、又は2)最終のMPTP投与の24時間後のいずれかから、毎日i.p.投与して、傷害後14日間これを続けた。

試験終了時に死後の分析を行って、ドーパミン作動性(DA作動性)の系の状態、さらに詳細にはパーキンソン病を標的とし系の状態について評価した。驚くべきことに本発明者らは、黒質線条体系の障害後に開始した(MPTP処置後24時間)MPTP処置マウスへのシスタミンのi.p.投与(10mg/kg/日)が、TH免疫反応性細胞($p < 0.05$)、DAT mRNA発現細胞($p < 0.05$)の数の立体的計数、及び黒質Nurr1 mRNAレベル($p < 0.05$)によって評価したように、黒質のDA作動性神経細胞数を有意に回復させたことを見出した。

【0105】

本発明者らはまた、シスタミンが、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいてドーパミン作動性神経細胞を救出することも見出した。

本明細書の実施例にさらに示すように、シスタミンは、マウスにおける6-OHDAを用いた線条体の損傷による行動障害を逆転させ、パーキンソン病の一側性線条体6-OHDAマウスモデルにおいて、ドーパミン作動性の黒質系の幾つかの状況を回復させ、かつ線条体のカテコールアミン作動性の量及び動態を変化させる。本発明者らは、シスタミン化合物の役割が、既存の神経細胞を保存することのみに限定されるものではないことを見出した。化合物はまた、促進されたアポトーシス過程を逆転させることで、損傷した神経細胞を、起こりつつある変性から救出することもできる。

【0106】

いずれの特定の理論にも制約されるものではないが、本発明者らはシステアミンが、シスタミンの全身投与後の鍵となる向神経活性化合物であると考え。システアミン、システイン、ヒポタウリン及びタウリンを含む、HPLC測定を通して検討した分子の中で、システアミンは、未処置マウスへの50mg/kg及び200mg/kgの単回i.p.注射後に唯一、脳において有意に増加したことが見出された。対照的に、システイン、ヒポタウリン及びタウリンのレベルは未変化のままであるか、又は検出閾値未満であった。加えて本発明者らは、*in vivo*にて著しい量のシステアミンがBBBを横断することを示した。これらの知見は、システアミンの神経薬理学及びその臨床的関連性へのさらなる支持に関する重要な情報を提供する。

【0107】

BBBは大多数の潜在的向神経活性化合物の臨床応用に対する主要な障壁であり、シスタミンのどの代謝産物が治療上の効果を発揮するかを決定する際に考慮されなければならない。アミノ酸輸送体は十分に研究されたBBBの構成要素であり、ロイシン、アラニン、セリン又はシステイン選択性の系を含む(Wade and Katzman 1975; Sershen and Lajtha 1979)。

システインは、BBBを横断するためにロイシン選択性の系を使用することが認識されている(Wade and Brady 1981)。タウリンがBBBを横断する能力もまた、ラットにおいてISCPを用いることにより記載されているが、これには内皮細胞のナトリウム及び塩素依存性の流入系が関与することが示唆される(Benrabh

10

20

30

40

50

et al., 1995)。一方、システアミンが BBB を横断できる機構についてはさらなる研究が必要である。

ここでは、システアミン及びシステインの BBB 輸送について研究するため、定量的かつ高度に鋭敏な技術を用いた。これは、BBB の物理的又は機能的な完全性を損なうことなく、全身投与に關与する末梢代謝過程をバイパスすることによって行われた。本発明者らは、有意な量のシステアミン及びシステインが脳に到達する能力を示した。システアミンの脳への取り込みは、灌流液へのシステインの添加によってさらに促進された。

【0108】

前述の、及び以下の実施例において、全ての温度は摂氏度により未修正で示され、かつ、他に記載のない限り、全ての部及びパーセンテージは重量による。

【0109】

以下の実施例では、先行する実施例において使用した本発明の反応物及び / 又は操作条件の代わりに、一般的又は特異的に記載した本発明の反応物及び / 又は操作条件を用いて反復することで、同様の成功を得ることができる。

【実施例 1】

【0110】

げっ歯類における MPTP を用いたパーキンソニズム誘導後のシスタミンの効果

【0111】

・動物

若齢成体 (9 週齢、25 グラム) 雄 C57BL/6 マウスを、Charles River Laboratories (モントリオール、ケベック州、カナダ) から購入した。動物は 1 ケージあたり 4 匹収容し、標準的な条件下で食餌及び水を自由に摂取させ、1 名の研究者によって同一の条件下で無作為に選択して使用した。全ての実験はカナダ動物管理協会 (Canadian Council on Animal Care) に従い、かつラバル大学中央病院 (Centre Hospitalier de l'Université Laval: CHUL、ケベック州、カナダ) の施設委員会により承認されて行った。実験の間を通して、研究に用いた全てのマウスの健康状態を、体重減少又はその他の健康に關わる問題の徴候について綿密にモニターした。動物の疼痛及び不快感を最少にするための全ての努力を行った。

【0112】

・MPTP の投与

マウスは、0.9% 生理食塩水又は 0.9% 生理食塩水に溶解して都度調製した MPTP-HCl (20 mg/kg 遊離塩基; Sigma、セントルイス、ミズーリ州) のいずれかによる 7 回の i.p. 注射を、実験プロトコルの最初の 2 日間に 12 時間おきに受け、3 日目以降には 1 日に 1 回受けた (Tremblay et al., 2006; Gibrat et al., 2007; Gibrat et al., 2010)。

【0113】

・シスタミンによる処置

パーキンソン病マウスにおけるシスタミン (シスタミン二塩酸塩、Sigma、セントルイス、ミズーリ州) の有益な効果を、0.9% 無菌生理食塩水に都度溶解して調製したシスタミンを、10 mg/kg の用量で、毎日 MPTP 投与前 1 時間に i.p. 注射することによって評価した。用量及び投与計画の選択は、本発明者らの以前の知見 (Tremblay et al., 2006; Gibrat et al., 2010) に基づく。シスタミンの初回の注射は、1) MPTP 注射開始の 2 日前 (前処置)、又は 2) 最終の MPTP 投与後 24 時間 (後処置) に行い、該処置は傷害後 14 日間毎日続けた。

本研究は別々の 2 回の実験に分けて行った。

【0114】

・実験番号 1. MPTP 損傷マウスにおけるシスタミンの神経救出特性

MPTP の毒性に対するシスタミンの効果を次の実験群によって試験した: グループ I

、生理食塩水+生理食塩水；グループII、生理食塩水+シタミン後処置；グループIII、生理食塩水+シタミン前処置；グループIV、MPTP+生理食塩水；グループV、MPTP+シタミン後処置、グループVI、MPTP+シタミン前処置。総計96マウスを用いて（1群あたり、 $n = 16$ ）体重の変動を毎日モニターし、最終のシタミン（又はビヒクル）注射後24時間に、灌流によって最終的に屠殺した。

【0115】

・実験番号2．亜急性のMPTP処置によって誘導される黒質のDA作動性神経細胞死の時間経過

この実験のために総計72マウスを用い、6群に分けた（1群あたり、 $n = 12$ ）。グループI、II及びIIIにはMPTPによる亜急性処置を施したが、グループIV、V及びVIには0.9%生理食塩水を投与した。最終のMPTP（又は生理食塩水）注射後、グループI及びIVは24時間、グループII及びVは7日、ならびにグループIII及びVIは14日に屠殺した。

【0116】

・灌流及び組織処理

動物をケタミン/キシラジン（Vetalar、Bioniche、ベルビル、オンタリオ州/Rompun、Bayer、トロント、オンタリオ州）による深い麻酔下で屠殺し、RNA分解酵素を含まない状態で2つの方法に従って灌流した。

【0117】

・実験1．全てのマウスを、RNA分解酵素を含まない0.1Mリン酸緩衝食塩水（PBS）による心臓灌流に供した。心臓灌流後、脳を回収して2つの半球を分離した。左半球の後固定を4%パラホルムアルデヒド（PFA）中で48時間行い、凍結保護のため、0.1M PBS中の20%スクロースへ移した。凍結マイクローム（Leica Microsystems、モントリオール、ケベック州）にて冠状の脳切片を25 μ mの厚さに切り出し、不凍液（0.2M第一リン酸ナトリウム、0.2M第二リン酸ナトリウム、30%エチレングリコール、20%グリセロール）中に連続的に回収し、使用時まで-20 $^{\circ}$ Cにて保存した。左半球の切片はさらなる免疫組織化学、及びin situハイブリダイゼーションプロトコルに使用した。右半球は2-メチルブタン中で急速凍結し、HPLC及びウェスタンブロット（WB）分析のためにクリオスタットで切り出しを行うまで-80 $^{\circ}$ Cに保管した。

【0118】

・実験2．この実験では、各動物の2つの半球をそれぞれ急速凍結してHPLC及びWB分析に使用した。各群の残りの5匹のマウスは、RNA分解酵素を含まない生理食塩水（0.9%）及びそれに続く4%PFA、pH7.4によって心臓灌流を行った。心臓灌流後に脳を回収して4%PFA中で後固定を24時間行い、凍結保護のため、0.1M PBS中の20%スクロースへ移した。脳を25 μ mの厚さの冠状切片に切り出した。実験2を完了するため、これらの切片を免疫組織化学及びin situハイブリダイゼーションに使用した。

【0119】

・HPLCによるカテコールアミンの定量化

線条体DA、3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸（DOPAC）及びホモバニリン酸（HVA）の濃度を、電気化学的検出を組み合わせたHPLCによって測定した（Calonet al., 2001; Calon et al., 2003）。

各線条体サンプルは、レベルが+1.145ないし+1.345の範囲の構造の、20 μ mの厚さのクリオスタット切片を構成した（Allen, 2008; Leinet al., 2007）。各サンプルに200 μ lの過塩素酸（0.1N; J.T. Baker）を加え、ホモジナイズ後に遠心分離して（13000 \times g）上清を得た。線条体組織由来の上清50 μ lを、Waters 717 plus オートサンプラー自動インジェクター、Atlantis dC18（3 μ l）カラムを備えたWaters 1525バイナリポンプ、Waters 2465電気化学検出器、及びガラス状炭素電極（W

10

20

30

40

50

aters Limited、ラシーヌ、ケベック州、カナダ)からなるクロマトグラフ系に直接注入した。電気化学ポテンシャルは10 nAに設定した。47.8 mM NaH₂PO₄、0.9 mM オクチル硫酸ナトリウム(J. T. Baker)、0.4 mM EDTA、2 mM NaCl、及び8%メタノール(J. T. Baker)からなるpH 2.9の移動相を1.0 ml/分にて送達した。ピークはBreezeソフトウェア(Waters)を用いて同定した。HPLCの定量化は、ピシンコニン酸(BCA)プロテインアッセイキット(Pierce、ロックフォード、イリノイ州、米国)を用いて決定したタンパク質濃度に対して標準化した。

【0120】

・TH免疫組織化学

DA作動性神経細胞の減少を評価するため、酵素THに対する免疫組織化学を以前に記載されたように行った(Tremblay et al., 2006; Gibrat et al., 2009)。簡単に述べると、数回の洗浄及びブロッキングブレインキュベーションを行った後の浮遊切片を、ウサギ抗TH抗体(Pel-Freez、ロジャーズ、アーカンソー州; 1:5000)と共に4 にて一晚インキュベートした。次に切片を、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG(Vector Laboratories、バーリントン、オンタリオ州; 1:1500)を含む溶液中で、室温(RT)にて1時間インキュベートした後、続いてアビジン-ビオチンペルオキシダーゼ複合体(ABC Elite kit; Vector Laboratories、バーリントン、オンタリオ州)を含む溶液中に配置し、室温にて1時間インキュベートした。最終的に、反応を3, 3'ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB)溶液(Sigma、セントルイス、ミズーリ州)及び0.1%の30%過酸化水素(Sigma、セントルイス、ミズーリ州)中で室温にて現像した。その他の切片は、インキュベーション溶液から一次抗体を省略した他は、上記のように処理した。これらの切片に対して実質的に免疫染色は行われていないため、陰性コントロールとして使用した。DAB反応に続いて、切片をゼラチンコートされたスライドに乗せ、クレシルバイオレット(Sigma、セントルイス、ミズーリ州)によって対比染色した。最終的に全ての切片を風乾させ、上昇するエタノールの勾配中で脱水させ、キシレン中で透徹させ、DPX封入剤(Electron Microscopy Science、ハットフィールド、ペンシルベニア州)を用いてカバースリップによる封入を行った。

【0121】

・Nurr1及びDATに対するin situハイブリダイゼーション

特定の[³⁵S]UTP標識された相補的RNA(cRNA)プローブを用いて、DA作動性の系(Zetterstrom et al., 1997)に関連する核内受容体であるNurr1の組織mRNAレベルを評価した。Nurr1に対するcRNAプローブは、pBluescript SK+内にサブクローン化し、XbaIによって直線化した完全長のマウスNurr1 cDNAの、403 bp(gene bank受入番号: 1504-1907 NM_013613)のEcoRI-BamHI断片に由来する。

【0122】

長さ2238 bpの断片であるDATプローブは、pBluescript IISK+プラスミド内にクローン化した。NotI酵素を用いて直線化を行った。[³⁵S]UTP及びT7 RNAポリメラーゼを用いてアンチセンスプローブを合成した。

【0123】

これらのマーカーに対するセンスプローブもまた作製したが、特異的なシグナルは得られなかった(データ未提示)。以下に記載する手順、及び以前に公表したプロトコルに従って脳の切片をハイブリダイズした(Beaudry et al., 2000; Cossette et al., 2004; Lapointe et al., 2004)。

【0124】

10

20

30

40

50

この *in situ* プロトコルは RNA 分解酵素を含まない状態で行った。薄片は Snow coat X - tra (商標) スライド (Surgi path、ウイニペグ、カナダ) に載せ、使用前に真空下で一晩保管した。脳切片を 4% PFA pH 7.4 中で、室温にて 20 分固定した。様々な連続浴 (0.1 M PBS 5 分を 2 回、0.1 μ g/ml プロテイナーゼ K 37 にて 10 分、アセチル化浴 (0.25% 無水酢酸、0.1 M トリエタノールアミン) 10 分、標準的なクエン酸生理食塩水 (SSC) (0.3 M NaCl、30 mM クエン酸ナトリウム) 5 分を 2 回) によって前処理を行った。脱水のために、エタノール溶液の連続浴 (30%、60%、100%、100%; 各 3 分) を行った。組織切片におけるリボプローブの *in situ* ハイブリダイゼーションを、58 にて一晩、標準的なハイブリダイゼーション緩衝液 (50% 脱イオン化ホルムアミド、5 M 塩化ナトリウム、1 M Tris、0.5 M EDTA、50x デンハルト液、50% デキストラン硫酸、10 mg/ml tRNA、1 M DTT、 2×10^6 cpm/ μ l 35 S 結合プローブ) 中で行った。異なる連続浴 (4x SSC (30 分)、カバースリップの除去、2x SSC 2 回 (5 分)、20 μ g/ml RNase A (1 時間) 37 にて、ミリQ 水 2 回 (15 秒)、2x SSC (15 分)、0.5x SSC (30 分) 60 にて、0.1x SSC (30 分) 60 にて、0.1x SSC (5 分) 室温にて) を用いて後処理を行った。さらなる脱水のために、エタノール溶液の反復浴 (30%、60%、100%、100%; 各 3 分) を用いた。次に組織切片を、放射性物質感受性フィルムである Biomax MR (Kodak、ニューヘブン、コネチカット州) に対して配置した。Nurr1 に対しては 72 時間、及び DAT に対しては 5 時間の曝露後、オートラジオグラムを現像した。

【0125】

脱脂はエタノールの 4 浴、キシレンの 2 浴、及びエタノールの 3 浴によって行った。これらの工程に続き、スライドを 42 にて溶解した NTB 乳剤 (Kodak、ニューヘブン、コネチカット州) に浸し、4 時間風乾した後、暗所にて 4 で 5 日間保管した。次にこの乳剤を D-19 現像液 (Kodak、ニューヘブン、コネチカット州) 中で現像し (3.5 分)、脱イオン水ですすいだ後、Kodak から入手した Rapid Fixer 溶液中で固定した (5 分)。スライドを脱イオン水で 1 時間すすいだ後発色させた。発色は、チオニン (1 分)、続いて水及びエタノールに浸し、次に 3 エタノール (1 分) 及び 3 キシレン浴 (3 分) を用いて行った。スライドは、DPX 封入剤を用いてカバースリップにより封入した。

【0126】

ウェスタンブロット分析

プロテアーゼ阻害剤 (Roche、ミシサーガ、オンタリオ州、カナダ) 及びホスファターゼ阻害剤 (Sigma、セントルイス、ミズーリ州、米国) の混合物を含む、8 容積の溶解緩衝液 (150 mM NaCl、10 mM NaH_2PO_4 、1% (v/v) Triton X-100、0.5% SDS、及び 0.5% デオキシコール酸ナトリウム) 中でサンプルをホモジナイズした。サンプルを超音波処理し (3×10 秒)、100,000 g にて 4 で 20 分遠心分離した。上清を回収し、-80 で保管した。各分画のタンパク質濃度を、ピシンコニン酸タンパク質アッセイキットによって決定した。一サンプルあたり 20 μ g の総タンパク質を Laemmli ローディング緩衝液に加え、95 で 5 分加熱した。次にサンプルを負荷し、SDS ポリアクリルアミド (12%) ゲル電気泳動に供した。タンパク質を 0.45 μ m Immobilon PVDF メンブレン (Millipore、ビルリカ、マサチューセッツ州、米国) 上に電氣的にブロットし、1x PBS 中の 5% 無脂肪ドライミルク及び 1% BSA 中で 1 時間ブロックした。メンブレンは、一時抗体としてウサギ抗 TH (Pel-Freez; 1:5,000)、ウサギ抗 BAX (Cell signaling technology; ダンバーズ、マサチューセッツ州; 1:1,000)、ウサギ抗 Bcl2 (Cell signaling technology; 1:1,000)、マウス抗アクチン (ABM Inc、リッチモンド、ブリティッシュ・コロンビア州、カナダ; 1:10,000)、及び適切な二次

抗体としてヤギ抗ウサギ又は抗マウス (Jackson Immunoresearch、ウェスト・グローブ、ペンシルベニア州; 1:100,000) によって免疫プロットを行い、続いて化学発光試薬 (KPL、Mandel Scientific、ゲルフ、オンタリオ州、カナダ) を添加した。バンドの強度を、ImageQuant Las 4000 デジタルイメージングシステム (Science Lab 2003 Image Gauge ソフトウェア バージョン4.2、富士フイルム、ニューヘブン、コネチカット州) を用いて定量化した。

【0127】

・デンシトメトリーを用いた Nurrl 及び DAT mRNA レベルの測定
 オートラジオグラフィの標識のレベルをコンピュータ化されたデンシトメトリーによって定量化した。デジタル化した脳画像及びそれらの分析は上述の同じ機器を用いて行った。オートラジオグラムの光学密度を、¹⁴C 放射活性標準物質 (ARC146 - ¹⁴C 標準物質、American Radiolabeled Chemicals Inc. , セントルイス、ミズーリ州) を用いて組織の $\mu\text{Ci/g}$ に変換した。黒質緻密部 (SNc) における Nurrl 及び DAT mRNA レベルを、全ての切片に対して同様な前後方向面を用いて測定した。各 SNc 面の平均標識値を、同じマウスの隣り合う3枚の切片から算出した。バックグラウンド強度は、Nurrl 又は DAT mRNA レベルを欠く黒質網様部 (SNr) の白い領域から取得し、これを全ての測定から差し引いた。

【0128】

・TH免疫反応性神経細胞の立体的定量化
 DA作動性神経細胞の減少を、明視野の照明下でのTH免疫反応性細胞 (同定可能な体細胞) の立体的計数によって決定した。SNcを通して、E800 Nikon顕微鏡 (Nikon Canada Inc. , ミシサーガ、オンタリオ州、カナダ) に取り付けた Stereo investigator ソフトウェア (MicroBrightfield、コルチェスター、バーモント州、米国) を用いて、切片を10枚おきに分析した。低倍率での (4x対物レンズ) SNcの描写後、各切片上にポイントグリッドを置いた。分析するSNcの最も頭側の面 (プレグマ - 3.08mm) のために、内側終止核による目に見える境界によってSNcを描写した。分析するSNcの中間部 (プレグマ - 3.28mm) 及び最も尾側の面 (プレグマ - 3.58mm) のために、第3脳神経の出口によって構造の境界を決定した。免疫染色された細胞は、より高倍率 (20x対物レンズ) で、光学フラクショネーター法によって計数した。計数の変数は以下の通りである: 計数枠間の距離 (150 μm x 150 μm)、計数枠の大きさ (75 μm) 及び保護領域の厚さ (1 μm)。禁止線と交差していない細胞のみを計数した。光学フラクショネーター (Glaser and Glaser, 2000) 法を用いて、TH陽性 (TH及びクレシルバイオレット陽性) 及びTH陰性 (クレシルバイオレットのみ陽性) 細胞を計数した。立体的細胞計数は、別々の研究者2名によって盲検的に行った。なお、TH免疫反応特性の分析はSNcに限定したことから、腹側被蓋野 (VTA) は除外されることに留意されたい。

【0129】

・統計解析及び画像の準備
 全ての解析は群平均 \pm S.E.Mとして表す。実験番号1及び2に関連するデータは二元配置分散分析法によって評価した。二元配置分散分析法によって有意ではない交互作用項がもたらされた場合、チューキーポストホック多重比較検定を用い、データの有意性についてさらに解析した。全ての事例で、P値が0.05未満のときに有意であるとみなした。顕微鏡写真は、E800 Nikon顕微鏡 (Nikon Instruments、トロント、オンタリオ州) に取り付けた Picture Frame ソフトウェア (MicroBrightfield) によって撮影した。画像は、図解のために Adobe Photoshop CS3を用いて整えた。

【0130】

結果

- ・ D A 作動系におけるシスタミンの効果
- ・ 亜急性 M P T P マウスモデルにおけるシスタミンの神経保護効果

【 0 1 3 1 】

シスタミンの有益な効果を調査するために、D A 系に関連する幾つかなの特異的なマーカーを用いて、本研究で使用した全てのマウスにおいてエンドポイントでの組織学的評価を行った。T H は D A の生合成における律速酵素で、かつ D A 神経細胞のマーカーである。N u r r 1 は D A 作動性表現型及びドーパミン輸送体の維持に關与する転写因子であり、D A T はプロ D A 作動性黒質線条体神経細胞の高度に特異的なマーカーであることから、これらの発現は D A 作動性神経細胞の健全な状態を反映する。

【 0 1 3 2 】

M P T P 処理により、S N p c におけるニッスル染色神経細胞の減少を伴う T H 免疫反応性神経細胞の有意な減少がみられたが、これは T H 発現の低下による D A 神経細胞の変性と一致した ($p < 0.001$ 、図 1)。これには S N p c における黒質 N u r r 1 及び D A T m R N A レベルの有意な減少が伴った ($p < 0.01$ 、図 2; $p < 0.001$ 、図 3)。M P T P による中毒の 2 日前に開始した、 10 mg / kg シスタミンの毎日の薬物投与によってシスタミンの神経保護作用が確認されたが、これは S N p c における T H 免疫反応性細胞密度が、M P T P によって処置されていない動物に比較して増加したことによって明らかにされた ($p < 0.001$ 、図 1)。シスタミン前処置マウスにおける死後の D A 系の分析により、N u r r 1 m R N A レベル ($p < 0.01$ 、図 2) 及び D A T を発現する S N p c 神経細胞の密度の正常化 ($p < 0.01$ 、図 3) がさらに示された。

【 0 1 3 3 】

- ・ 亜急性 M P T P マウスモデルにおけるシスタミンによる神経救出の可能性

シスタミン処置の神経救出特性の評価を、最終の M P T P 注射後 2 4 時間に開始した。 10 mg / kg シスタミンによる後処置を行ったマウスでは、M P T P により誘導された D A 作動性神経細胞の神経毒性もまた有意に低下した。M P T P による傷害後にシスタミンで処置したマウスは、M P T P によって処置されていないマウスに匹敵する、著しく多数の T H 陽性及びニッスル陽性神経細胞 ($p < 0.01$ 、図 1)、ならびに高レベルの N u r r 1 ($p < 0.5$ 、図 2) 及び D A T ($p < 0.5$ 、図 3) m R N A を示した。

【 0 1 3 4 】

概して、D A 系に関連するこれら 3 つの特異的なマーカーの評価は同様なパターンを示し、かつ、シスタミンによる神経保護を裏付けるものではなく、シスタミンの神経救出特性に及ぶ、シスタミンによる M P T P 後処置の有益な効果が示された。

【 0 1 3 5 】

神経変性過程を阻止する (神経保護) のみではなく、これを停止する (神経救出) シスタミンの能力を結論付けるため、本発明者らは、これらの実験で用いた M P T P モデルにおける D A 関連変性の時間経過を定義するための試験を行った。

【 0 1 3 6 】

- ・ 亜急性の M P T P 投与によって誘導された、黒質 D A 作動性細胞の変性の時間経過

T H 陽性及びニッスル陽性神経細胞の減少は、最終の M P T P 注射後 1 日から 1 4 日に屠殺した M P T P 群で 20% ないし 27% 変動したが、7 日及び 1 4 日においてのみ、対応する生理食塩水群に比較して統計学的に有意であった ($p < 0.01$ 、図 4)。1 日目には有意な T H 陽性細胞の減少は見られなかったにもかかわらず、S N p c における N u r r 1 及び D A T m R N A レベルの有意な低下が観察されたことから ($p < 0.05$ 、図 5)、D A 神経細胞の幾らかの脆弱性が示唆される。さらに、ウェスタンブロット分析により、プロ及び抗アポトーシス性タンパク質である B A X 及び B c 1 2 は、最終の M P T P 注射後 2 4 時間にそれぞれ増加及び減少したことが示された ($p < 0.05$ 、図 6)。まとめると、これらの知見は、最終の M P T P 注射後 2 4 時間に D A 作動性神経細胞はまだ変性を始めていないが、これらはアポトーシス経路に導かれていることを示唆する。重要なことに、これはシスタミンの有益な効果が神経救出特性であることを裏付けている

10

20

30

40

50

。

【0137】

結果

- ・DA作動系におけるシスタミンの効果

【実施例2】

【0138】

シスタミンの代謝及び脳への輸送特性

【0139】

- ・動物及びシスタミン投与

若齢成体(9週齢、25g)雄C57BL/6マウスを、Charles River Laboratories(モントリオール、ケベック州、カナダ)から購入した。動物は1ケージあたり4匹収容し、標準的な条件下で食餌及び水を自由に摂取させ、1名の研究者によって同一の条件下で無作為に選択して使用した。全ての実験はカナダ動物管理協会(Canadian Council on Animal Care)に従い、かつラバル大学中央病院(Centre Hospitalier de l'Université Laval: CHUL、ケベック州、カナダ)の施設委員会により承認されて行った。実験の間を通して、研究に用いた全てのマウスの健康状態を綿密にモニターした。シスタミン注射後に明らかに活性のある中間体を同定し、かつ全身及び大脳でのその代謝を理解するため、正常成体C57BL/6雄マウスに単回のシスタミンの腹腔内(i.p.)注射を行った。以前の文献で決定したように、3つの異なる用量:10、50、及び200mg/kgを用いた(Tremblay et al. 2006; Gibraltar et al. 2010)。最終的にこれらの用量を生理食塩水の注射と比較した。シスタミンを無菌生理食塩水(0.9%)に溶解し、屠殺の1、3、12、24及び48時間前に注射した。動物をケタミン/キシラジンによる深い麻酔下で屠殺し、0.1Mリン酸緩衝食塩水の心臓内注入によって灌流した。心臓灌流後に脳を回収し、2-メチルブタン中で急速凍結し、HPLC分析のためにクリオスタットで切り出しを行うまで-80に保管した。この試験には総計200マウスを用いた(1群あたりn=10)。

10

20

【0140】

- ・システイン及びシステアミンのHPLCによる測定

蛍光検出を組み合わせたHPLCを、用量応答試験及びin situ大脳灌流(ISCIP)の手順の両方の実験セットによるシステイン及びシステアミンの定量化において使用した。前頭皮質を200µLのNaHCO₃中でホモジナイズし、続いて15700g(4)にて20分遠心分離した。30µLの4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン(ABD-F)試薬を用いて、50µLの上清に直接誘導体化を行った。アルキル化反応は55、15分で完了し、4.9µLの12N HClを用いて停止させた。7500g(4)での10分の遠心分離後、上清を、4に設定したWaters 717 plus オートサンプラー自動インジェクター、Atlantis dC18(3µL; 3.9x150mm)カラムを備えたWaters 1525バイナリポンプ、及びWaters 2487二波長吸光度検出器(Waters Limited、ラシーヌ、ケベック州、カナダ)からなるクロマトグラフに直ちに注入した。励起波長を385nm、発光波長を515nmに設定した。2.5%メタノール及びpH4.0に調整した0.1M酢酸アンモニウムからなる移動相を1ml/分にて送達した(Santa et al. 2006)。ピークはBreezeソフトウェア(Waters limited)を用いて同定及び定量した。HPLCの定量化は、タンパク質濃度に対して標準化した。タンパク質測定は、製造者によるプロトコルの記載に従い、ピシンコニン酸プロテインアッセイキット(Pierce、ロックフォード、イリノイ州、米国)を用いて決定した。

30

40

【0141】

- ・タウリン及びヒポタウリンのHPLCによる測定

タウリン及びヒポタウリンを、UV検出を組み合わせたHPLCによって測定した。N

50

a H C O₃ 中の脳の上清 (プレグマ 1 . 5 4 ないし - 0 . 5 8 m m) の抽出物 (詳細は上記の項を参照のこと) を、公表した方法を改変したものに基き (S a l l e r a n d C z u p r y n a 1 9 8 9 ; C a l o n e t a l . 1 9 9 9) 、試薬である塩化ダンシル (S i g m a - A l d r i c h 、セントルイス、ミズーリ州、米国) を用いて直接誘導体化した。簡単に述べると、50 μ L の塩化ダンシル (1 . 2 m g / m L) 及び 50 μ L のサンプル又は標準溶液を混合し、次に 30 分 90 にてインキュベートした。7500 g (4) での 10 分の遠心分離後、上清を上記のクロマトグラフに直ちに注入した。吸光度を 337 nm に設定し、かつ 0 . 5 吸光度単位の感度をフルスケールに設定した。移動相は、0 . 1 5 % (v / v) リン酸を含む水 - アセトニトリルの混合物 (8 8 . 5 ~ 1 1 . 3 5 % v / v) からなり、0 . 8 m L / 分の速度で送達した。結果は上記と同じ方法を用いて得た。

10

【 0 1 4 2 】

・ I n s i t u での大脳灌流

I n s i t u での大脳灌流 (I S C P) は、以前に記載されたように (D a g e n a i s e t a l . 2 0 0 0 ; O u e l l e t e t a l . 2 0 0 9) 、ケタミン / キシラジンの混合物 (1 4 0 / 8 m g / k g) の i . p . 注射によって促進される深い麻酔下で行った。100% の灌流液が B B B に確実に到達するように、外枝の結紮に続いて右総頸動脈にカテーテルを挿入した (模式図として、図 3 a を参照) 。次に胸部を開き、心臓を除去後、灌流を直ちに流速 2 . 5 m L / 分で開始した。灌流液は、炭酸水素緩衝生理食塩水 : 128 m M N a C l 、24 m M N a H - C O₃ 、4 . 2 m M K C l 、2 . 4 m M N a H₂ P O₄ 、1 . 5 m M C a C l₂ 、0 . 9 m M M g C l₂ 及び 9 m M D - グルコースからなるものであった。溶液に 9 5 % O₂ 及び 5 % C O₂ のガスを吹き込んで p H 7 . 4 とした後、37 で加温した。全ての実験において、B B B の完全性及び血管容積のマーカーとして放射性トレーサー (0 . 3 μ C i / m L ¹⁴ C - スクロース) をシステアミン (259 μ M) 及びシステイン (165 μ M) と共灌流した。この試験では、未処置マウスの 4 つの異なる群 (n = 3) を評価し、これらはシステイン、システアミンの両分子、又は対照として ¹⁴ C - スクロースのみによって灌流した。

20

【 0 1 4 3 】

60 秒の灌流後、マウスの断頭によってこの手順を終了した。右大脳半球を回収し、前頭皮質を切り出して、システイン及びシステアミンの H P L C による測定のためにドライアイス上で急速に冷凍した。

30

【 0 1 4 4 】

この半球の残りの脳組織を 2 m L の S o l v a b l e (P e r k i n - E l m e r L i f e S c i e n c e s 、ウォルサム、マサチューセッツ州、米国) により 50 にて 48 時間消化し、次に 9 m L の H i s a f e シンチレーションカクテル (P e r k i n - E l m e r L i f e S c i e n c e s) と混合した。各実験終了時に、脳輸送係数 (以下の方程式を参照) を算出するため、H P L C 定量化のために放射性標識マーカーを添加する前、かつ、シンチレーション計数のためにシリンジ及びカテーテルを通過した後の灌流液を一定分量採取した。脳の消化物及び還流液中の ¹⁴ C 同位元素を、W a l l a c シンチレーションカウンター (P e r k i n - E l m e r L i f e S c i e n c e s) によって計数した。¹⁴ C - スクロースを用いて決定した血管空間によって補正したシステイン又はシステアミンの分布の測定量から、システイン及びシステアミン取り込みのクリアランス係数 (C l u p ; μ L / g / 秒) を算出した。血管空間は一定であり、20 μ L / g 未満であった。前記したように、以下の方程式を用いて最終的に算出した (D a g e n a i s e t a l . 2 0 0 0) 。

40

【 0 1 4 5 】

【数 1】

$$\text{Clup} (\mu\text{l g}^{-1} \text{s}^{-1}) = \frac{V_d}{T} \cdot \frac{X_{\text{システイン}}}{C_{\text{システイン灌流液}}} \cdot \frac{X_{\text{スクロース}}}{C_{\text{スクロース灌流液}}}$$

V_d ($\mu\text{L} / \text{g}$) は試験化合物の分布量を表し、 T (秒) は灌流時間であり、 $X_{\text{システイン}}$ (ng / mg 組織) 又は $X_{\text{スクロース}}$ (dpm / g) はそれぞれ、該半球の前頭皮質もしくは残りの組織に見出されたシステイン又はスクロースの量である。 C は灌流液中の濃度 ($\text{ng} / \mu\text{L}$; dpm / mL) (上記方程式の例ではシステイン) である。

【0146】

・データ及び統計解析

全てのデータは群平均 \pm S.E.M. によって表す。データは二元配置分散分析法によって評価し、スチューデント t 検定を用いて有意性を解析した。各群は、対応する時点 (1、3、12、24、又は48時間) における $0 \text{ mg} / \text{kg}$ 群と比較した。ISCP実験のため、有意性の解析にはスチューデント t 検定を用いた。全ての事例で、 p 値が 0.05 未満の際に有意であるとみなした。

【0147】

結果

・シスタミン投与の一般的効果

【0148】

用量応答試験を通して死亡はみられず、 $200 \text{ mg} / \text{kg}$ シスタミン群のマウスが以前に報告されたように (Gibrat et al. 2010) 低体温 (震え) 及び傾眠 (眼瞼を閉じる) の徴候をおおよそ2時間呈した以外は、全てのマウスは良好な健康状態を示した。

【0149】

・シスタミン投与後の、血漿及び脳のシステインならびにシステアミンのレベル

シスタミンの単回用量を $i.p.$ 注射したマウスの血漿及び脳に見出される代謝産物を調べるため、高感度の HPLC 法を用い、ABD-F 化合物を用いたチオール (-SH) 誘導体化を通して、蛍光検出の前にシステアミン及びシステインを特異的に測定することが可能であった (図 7 a)。シスタミン処置マウスの血漿中にシステアミンは検出されなかった。全身の発現とは反対に、大脳のシステアミン及びシステイン濃度の分析によって脳システアミンの著しい増加が明らかになった (図 7 b)。この増加は、本用量応答試験で用いた、シスタミンの3つの投与用量の全て及び各時点において観察された。二元配置分散分析法によって、用量及び時間の2つの因子についての有意差、及びこれら2つの因子の間の有意な相互作用 ($p < 0.0001$) が明らかとなった。ポストホック解析によって、 $50 \text{ mg} / \text{kg}$ ($p < 0.05$) 及び $200 \text{ mg} / \text{kg}$ ($p < 0.01$) 用量の注射の、特に1時間後に有意な増加が明らかになった。システアミンのレベルは、生理食塩水群に比較してシスタミン投与後3時間もなお有意に増大し ($p < 0.01$)、48時間かけて次第に減少した。シスタミン投与は、最も高い $200 \text{ mg} / \text{kg}$ の用量においてもシステインの血漿 (データ未提示) 又は脳のレベルには影響を与えなかった (図 7 c)。

【0150】

・シスタミン投与後の、血漿及び脳のヒポタウリンならびにタウリンのレベル

ヒポタウリンはシステアミンの主要な代謝産物であり、これは部分的にタウリンを産生し得る。これら2つの分子の濃度を決定するため、UV 検出前の、一級アミノ基の塩化ダンシルによる誘導体化を利用した (図 8 a)。この反応は芳香族及び脂肪族アミンの両方に起こって安定なスルホンアミド付加体を産生し、同じ方法によるヒポタウリン (図 8 a; 化合物 2) 及びタウリン (図 8 a; 化合物 1) 両方の検出を可能にする。群の間で幾らかの変動はみられたが、3通りの用量 (10 、 50 又は $200 \text{ mg} / \text{kg}$) のいずれも、

10

20

30

40

50

対照群に比較して、脳のヒポタウリン及びタウリンに有意な変化は観察されなかった（図 8 b 及び c）。屠殺のいずれの時点（1、3、12、24 及び 48 時間）においても、ヒポタウリン及びタウリンが脳に蓄積する徴候はみられなかった。血漿濃度は検出閾値未満か又はそれに近いままであった。

【0151】

・システインはシステアミンの脳輸送を促進する

大多数の内在性及び外来性の化合物は BBB を横断しないために CNS では不活性であることから、本発明者らはシステアミン及びシステインの脳への取り込みについて調べた。本発明者らは ISCP を用い、頸動脈を通した脳への直接注入によって、システアミン及びシステインの血液 - 脳輸送パラメータを測定した (Dagenais et al. 2000; Ouellet et al. 2009) (図 9 a)。システイン及びシステアミンは、それぞれ 4.39 ± 0.47 及び $0.15 \pm 0.02 \mu\text{L/g/s}$ であるそれらの脳輸送係数 (Clup) にみられるように、両方が BBB を横断する (図 9 b 及び c)。比較として、モルヒネのような日常的に用いられる CNS への薬物は、 $0.3 \mu\text{L/g/秒}$ の Clup を示すが、ジアゼパム又は脂肪酸のような高度に拡散性の薬物は、 $40 \mu\text{L/g/秒}$ にまで達する Clup を示す (Bourasset et al. 2003; Ouellet et al. 2009)。興味深いことに、システイン及びシステアミンの共灌流はそれらの脳への取り込みを促進した。実際に両化合物を同時に注入した際には、システアミン (+133%; $p < 0.05$) 及びシステイン (+59%; $p < 0.05$) の Clup の有意な増大が測定された。BBB を横断することが示されているヒポタウリン及びタウリンについては再評価しなかった (Benrabh et al. 1995)。

【実施例 3】

【0152】

6-OHDA の線条体内投与に続くシスタミンの神経救出及び神経回復特性

【0153】

・材料及び方法

・動物

若齢成体 (9 週齢、25 グラム) 雄 C57BL/6 マウスを、Charles River Laboratories (モントリオール、ケベック州、カナダ) から購入した。動物は 1 ケージあたり 4 匹収容し、標準的な条件下で食餌及び水を自由に摂取させ、1 名の研究者によって同一の条件下で無作為に選択して使用した。全ての実験はカナダ動物管理協会 (Canadian Council on Animal Care) に従い、かつラバル大学中央病院 (Centre Hospitalier de l'Université Laval: CHUL) の施設委員会により承認されて行った。実験の間を通して、研究に用いた全てのマウスの健康状態を、体重減少又はその他の健康に関わる問題の徴候について綿密にモニターした。動物の疼痛及び不快感を最少にするための全ての努力を行った。

【0154】

・6-OHDA 及びシスタミンによる処理

このプロトコルは、6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) の一側性定位固定線条体内注射に基づくものであった。6-OHDA の線条体内投与は、黒質の DA 神経細胞に進行性及び逆行性の変性による変化を生じさせる (Bjorklund et al., 1997; Costantini et al., 2001)。マウスをイソフルランによって麻酔し、マウスに適合させた定位固定用の枠に配置した。6-OHDA を $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で 0.9% 生理食塩水及び 0.02% アスコルビン酸に溶解し、 $2 \mu\text{l}$ を右線条体に $0.5 \mu\text{l}/分$ の速度で注射した。注射後、針を後退させる前に、定位置に 3 分間置いた。注射はハミルトンシリンジを用いて、定位固定座標、すなわち AP: +0.04 cm、ML: -0.18 cm、DV: -0.31 cm (Allan P. 2008 のアトラスに対応する) に従って行った。

【0155】

対照としてその他のマウスを同一の外科的手順に供し、2 μ l の溶媒のみ (0.9% 生理食塩水及び0.02% アスコルビン酸) を同一の座標に注射した。この試験はさらに2つの異なる実験に分けた。

1) 6-OHDA 損傷マウスにおけるシスタミン (シスタミン二塩酸塩、Sigma、セントルイス、ミズーリ州) の神経救出効果。この実験では、10 mg/kg シスタミンの初回の i.p. 注射を手術後3日目に行い、該処置は14日間毎日続けた。

2) 6-OHDA 損傷マウスにおけるシスタミン (シスタミン二塩酸塩、Sigma、セントルイス、ミズーリ州) の神経回復効果。シスタミンによる処置は、ドーパミン作動性 (DA 作動性) の損傷が安定し、ピークに達した手術後3週間目に開始した。該処置は6週間毎日続けた。

10

【0156】

6-OHDA の毒性に対するシスタミンの効果を次の実験群によって試験した: グループ I、偽物質 + 生理食塩水; グループ II、6-OHDA + 生理食塩水; グループ III、偽物質 + シスタミン; グループ IV、6-OHDA + シスタミン。各実験に総計40マウスを用いて (1群あたり、n = 10) 体重の変動を毎日モニターし、最終のシスタミン (又はピヒクル) 注射後24時間に、灌流によって最終的に屠殺した。結果を図10、11及び12に示す。

【0157】

・灌流及び組織処理

動物をケタミン/キシラジン (Vetalar、Bioniche、ベルビル、オンタリオ州/Rompun、Bayer、トロント、オンタリオ州) による深い麻酔下で屠殺した。全てのマウスを、RNA 分解酵素を含まない0.1M リン酸緩衝食塩水 (PBS) による心臓灌流に供した。心臓灌流後に脳を回収し、各マウスにおける中脳全体を含む後脳部を、さらなる免疫組織化学及び in situ ハイブリダイゼーション分析のために4% PFA 中で後固定を行った。右及び左線条体を含む前脳部は急速凍結して HPLC 及び WB 分析に使用した。

20

【0158】

Nurr1 及び DAT に対する、HPLC によるカテコールアミンの定量化、TH 免疫組織化学及び in situ ハイブリダイゼーションは、実施例1の記載に従って行った。

30

【0159】

・デンシトメトリーを用いた Nurr1 及び DAT mRNA レベルの測定

オートラジオグラフィの標識のレベルをコンピュータ化されたデンシトメトリーによって定量化した。デジタル化した脳画像及びそれらの分析は上述の同じ機器を用いて行った。オートラジオグラムの光学密度を、 14 C 放射活性標準物質 (ARC146- 14 C 標準物質、American Radiolabeled Chemicals Inc., セントルイス、ミズーリ州) を用いて組織の μ Ci/g に変換した。黒質緻密部 (SNc) における Nurr1 及び DAT mRNA レベルを、全ての切片に対して同様な前後方向面を用いて測定した。各 SNc 面の平均標識値を、同じマウスの隣り合う3枚の切片から算出した。バックグラウンド強度は、Nurr1 又は DAT mRNA レベルを欠く黒質網様部 (SNr) の白い領域から取得し、これを全ての測定から差し引いた。

40

【0160】

・TH 免疫反応性神経細胞の立体的定量化

DA 作動性神経細胞の減少を、明視野の照明下での TH 免疫反応性細胞 (同定可能な体細胞) の立体的計数によって決定した。SNc を通して、E800 Nikon 顕微鏡 (Nikon Canada Inc., ミシサーガ、オンタリオ州、カナダ) に取り付けた Stereo Investigator ソフトウェア (MicroBrightfield、コルチェスター、バーモント州、米国) を用いて、切片を10枚おきに分析した。低倍率での (4x 対物レンズ) SNc の描写後、各切片上にポイントグリッドを置いた

50

。分析するSNcの最も頭側の面(プレグマ-3.08mm)のために、内側終止核による目に見える境界によってSNcを描写した。分析するSNcの中間部(プレグマ-3.28mm)及び最も尾側の面(プレグマ-3.58mm)のために、第3脳神経の出口によって構造の境界を決定した。免疫染色された細胞は、より高倍率(20×対物レンズ)で、光学フラクショネーター法によって計数した。

計数の変数は以下の通りである: 計数枠間の距離(150µm×150µm)、計数枠の大きさ(75µm)及び保護領域の厚さ(1µm)。禁止線と交差していない細胞のみを計数した。光学フラクショネーター(Glaser and Glaser, 2000)法を用いて、TH陽性(TH及びクレシルバイオレット陽性)及びTH陰性(クレシルバイオレットのみ陽性)の発現細胞を計数した。立体的細胞計数は、別々の研究者2名によって盲検的に行った。なお、TH免疫反応特性の分析はSNcに限定したことから、腹側被蓋野(VTA)は除外されることに留意されたい。

【0161】

・アポモルヒネにより誘導される回転

回転行動は、DAの欠乏及びDA受容体に対する非対称性の刺激の、信頼できる生理的基準を表すと考えられている。アポモルヒネ(Anden et al., 1966; Ungerstedt et al., 1968)のようなDAアゴニストの適用により、DA受容体は直接刺激されてDAの欠乏した半球に対する対側性の回転を導く。損傷後3、6、及び9週間にマウスにアポモルヒネ(0.5mg/kg、Sigma-Aldrich)を投与し、自動ロータメーターシステムを用いて回転行動を45分間評価した。以前に記載されたように(Metz 2002)、結果を平均して有効回転数(=対側性の回転数-同側性の回転数)で表した。注射後、回転の記録を開始する前に、動物を5分間慣らすようにした。

【0162】

・ステップ試験

歩みの調節についての試験を、ラット(Lindner et al., 1995)及びMPTP処置マウス(Blume et al., 2009)における試験を改変して行った。マウスの後肢を台上に載せた状態で、その尾の基部を保持し、マウスが3~4秒かけて1メートルの距離を横断するように一定の速度で後方へ移動した。デジタルビデオカメラ(Sony Handcam、DCR-HC90E PAL)を用いてマウスをビデオに記録し、ビデオをオフラインにして、全距離にわたり、損傷のある半球に対して対側又は同側の足によって為された歩みの調節回数を数えることによって解析した。マウスの手術後3週、6週、及び9週目に3回の試行を行い、これらの試行を通した中央値データを算出した。

【0163】

・円筒試験

後肢で立つ間に体重を支える前肢の運動を測定する、肢の非対称使用(円筒)試験は、一側性に6-OHDAを注射したラット及びマウスにおける黒質線条体細胞減少の良好な指標であることが示されてきた(Schallert et al., 2000; Tilleron et al., 2001; Lundblad et al., 2004; Lancu et al., 2005)。探索行動の間の、自発性の前肢の使用における側面への偏りを試験するために、全角度からマウスを観察できるように2つの垂直な鏡の前に配置したガラス円筒(直径10cm、高さ14cm)の中にマウスを個別に入れた。マウスを直ちに3分間ビデオ記録した。ビデオ記録の前に、試験に用いる円筒への動物の慣らしは行わなかった。損傷に対して同側又は対側の前肢により独立して行われた、支持のための壁へのタッチ(十分に伸ばした指による接触)の数を数えるために、ビデオ記録を行った。前肢の非対称使用の程度は、損傷に対する対側の足(右足)によって行われたタッチを、各セッションにおけるタッチの総数のパーセンテージとして表すことによって得た。

【0164】

10

20

30

40

50

・統計解析

全ての解析は群平均 ± S.E.Mとして表す。データは二元配置分散分析法によって評価した。二元配置分散分析法によって有意ではない交互作用項がもたらされた場合、チューキーポストホック多重比較検定を用い、データの有意性についてさらに解析した。全ての事例で、P値が0.05未満のときに有意であるとみなした。

【0165】

参考文献：

- ・アレンP. アレンの脳地図。シアトル(ワシントン州)：アレン脳科学研究所；2008. <http://www.brain-map.org> から入手可能。
- ・アンデン, N. E., ダールストローム, A., フクスィ, K., ラルソン, K., 1966. 黒質線条体ドーパミンニューロンの機能的役割。 *Acta Pharmacol. Toxicol.* 24, 236 - 274.
- ・バックZ. M. 及びボーマリアージュM. L. (1965) 保護物質の注射からX線照射の開始までの時間に応じた、マウスにおけるシステアミン及びシスタミンの放射線防護作用。 *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 153, 457 - 459.
- ・ボードリーG、ラングロアMC、ウェッペI、ロイヤールC、レベスクD. (2000) ラット前脳における、ハロペリドール及びクロザピンによる、核受容体神経成長因子誘導Bの転写調節のパターン及び細胞特異性の対比。 *J. Neurochem.* 2000; 75: 1694 - 702.
- ・ベンラH., ブーレJ. M. 及びルフォコニエJ. M. (1995) 血液脳関門におけるタウリン輸送：インビボ脳灌流研究。 *Brain Res.* 692, 57 - 65.
- ・ビヨルクンド, A., ローゼンブラッド, C., ウィンクラー, C., キリク, D., 1997. パーキンソン病の部分的障害モデルにおけるGDNFの神経保護効果及び再生効果の研究。 *Neurobiol. Dis.* 4, 186 - 200.
- ・ブルームSR、カスDK、ツェンKY. マウスにおける足踏み検査：MPTP誘発性パーキンソン病における前肢無動症を判定する信頼性の高い方法。 *Exp. Neurol.* 2009; 219: 208 - 11.
- ・ボレル-パジェスM., カナルスJ. M., コルドリエレスF. P. ら(2006) シスタミン及びシステアミンは、ハンチントン病においてHSJ1b及びトランスグルタミナーゼを介して脳のBDNFレベルを増加させる。 *J. Clin. Invest.* 116, 1410 - 1424.
- ・ブーケノーゲT., レマクルC. 及びルーゼンスB. (2006) タウリンは、機能的な栄養素であるか? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 728 - 733.
- ・ブーラセットF., チステルニーノS., テムサマニJ. 及びシェルマンJ. M. (2003) 血液脳関門におけるP-糖タンパク質ではなくモルヒネ-6-d-グルクロニドを介した能動輸送の証拠。 *J. Neurochem.* 86, 1564 - 1567.
- ・ブスケM、ジブラットC、セイント-ピエールM、ジュリアンC、カロンF、チケッティF. パーキンソン病の動物モデルにおける-3脂肪酸の作用の潜在的な神経防護作用機序としての脳由来神経栄養因子の調節。 *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2009 Nov 13; 33(8): 1401 - 8. Epub 2009 Jul 24.
- ・ブスケM., ジブラットC., ウレットM., ロイヤールC., カロンF. 及びチケッティF. (2010) シスタミン代謝及び脳輸送特性：神経変性疾患の臨床的意義。 *J. Neurochem.* (2010) 114, 1651 - 1658.
- ・ブスケM、ゲーK、エモンドV、ジュリアンP、カンJX、チケッティF、カロンF. パーキンソン病のマウスモデルにおける-6脂肪酸の-3脂肪酸へのトランスジェニック変換。 *J. Lipid Res.* (2011) Feb; 52(2): 263 - 71. Epub 2010 Nov 29.

10

20

30

40

50

- ・カロン F .、モリセッティ M .、グーレ M .、グロンディン R .、ブランシェット P .、
J .、ベダルト P . J . 及びディ・パオロ T . (1 9 9 9) M P T P 除神経サルの長期的な D 1 及び D 2 ドーパミン模倣薬治療：大脳基底核 G A B A (A) / ベンゾジアゼピン受容体複合体及び G A B A 含有量に対する効果。 *Neurochem. Int* 3 5 , 8 1 - 9 1 .
- ・カロン F . ら、大脳基底核 G A B A (B) 受容体に対する M P T P 誘発性除神経の効果：ドーパミン濃度及びドーパミン輸送体との相関。 *Synapse* 2 0 0 1 , J u n e 1 ; 4 0 (3) : 2 2 5 - 3 4 .
- ・カロン F . ら、レボドパ誘発性運動合併症を伴うパーキンソン病の死後脳における G A B A 受容体及びドーパミン代謝回転の変化。 *Mov Disord.* 2 0 0 3 M a r ; 1 8 (3) : 2 4 1 - 5 3 .
- ・カバリーニ D .、スカンドラ R . 及びデマルコ C . (1 9 6 3) 硫化物の存在下におけるシステアミンのヒポタウリンへの酵素的酸化。 *J. Bio. Chem.* 2 3 8 , 2 9 9 9 - 3 0 0 5 .
- ・コロソ R . M .、ヒルシュベルガー L . L .、ドミニー J . E .、リー J . I . 及びステパヌク M . H (2 0 0 6) システアミンジオキシゲナーゼ：ラット及びマウスの組織におけるシステアミンのヒポタウリンへの生理的変換の証拠。 *Adv. Exp. Med. Biol.* 5 8 3 , 2 5 - 3 6 .
- ・コスタンティニ L C、コールド D、シャツールベディ P、イサクソン O . イムノフィリンリガンドは、パーキンソン病の動物モデルにおける進行性ドーパミン作動性変性を予防できる。 *Eur J Neurosci.* M a r .
- ・コゼット M、パーレン A、レベスク D . ヒト線条体に内在するチロシン水酸化酵素 - 陽性ニューロンは、転写因子 *Nurr1* を発現する。 *Eur J NeuroSci.* 2 0 0 4 ; 2 0 : 2 0 8 9 - 9 5 .
- ・ダゲネス C .、ルーゼル C .、ポラック G . M . 及びシェルマン J . M . (2 0 0 0) インサイチューマウス脳灌流モデルの開発及びその *mdrla* P 糖タンパク質欠損マウスへの応用。 *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2 0 , 3 8 1 - 3 8 6 .
- ・デデオグル A .、クビルス J . K .、ヤイトナー T . M . ら (2 0 0 2) ハンチントン病のマウスモデルにおけるシスタミンの治療効果。 *J. Neurosci.* 2 2 , 8 9 4 2 - 8 9 5 0 .
- ・ドヒル R .、フィドラー M .、ガンゴイチ J . A .、カスケル F .、シュナイダー J . A . 及びパーショップ B . A . (2 0 0 9) シスチン症の子供に対する 1 日 2 回の酒石酸水素システアミン治療。 *J. Pediatr.* 1 5 6 , 7 1 - 7 5 .
- ・ドミニー J .、エラー S . 及びドーソン R . J r (2 0 0 4) 生合成スクールの構築：CNS タウリン合成の区画化の検討。 *Neurochem. Res.* 2 9 , 9 7 - 1 0 3 .
- ・ドミニー J . E . J r、シモンズ C . R .、ヒルシュベルガー L . L .、ウォン J .、コロソ R . M . 及びステパヌク M . H . (2 0 0 7) 第 2 の哺乳類チオールジオキシゲナーゼ、システアミンジオキシゲナーゼの発見及び特性決定。 *J. Biol. Chem.* 2 8 2 , 2 5 1 8 9 - 2 5 1 9 8 .
- ・ドゥピンスキー R . 及びグレイ C . (2 0 0 6) C Y T E - I - H D : ハンチントン病におけるシステアミン (シスタゴン) の第 I 相投与量決定及び忍容性試験。 *Mov. Disord.* 2 1 , 5 3 0 - 5 3 3 .
- ・エウエズ L . 及びソルボ B . (1 9 6 6) ラット肝臓におけるシステインスルフィン酸を形成する酵素系の特性。 *Biochim. Biophys. Acta* 1 2 8 , 2 9 6 - 3 0 5 .
- ・フォックス J . H .、バーバー D . S .、シング B . ら (2 0 0 4) シスタミンは、ハンチントン病トランスジェニックマウス脳及びポリグルタミン凝集の P C 1 2 モデルにおいて L システインレベルを上昇させる。 *J. Neurochem.* 9 1 , 4 1 3 - 4 2

10

20

30

40

50

2 .

- ・フレンチ E . D .、ヴェッツァーニ A .、ウェットセル W . O . Jr . 及びシュバルツ R . (1986) インビボ及びインビトロで試験した、ラット海馬におけるタウリンの抗興奮毒性作用。 *Adv . Exp . Med . Biol .* 203 , 349 - 362 .
- ・ジブラット C .、ブスケ M .、セイント - ピエール M .、レベスク D .、カロン F .、ロイヤール C . 及びチケッティ F . (2010) シスタミンは、脳由来神経栄養因子の上方制御を介して若年成体マウスの MPTP 誘発性毒性を予防する。 *Prog . Neuro psychopharmacol . Biol . Psychiatry* 34 , 193 - 203 .
- ・ジブラット C .、セイント - ピエール M .、ロイヤール C .、チケッティ F . (2007) . パーキンソン病の急性モデル対慢性モデルにおけるシスタミンの神経防護作用特性。 *The Canadian Journal of Neurological Sciences Suppl .* 3 - S42 .
- ・ジブラット C .、ブスケ M .、セイント - ピエール M .、レベスク D .、カロン F .、ロイヤール C .、チケッティ F . 2009 . パーキンソン病のマウスモデルにおけるシスタミンの神経防護作用機序。 *Parkinsonism and Related Disorders* 15 S2 , S29 - S199 .
- ・ジブラット C .、セイント - ピエール M .、ブスケ M .、レベスク D .、ロイヤール C .、チケッティ F . 亜急性と慢性の MPTP マウスモデル間の差：ドーパミン作動性ニューロン変性及びシヌクレイン封入体の研究。 *J Neurochem* (2009B) ; 109 : 1469 - 82 .
- ・グリーン H . (1993) コドンの反復によるヒト遺伝子疾患：進化メカニズムとの関連。 *Cell* 74 , 955 - 956 .
- ・ハックスタブル R . J . (1992) タウリンの生理作用。 *Physiol . Rev .* 72 , 101 - 163 .
- ・イアंक R .、モハベル P .、ブルンディン P .、ポール G . マウスにおけるパーキンソン病の一側性 6 - OHDA - 病変モデルの行動特性決定。 *Behav Brain Res* 2005 ; 162 : 1 - 10 .
- ・ヤイトナー T . M .、デリカトニー E . J .、アルクビスト J .、キャパー H . 及びクーパ A . J . (2005) シスタミンによるトランスグルタミナーゼ 2 の阻害機序。 *Biochem . Pharmacol .* 69 , 961 - 970 .
- ・カープ M . V .、ベシュール M . W .、シュプリングー J . E .、シャバ D .、ユーゼフ S .、ペドッティ R .、ミッチェル D . 及びスタインマン L . (2002) トランスグルタミナーゼ阻害物質であるシスタミン投与による、ハンチントン病のトランスジェニックモデルでの生存期間の延長と異常運動の軽減。 *Nat . Med .* 8 , 143 - 149 .
- ・ラポワント N .、St - ヒレア M .、マルティノリ MG .、ブランシェット J .、グールド P .、ロイヤール C . ら (2004) ロテノンは、非特異的な中枢神経系毒性及び全身毒性を誘導する。 *FASEB J .* 2004 ; 18 : 717 - 9 .
- ・リー J . I .、ロンドーニョ M .、ヒルシュベルガー L . L . 及びスティパヌク M . H . (2004) システインジオキシゲナーゼと グルタミルシステインシンセターゼの調節は肝臓システイン濃度と関係がある。 *J Nutr . Biochem .* 15 , 112 - 122 .
- ・レイン ES .、ハブリリクス MJ . ら、成体マウスの脳における遺伝子発現のゲノム全域アトラス。 *Nature* 2007 ; 445 : 168 - 76 .
- ・レオナルディ R .、チャン Y . M .、ロック C . O . 及びヤコブスキー S . (2005) コエンザイム A : 活動再開。 *Prog . Lipid Res .* 44 , 125 - 153 .
- ・リンドナー MD .、ウィン SR .、ベッジ EE .、ハンマン JP .、ジェンティーレ FT .、ドハーティ E . ら、一側性ドーパミン枯渇及びパーキンソン病様症状を有するラットにおける封入カテコールアミン及び GDNF 産生細胞の移植。 *Exp Neurol* 1995 ; 132 : 62 - 76 . 690 .

10

20

30

40

50

- ・ルンドブラッドM、ピッコニB、リンドグレーンH、チェンチMA．6 - ヒドロキシドーパミン障害マウスにおけるL - DOPA誘発性ジスキネジアのモデル：黒質線条体機能の運動及び細胞パラメータの関係。Neurobiol Dis 2004；16：110 - 23．
- ・マルチグノリM．、グロータスG．M．及びデカンターR．(2006)CYPを介した薬物の代謝、阻害及び誘導についてのマウス、ラット、イヌ、サルならびにヒトの間の種差。Expert Opin Drug Metab Toxicol 2, 875 - 894．
- ・ムラマツM．、カキタK．、ナカガワK．及びキリヤマK．(1978)神経組織からのアセチルコリン及びノルエピネフリンの放出におけるタウリンの調節的役割。Jpn J Pharmacol 28, 259 - 268．
- ・オヤS．S．及びサランサーリP．(1996)脳における浸透圧調節物質及び神経修飾物質としてのタウリン。Metab Brain Dis 11, 153 - 164．
- ・オルデンドルフW．H．及びサボJ．(1976)3つの血液脳関門アミノ酸担体のうちの1つへのアミノ酸の割り当て。Am J Physiol 230, 94 - 98．
- ・ウェレットM．、エモンドV．、チェンC．T．、ジュリアンC．、ブーラセットF．、オッドS．、ラ・フェルラE、バジネットR．P．及びカロンF．(2009)血液脳関門を通したドコサヘキサエン酸及びエイコサペンタエン酸の拡散：ならびにインサイチュー脳灌流研究。Neurochem Int 55, 476 - 482．
- ・パサンテス - モラレスH．、アルザーテN．E．及びクルスC．(1981)神経組織におけるタウリンの役割：イオン流動に対するその効果。Adv Exp Med Biol 139, 273 - 292．
- ・ピントJ．T．、ヴァン・ラームスドンクJ．M．、リービットB．R．、ハイデンM．R．、ヤイトナーT．M．、セイラーH．T．、クラスニコフB．F．及びクーバA．J．(2005)シスタミンによるYAC128マウスとその野生型同腹子の処置は血しょう又は脳内におけるシスタミン蓄積を誘導しない：ハンチントン病の治療への意味合い。J Neurochem 94, 1087 - 1101．
- ・ピントJ．T．、ホメンコT．、サボS．、マクラレーンG．D．、デントンT．T．、クラスニコフB．F．、ヤイトナーT．M．及びクーバA．J．(2009)システアミン及びシスタミンの代謝ならびに輸送に関する含硫黄化合物の測定。脳代謝の領域差。J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 877, 3434 - 3441．
- ・ピタリG．、マウリツィG．、フラティV．、ウルシニC．L．、スペラL．、デュブレS．及びカバリニD．(1992)パンテテインからのS アミノエチル L システインの酵素的合成。Biochim Biophys Acta 1116, 27 - 33．
- ・セラーC．F．及びクズピリナM．J．(1989)ダンシルクロリド誘導体の逆相高速液体クロマトグラフィー及び紫外検出を用いた、アミノ酪酸、グルタミン酸、グリシン及びタウリンの分析。J Chromatogr 487, 167 - 172．
- ・サンタT．、アオヤマC．、フクシマT．、イマイK．及びフナツT．(2006)ベンゾフラザン蛍光試薬、7 フルオロ 2, 1, 3 ベンゾオキサジアゾール 4 スルホネート及び4 アミノスルホニル 7 フルオロ 2, 1, 3 ベンゾオキサジアゾールによる誘導体化後の蛍光検出を伴う高速液体クロマトグラフィーによる還元型チオールの測定におけるチオール交換反応の抑制。Biomed Chromatogr 20, 656 - 661．
- ・シャラートT、フレミングSM、リージョアJL、ティラーソンJL, Bl及びST．脳卒中、皮質切除、パーキンソン病及び脊髄損傷の一側性ラットモデルにおけるCNS可塑性及び前肢感覚運動結果の評価。Neuropharmacology 2000；39：777 - 87．
- ・サーシェンH．及びライタA．(1979)アナログによる阻害パターンは、10個以

10

20

30

40

50

上のアミノ酸輸送系が脳細胞に存在することを示す。J Neurochem 32, 719-726.

・スタック E. C.、フェロ J. L.、キム J.、デル・シニョーレ S. J.、グッドリッチ S.、マトソン S.、ハント B. B.、コーミア K.、スミス K.、マトソン W. R.、リュウ H. 及びフェランテ R. J. (2008) パーキンソン病の神経毒モデルにおけるミトコンドリア機能障害及び酸化ストレスの治療減弱化。Biochim Biophys Acta 1782, 151-162.

・ザ・サン L.、スー S.、チョウ M.、ワン C.、ウー Y. 及びチャン P. (2010) マウスにおける MPTP 誘発性ドーパミン作動性神経変性に対するシステアミンの効果。Brain Res. 1335, 74-82.

・ティラーソン J. L.、コーエン A. D.、フィルハウワー J.、ミラー G. W.、ジグモンド M. J.、シャラート T. 6 ヒドロキシドーパミンによる行動学的及び神経化学的影響に対して、肢の強制使用が与える効果。J Neurosci 2001; 21: 4427-35.

・トランブレ M. E.、セイント・ピエール M.、ポリース E.、レベスク D.、ロイヤール C. 及びチケッティ F. (2006) 加齢パーキンソン病マウスにおけるシスタミンの神経防護作用効果。Neurobiol Aging 27, 862-870.

・ウンゲルステッド, U., 1968. 中枢モノアミンニューロンの 6-ヒドロキシドーパミン誘発性変性。Eur. J. Pharmacol. 5, 5107-5110.

・ウェード L. A. 及びカツマン R. (1975) 合成アミノ酸及び血液脳関門における L-DOPA 輸送の性質。J Neurochem 25, 837-842.

・ウェード L. A. 及びブレディー H. M. (1981) 血液脳関門におけるシステイン及びシスチンの輸送。J Neurochem 37, 730-734.

・ワン X.、サルカール A.、チケッティ F.、ユー M.、チュー A.、ヨーキバルシ K.、セイント・ピエール M. 及びブラウネル A. L. (2005) ハンチントン病のトランスジェニック R6/2 マウスモデルにおけるトランスグルタミナーゼ阻害剤シスタミン誘発性の神経防護作用の脳血管 PET イメージング及び組織学的証拠。J Neurol Sci 231, 57-66.

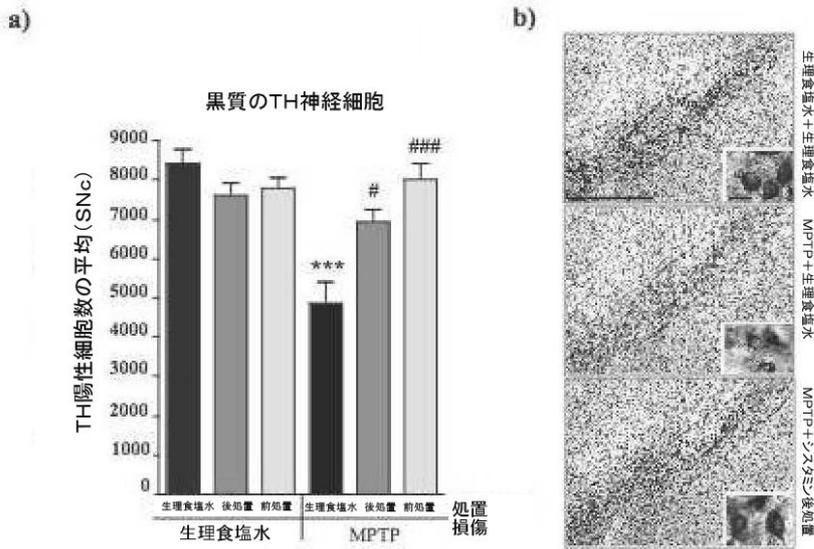
・ゼッターストローム・ロルフ H.、ルドミラ・ソローミン、ロッテ・ヤンソン、バリー・J.、ホフファー、ラーズ・オルソン、トマス・パールマン. Nurr1 欠損マウスにおけるドーパミンニューロン無形成。Science 1997 Apr 11; 276 (5310): 248-50.

10

20

30

【 図 1 】



c)

処置	立体的細胞計数		
	クレシルバイオレット+	TH+	TH+およびクレシルバイオレット+
生理食塩水+生理食塩水	424 ± 77	8414 ± 354	8838 ± 374
生理食塩水+シスタミン後処置	360 ± 96	7605 ± 320	7965 ± 329
生理食塩水+シスタミン前処置	521 ± 85	7804 ± 263	8325 ± 269
MPTP+生理食塩水	653 ± 167	4846 ± 545 ***	5499 ± 465 ***
MPTP+シスタミン後処置	512 ± 81	6925 ± 309 #	7437 ± 329 ###
MPTP+シスタミン前処置	544 ± 104	8037 ± 388 ###	8581 ± 425 ###

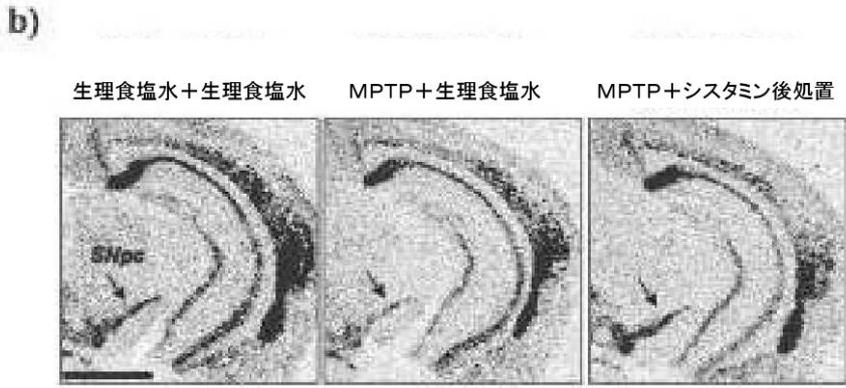
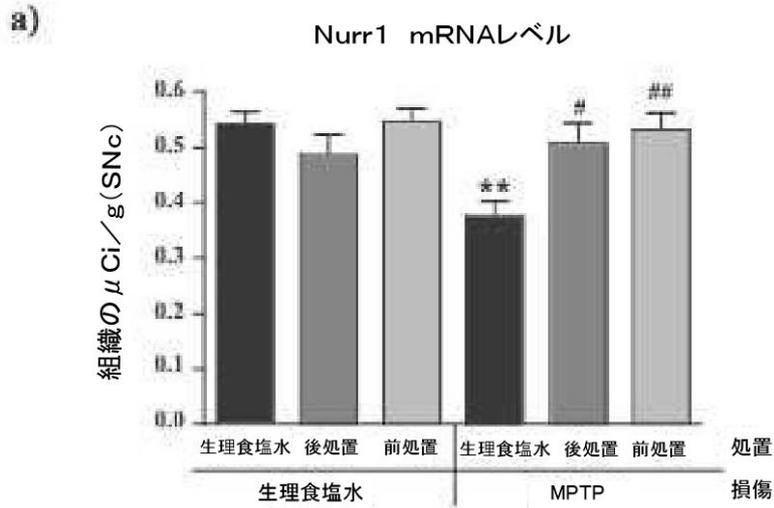
前処置スケジュール



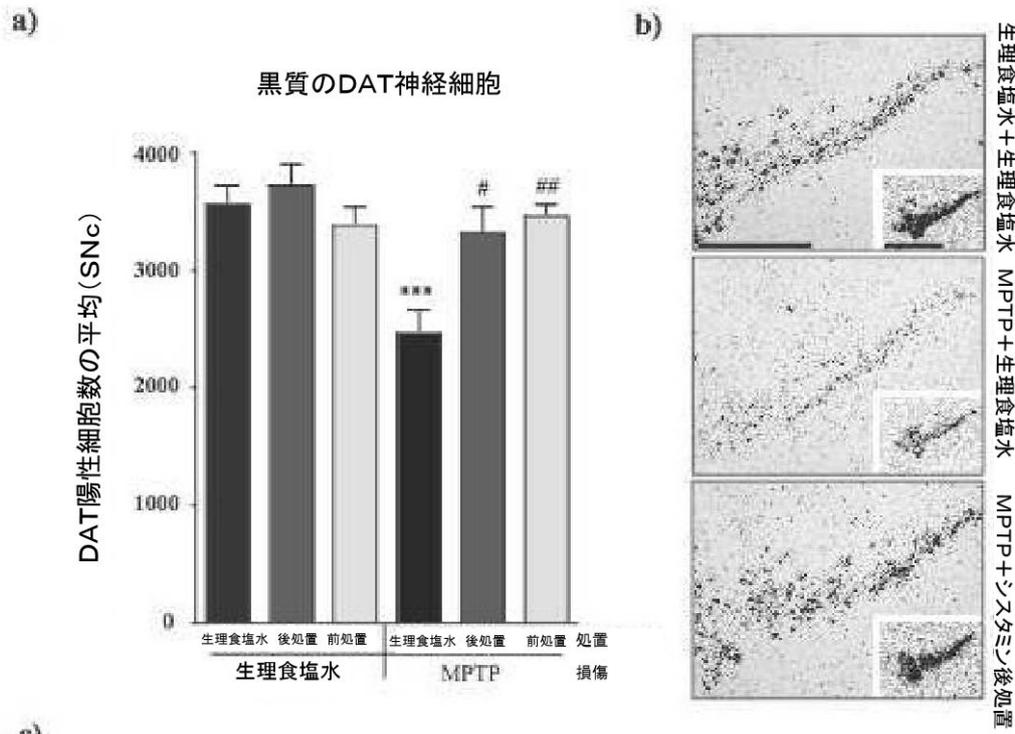
後処置スケジュール



【 図 2 】



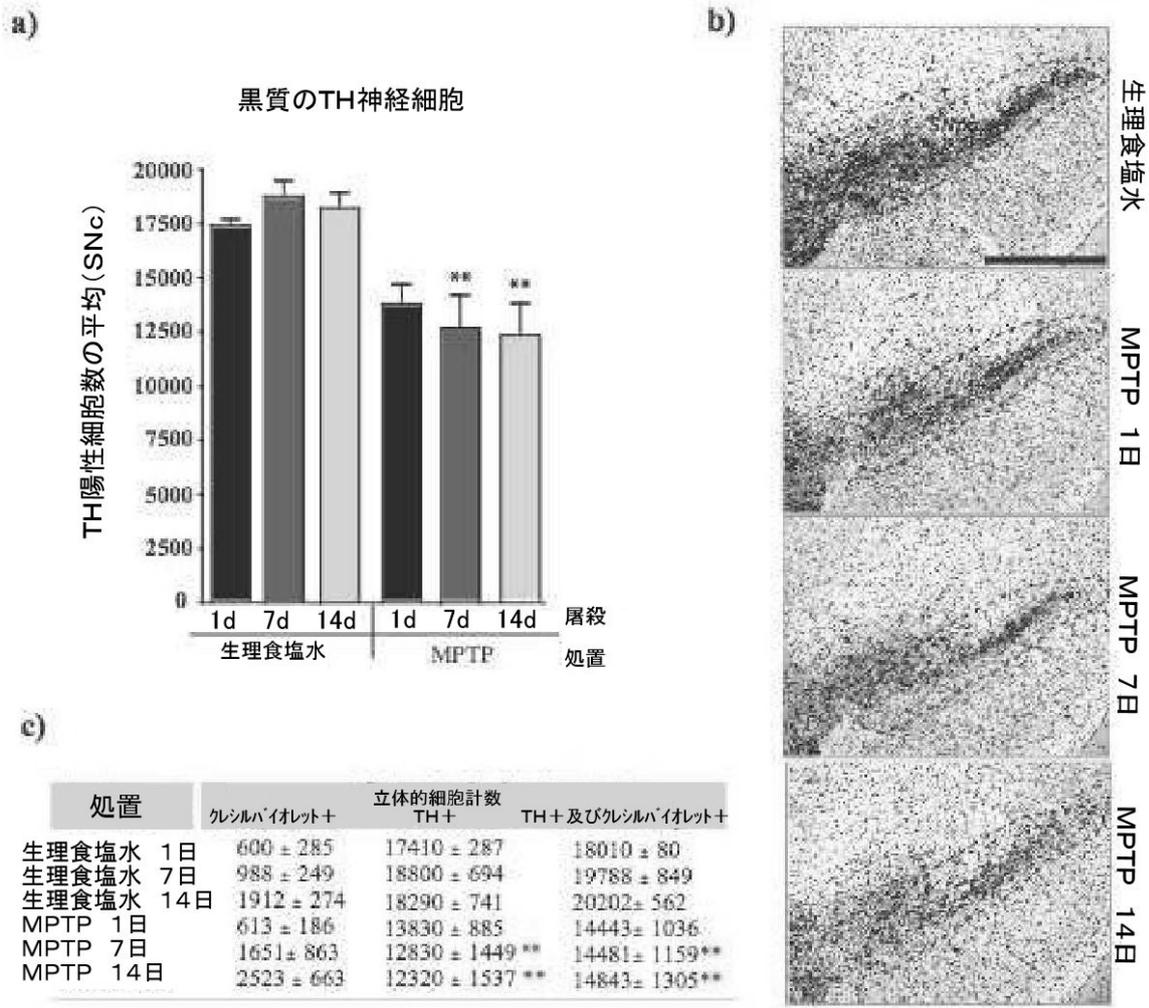
【 図 3 】



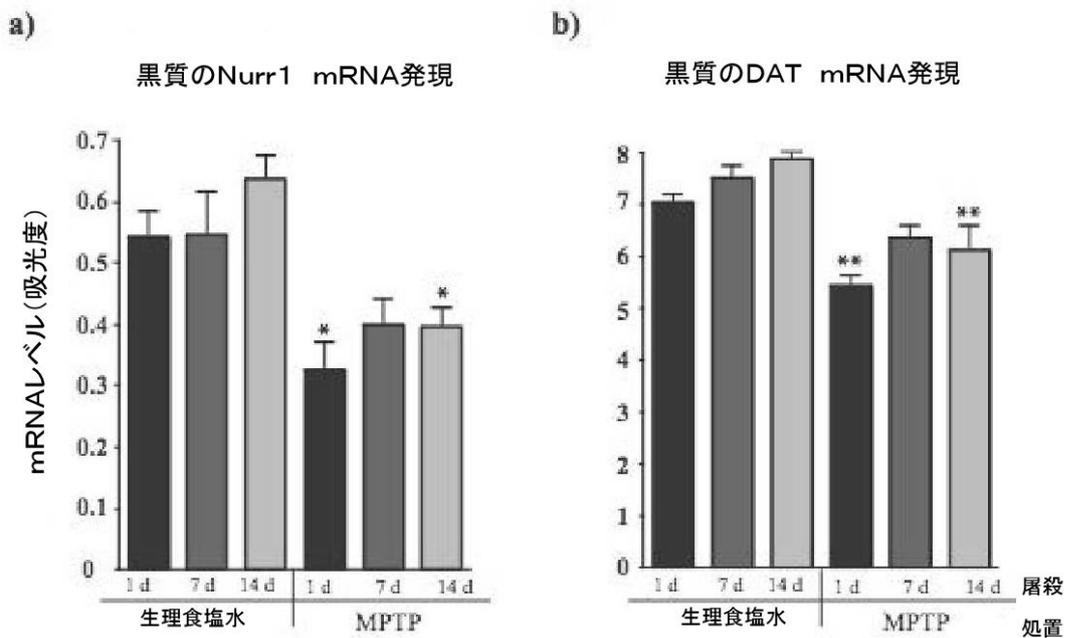
c)

処置	立体的細胞計数	吸光度
生理食塩水 + 生理食塩水	3571 ± 152	2.644 ± 0.1145
生理食塩水 + シスタミン後処置	3724 ± 183	2.554 ± 0.1604
生理食塩水 + シスタミン前処置	3383 ± 153	2.453 ± 0.1522
MPTP + 生理食塩水	2458 ± 210 ^{***}	1.974 ± 0.1342 [*]
MPTP + シスタミン後処置	3325 ± 227 [#]	2.474 ± 0.1534
MPTP + シスタミン前処置	3457 ± 112 ^{##}	2.748 ± 0.1868 ^{###}

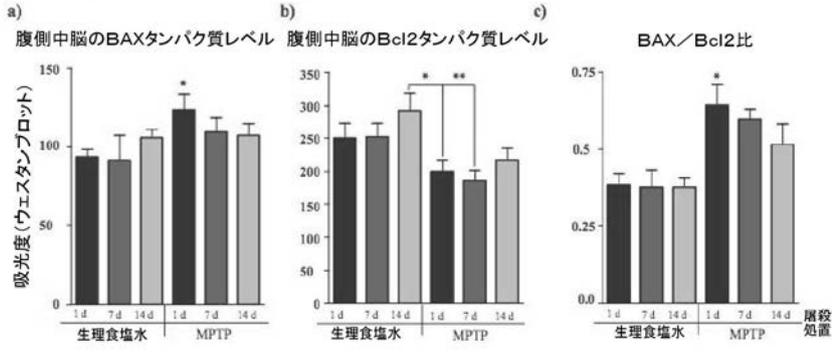
【 図 4 】



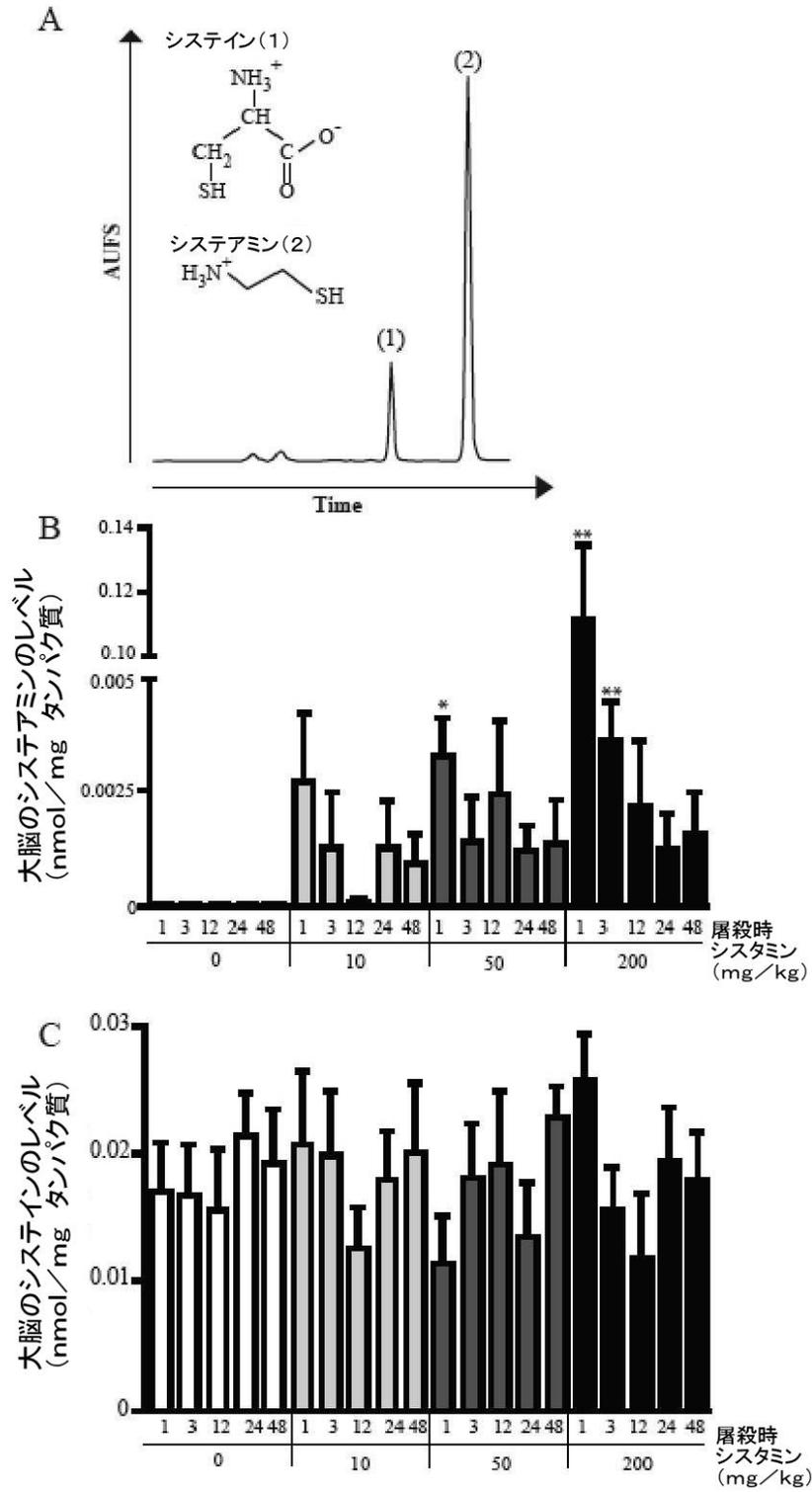
【 図 5 】



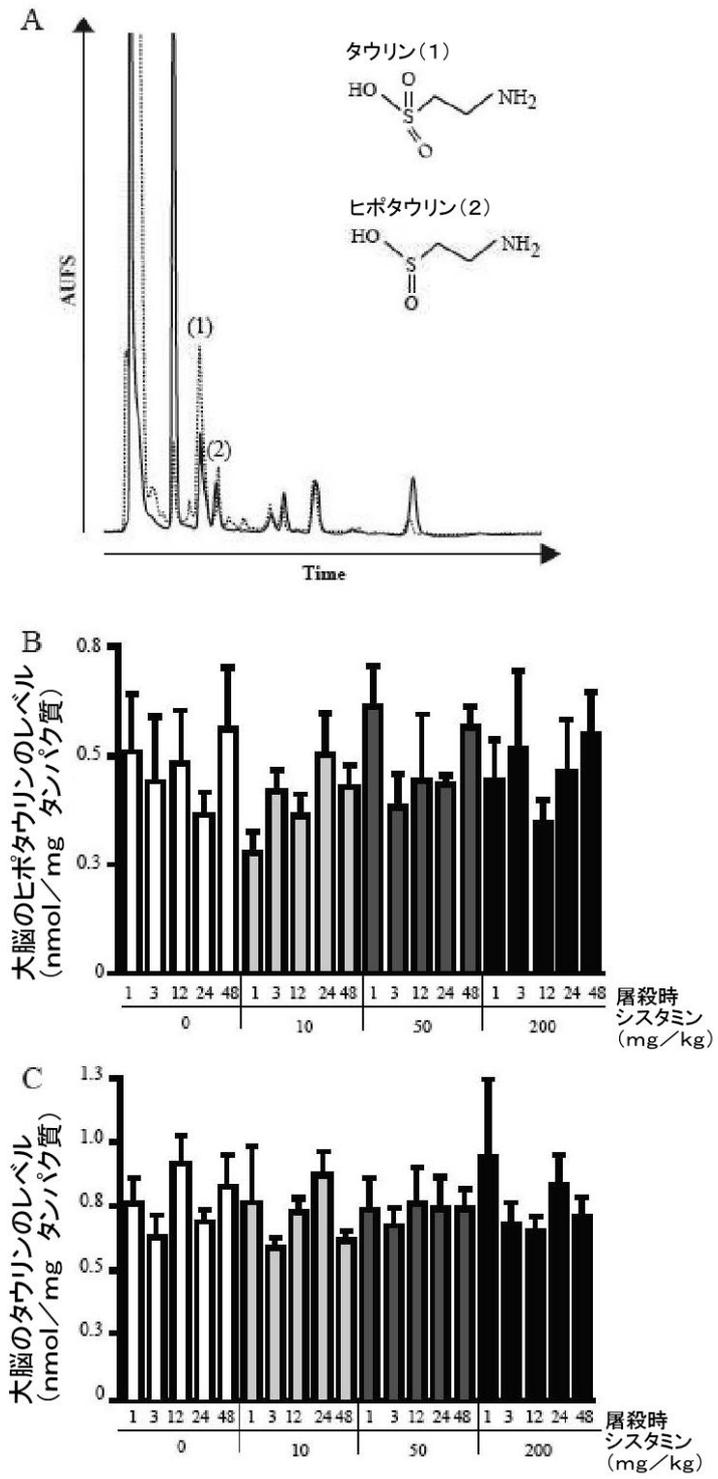
【 図 6 】



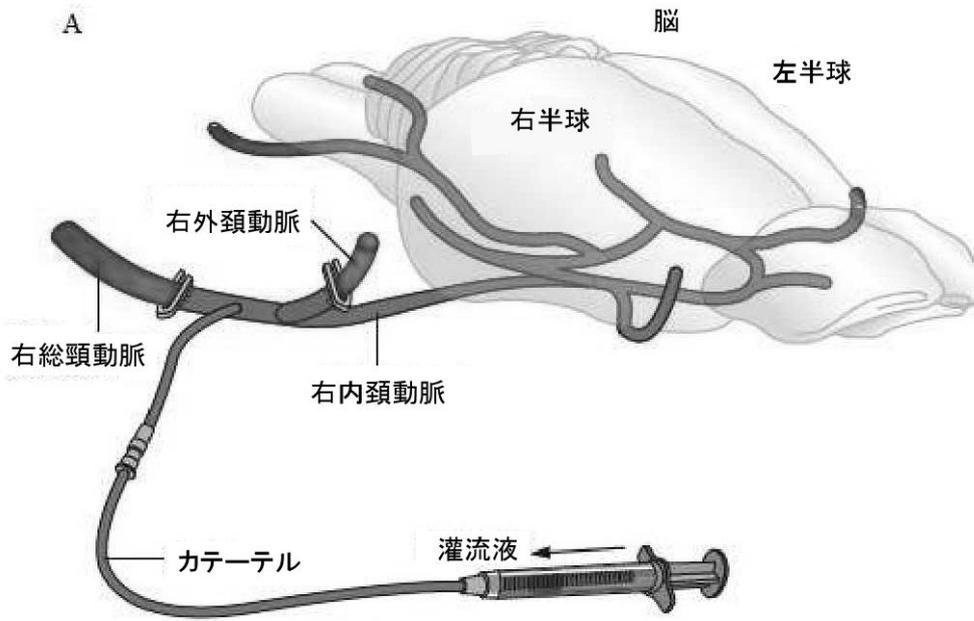
【 図 7 】



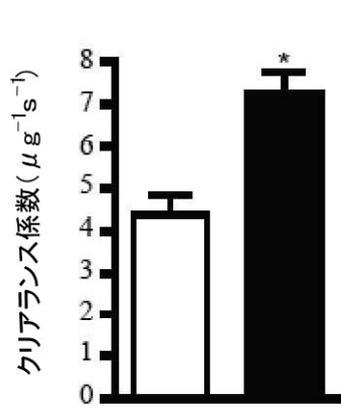
【 図 8 】



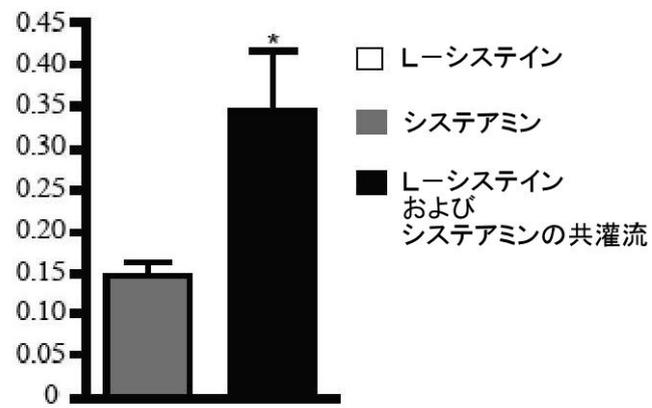
【図9】



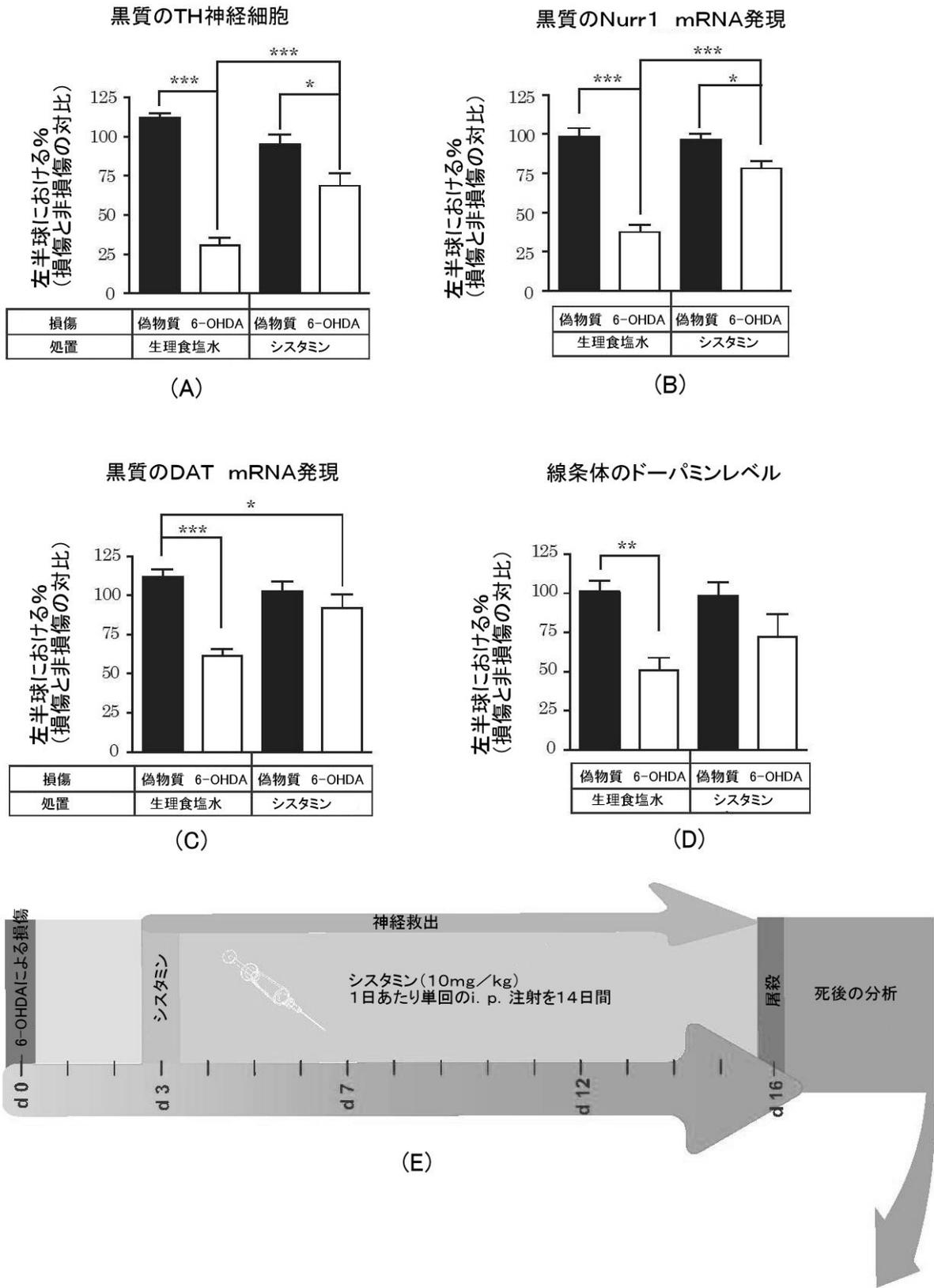
B システインの脳への取り込み



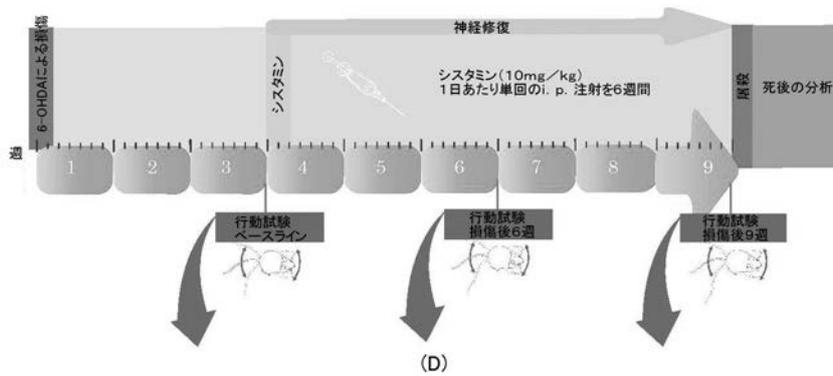
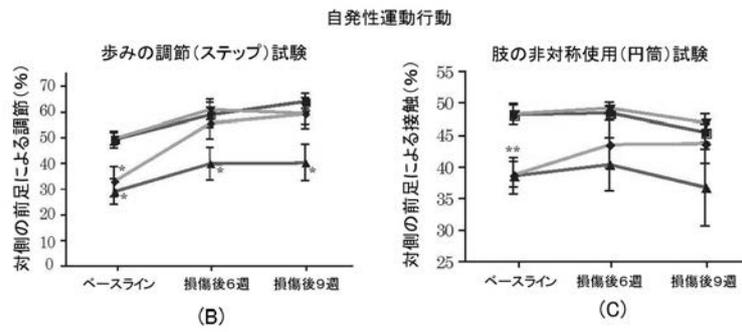
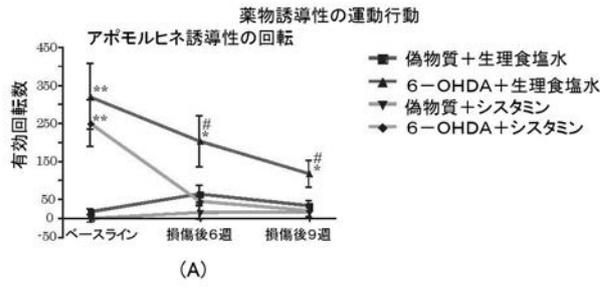
C システアミンの脳への取り込み



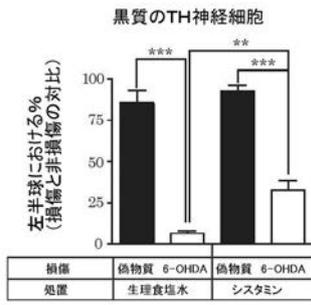
【図 10】



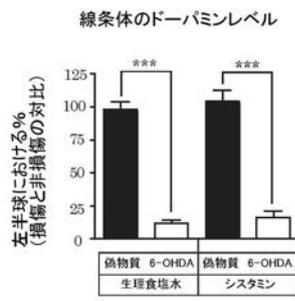
【 図 1 1 】



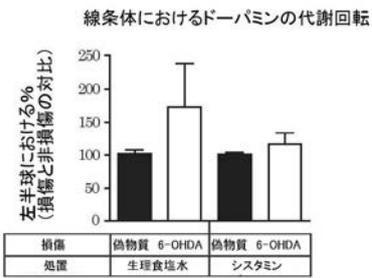
【 図 1 2 】



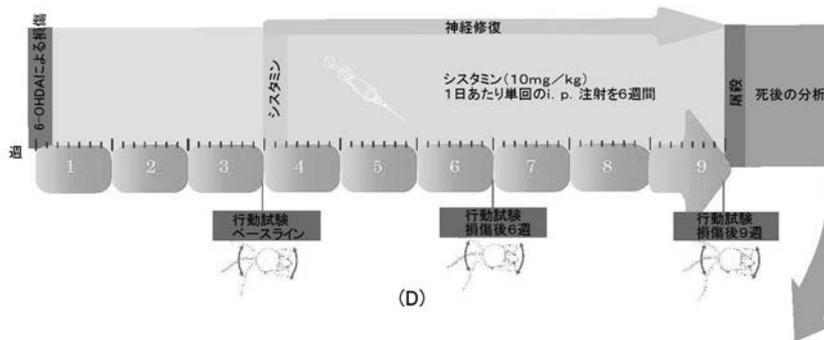
(A)



(B)



(C)



(D)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2012/050106
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 31/145 (2006.01) , A61K 31/185 (2006.01) , A61K 31/198 (2006.01) , A61P 25/28 (2006.01) 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) IPC: A61K 31/145 (2006.01) , A61K 31/185 (2006.01) , A61K 31/198 (2006.01) , A61P 25/28 (2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) STN (Registry File, CAPLUS), EPOQUE, Goggle Scholar, Scopus, TotalPatent, Canadian Patent Database (Intellect) (Search terms: cystamine, cysteamine, taurine, hypotaurine, cysteine, Parkinson's disease)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Bousquet et al., "Cystamine metabolism and brain transport properties: clinical implications for neurodegenerative diseases", Journal of Neurochemistry 114(6), 1651-1658, September 2010. (see the whole document)	1-19, 22-24 and 27-32
X	Gibrat et al., "Potential of cystamine and cysteamine in the treatment of neurodegenerative diseases", Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 35(2), 380-389, March 2011, available online 24 November 2010. (see the whole document)	1-18 and 29-32
X	Gibrat et al., "Cystamine prevents MPTP-induced toxicity in young adult mice via the up-regulation of the brain-derived neurotrophic factor", Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 34(1), 193-203, February 2010. (see the whole document)	1-18 and 29-32
X	Tremblay et al., "Neuroprotective effects of cystamine in aged parkinsonian mice", Neurobiology of Aging 27(6), 862-870, June 2006. (see the whole document)	1-18 and 29-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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 1 May 2012 (01-05-2012)		Date of mailing of the international search report 22 May 2012 (22-05-2012)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Connie Kuang (819) 934-3597

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/050106

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Stack et al., "Therapeutic attenuation of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurotoxin models of Parkinson's disease", <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> 1782(3), 151-162, March 2008. (see the whole document)	1-18 and 29-32
X	Sun et al., "Effects of cysteamine on MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in mice", <i>Brain Research</i> 1335, 74-82, June 2010. (see the whole document)	1-18 and 29-32
X	WO 2004/069175 A2 (MOURADIAN ETAL.) 19 August 2004 (19-08-2004) (see pages 1-5; page 9, 3rd paragraph; page 10, 3rd paragraph; claims 1-2, 4, 11-14, 16-17, 19, 37-38 and 40)	1-11 and 29-32
X	WO 2008/143876 A2 (STOCKWELL ET AL.) 27 November 2008 (27-11-2008) (see claims 1-3, 9, 11, 34-35 and 40)	1-11 and 29-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2012/050106

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO2004069175A2	19 August 2004 (19-08-2004)	CA2514942A1	19 August 2004 (19-08-2004)
		US2006211624A1	21 September 2006 (21-09-2006)
		WO2004069175A3	24 March 2005 (24-03-2005)
WO2008143876A2	27 November 2008 (27-11-2008)	WO2008143876A2	27 November 2008 (27-11-2008)
		WO2008143876A3	22 January 2009 (22-01-2009)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(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, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 ルイヤール、クロード

カナダ国 ジー1シー 6アール3 ケベック、ケベック、リュ フェイド、509

(72)発明者 カロン、フレデリック

カナダ国 ジー1エス 1エス6 ケベック、ケベック、ルネ レヴェック ウエスト、557

Fターム(参考) 4C206 AA01 AA02 JA04 JA52 JA58 MA01 MA02 MA04 NA14 ZA15
ZC75