

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有權機關  
國際事務局



(43) 國際公開日  
2019年5月31日(31.05.2019)

(10) 国際公開番号

WO 2019/103109 A1

- (51) 國際特許分類:  
*A61K 45/00* (2006.01)    *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 31/496* (2006.01)    *A61P 21/02* (2006.01)  
*A61K 31/506* (2006.01)    *G01N 33/15* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)    *G01N 33/50* (2006.01)

(21) 国際出願番号 : PCT/JP2018/043242

(22) 國際出願日： 2018年11月22日(22.11.2018)

(25) 国際出願の言語：日本語五

(26) 国際公開の言語 : 日本語

(30) 優先権データ：  
特願 2017-226368 2017年11月24日(24.11.2017) IP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 井上治久 (INOUE, Haruhisa);  
〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36

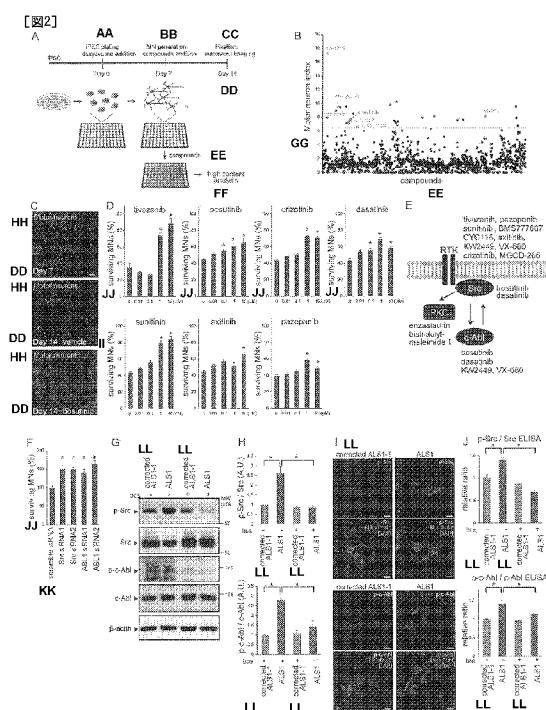
番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).  
今村 恵子(**IMAMURA, Keiko**); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 36 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

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

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)： AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,

**(54) Title:** PROPHYLACTIC AND/OR THERAPEUTIC AGENT FOR AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

(54) 発明の名称： 筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療剤



**FIG. 2:**  
**AA** IPSC plating, doxycycline addition  
**BB** MN generation, compounds addition  
**CC** Fixation, automated Imaging  
**DD** Day  
**EE** compounds  
**FF** high content analysis  
**GG** Motor neuron index  
**HH** Motor neurons  
**II** vehicle  
**JJ** Surviving MNs (%)  
**KK** scramble siRNA  
**LL** corrected AI-S1-1

**(57) Abstract:** The present invention provides a prophylactic and/or therapeutic agent for ALS that comprises an Src/c-Abl pathway inhibitor.

(57) 要約：本発明は、Src/c-Ab1経路阻害薬を含有してなる、ALSの予防及び／又は治療剤を提供する。



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

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て :

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

添付公開書類 :

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

### 発明の名称：筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療剤

#### 技術分野

[0001] 本発明は、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療剤に関する。

#### 背景技術

[0002] 筋萎縮性側索硬化症（以下、「ALS」ともいう。）は中年以降に発症し、骨格筋の進行性麻痺をきたす予後不良な運動ニューロン疾患であり、厚生労働省の特定疾患治療研究対象疾患に指定されている。ALSの約90%以上は孤発性であり原因は不明である。孤発性ALS患者の下位運動ニューロンに見られるユビキチン陽性封入体の成分として43-kDa TAR DNA-結合蛋白（TDP-43）が近年同定され、病因遺伝子として注目されている。一方、残りの10%は家族性であり、その中で、Cu/Zn superoxide dismutase（SOD1）遺伝子やTDP-43遺伝子等の遺伝子の点突然変異が報告されている。この場合、変異SOD1が新たに獲得した細胞毒性が運動ニューロン死を引き起こすとする(gain-of-toxic function) 説が有力である。

[0003] 現在、ALS治療薬として販売されているのは、グルタミン酸受容体のアンタゴニストであってグルタミン酸抑制作用のあるリルゾール（リルテック<sup>TM</sup>、アベンティス）（特許文献1）、および抗酸化剤であるエダラボン（ラジカット<sup>TM</sup>、田辺三菱製薬）のみである。

[0004] 一方、初期化技術を用いて患者由来の細胞より得られた人工多能性幹細胞（iPS細胞）を樹立し、このiPS細胞から病因となる細胞へと分化誘導することで、in vitroで病態の再現ができると考えられている。本発明者らは、SOD1遺伝子に変異を有するALS患者由来の線維芽細胞から樹立したiPS細胞をアストロサイトへ分化誘導し、得られたアストロサイトにおけるSOD1の発現量低下を指標として、ALS治療薬の候補物質をスクリーニングできることを、抗ALS作用が知られているアトルバスタチンを用いて実証した（特許文献2）。さらに、当該スクリーニング系を用いて、マルチキナーゼ阻害薬であり、進行

腎細胞がん治療薬として使用されているソラフェニブを、ALS治療薬の候補物質として同定した（特許文献3）。また、TDP-43遺伝子に変異を有するALS患者から樹立したiPS細胞を運動ニューロン（MN）へ分化誘導し、得られた運動ニューロンにおけるTDP-43の発現量低下、ストレスに対する脆弱性の改善、神経突起長の回復等を指標として、ALS治療薬の候補物質をスクリーニングできることを示した（特許文献4、非特許文献1）。さらに、多能性幹細胞に3種の神経細胞系譜特異的転写因子を導入することにより、患者の病態をよく再現する運動ニューロンを迅速かつ同調的に調製し得ることを見出した（特許文献5）。

このように、iPS細胞由来の神経細胞を用いたALS治療薬のスクリーニング

・薬効評価系は開発され、有望な候補物質（治療薬シーズ）が見出されつつあるが、医薬品としての実用化までにはまだまだ相当な道のりが予想される。

[0005] ところで、昨今見られる新薬開発研究の行き詰まりを開拓する方法として、ドラッグ・リポジショニング（DR）なる新しい研究概念が議論の対象となっている。ヒトでの安全性と体内動態が実績によって既に確認されている既存薬から、新たな薬効を見つけ出し、実用化につなげていこうというものである。多くの既存のデータが使用できるので、開発コストを低く抑えることができ、蓄積されたノウハウと材料（周辺化合物など）が存在するなど、の更なる利点もある。上述のとおり、本発明者らは既に、がん治療薬として使用されているソラフェニブが、新規薬効としてALS治療活性を有することを見出している。本発明者らはまた、既知の化合物ライブラリーから、種々のシグナル伝達経路に関するキナーゼの阻害薬がALS治療活性を有することも見出している（特許文献6）。

[0006] しかしながら、これらのキナーゼ阻害薬は、複数のキナーゼに対して阻害活性を有するマルチキナーゼ阻害薬であることから、どの特定のキナーゼ又はそれが関与するシグナル伝達経路を阻害すれば、ALS治療活性が得られるかは明らかではない。また、これらのキナーゼ阻害薬は、ALSの原因遺伝子によ

って異なる抗ALS活性スペクトルを示すことから、原因遺伝子に関係なく抗ALS活性を示すためには、どのシグナル伝達経路を阻害すればよいのかについても、依然として不明のままである。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0007] 特許文献1：AU 666150 B2

特許文献2：WO 2011/074690

特許文献3：WO 2012/029994

特許文献4：WO 2013/108926

特許文献5：WO 2014/148646

特許文献6：WO 2016/114322

### 非特許文献

[0008] 非特許文献1：Egawa N, et al., Sci. Transl. Med. 2012, 4: 145ra104

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0009] したがって、本発明の目的は、ALSの予防及び／又は治療に真に有効で、かつ原因遺伝子に依らず、いかなる家族性又は孤発性ALSに対しても予防及び／又は治療効果を発揮し得る新規な創薬標的を同定するとともに、当該標的に対して有効で、かつヒトへの安全性が確認されている既存薬を用い、現実的な医薬品としてのALSの予防及び／又は治療剤の開発を加速させることである。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、SOD 1 遺伝子に変異を有するALS患者から樹立したiPS細胞から、上記特許文献5に記載の方法を用いて運動ニューロン（ALS-MN）を迅速かつ同調的に分化誘導し、該運動ニューロンの生存を指標として、既に医薬品として上市されている薬剤を含む既知の化合物ライブラリーから、抗ALS活性を有する化合物をスクリーニングした。その結果、ヒット化合物の半数以

上はSrc/c-Abl経路を標的とすることが明らかとなった。Src又はc-Ablをノックダウンしても、ALS-MNの生存率は上昇した。Src/c-Abl阻害薬は、ALS-MNにおいてオートファジーを促進し、ミスフォールドしたSOD1の蓄積を減少させた。また、Src/c-Abl阻害薬は、TDP-43遺伝子に変異を有する家族性ALS患者、C9orf72遺伝子におけるリピートの伸長を伴う家族性ALS患者、及び孤発性ALS患者から作製したiPS細胞由来の運動ニューロンの生存率も向上させた。さらに、Src/c-Abl阻害薬はALSモデルマウスの生存期間を延長させた。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、Src/c-Abl経路は原因遺伝子に依らず孤発性ALSを含む種々のALSに広く適応可能な収束した治療標的となり得るものと結論し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は以下の通りのものである。

[1] Src/c-Abl経路阻害薬を含有してなる、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療剤。

[2] Src/c-Abl経路阻害薬が、ボスチニブ、ダサチニブ、レバスチニブ、ラドチニブ、チボザニブ、パゾパニブ、スニチニブ、BMS777607、CYC116、アキシチニブ、KW2449、VX-680、クリゾチニブ、MGCD-265、エンザスタウリン、ビスインドリルマレイミドI、サラカチニブ、イマチニブ、ニロチニブ及びそれらの類縁体から選択される、[1]に記載の剤。

[3] Src/c-Abl経路阻害薬が、Src、c-Abl、Srcをリン酸化する受容体チロシンキナーゼ、もしくはプロテインキナーゼCに対する抑制性核酸又は中和抗体である、[1]に記載の剤。

[4] 有効量のSrc/c-Abl経路阻害薬を、予防及び／又は治療を必要とする対象に投与することを含む、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療方法。

[5] Src、c-Abl、Srcをリン酸化する受容体チロシンキナーゼ、もしくはプロテインキナーゼCと試験化合物とを接触させ、該キナーゼのリン酸化を阻害した試験化合物を筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療薬の候補として選択することを含む、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療薬のスクリーニング方法。

## 発明の効果

[0012] 本発明によれば、原因遺伝子に依らず種々の家族性ALS及び孤発性ALSの予防及び／又は治療が可能となる。また、本発明のALS予防及び／又は治療薬は、安全性に関するデータが蓄積されている既存薬を有効成分とするので、臨床応用に向けた開発期間を短縮できることが期待される。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は転写因子を用いたMNの作製とALS-MNのモデリングを示す。A. MN作製のためのプロトコル。スケールバー、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。B. 作製されたMNは、脊髄のMNマーカーHB9、ChAT、およびSMI-32を提示する。スケールバー、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。C. リアルタイムPCR分析は、7日目のHB9およびChATのmRNAレベルの増加を示す（各群は平均士標準誤差、n = 3; スチューデントt検定、\* ; p<0.05）。D. ヒト筋芽細胞、Hu5/E18との共培養。MNの神経突起は、 $\alpha$ -ブンガロトキシン標識アセチルコリン受容体と共に局在した。スケールバー、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。E. 現在のクランプ記録からの活動電位。F. 電気生理学的解析によって評価された、作製されたMN上の機能的神経伝達物質受容体。500  $\mu\text{M}$ のグルタミン酸塩、500  $\mu\text{M}$ のカリニン酸塩、または500  $\mu\text{M}$ のGABAの添加は、電位固定記録中に内向き電流を惹起した。G. 7日目のHB9陽性細胞の割合（各群は平均士標準誤差、n = 3を表す）。H. ALS MNのモデリング。突然変異型SOD1遺伝子を有するMNに蓄積された、ミスフォールドしたSOD1タンパク質。スケールバー、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。I. 突然変異型SOD1 ALS MN培養物中において、ミスフォールドしたSOD1タンパク質の蓄積が、免疫沈降アッセイを用いて示された。J. K. MN生存アッセイ。高含量分析により、7日目および14日目のMN数を計数し、生存しているMNの割合（14日目/7日目（%））を示す。コントロール及び変異修復クローンと比較して、突然変異型SOD1 (L144FVX) の生存率が低下した。（各群は平均士標準誤差、n = 6を示す；一元配置分散分析、p <0.05、\* ; p<0.05）スケールバー、 $10\text{ }\mu\text{m}$ 。

[図2]図2はALS MNを用いた表現型スクリーニング及び治療標的の同定を示す。A. ALS MN生存アッセイについてのスクリーニングフローの概要。B. 変異

型SOD1遺伝子（L144FVX）を有するMNを用いたスループットスクリーニング。既存の薬剤と臨床試験薬からなる1,416種類の化合物をスクリーニングした。散布図は、スクリーニング結果および図2Dに示されるハイライトされた化合物を示す。C. アッセイ結果の代表的な図。ボスチニブ処理は、MNの生存を増加させた。スケールバー、100 μm。D. ヒット薬剤は用量依存的効果を示した（各群は平均±標準誤差、n = 6を表す；一元配置分散分析、p < 0.05、\*；p < 0.05）。E. ヒット薬剤の標的。27のヒット薬剤のうち14が、受容体チロシンキナーゼ（RTK）およびSrc/c-Abl関連シグナル伝達経路に含まれた。PKC；プロテインキナーゼC。F. Srcまたはc-Ablのノックダウンは、突然変異型SOD1 ALS MN（ALS1）の生存率を増加させた（各群は平均±標準誤差、n = 6を表す；一元配置分散分析、p < 0.05、\*；p < 0.05）。G, H. 突然変異型SOD1 ALS MNにおいて、Src/c-Ablのリン酸化が増加し、ウェスタンプロット解析によると、ボスチニブは、このリン酸化阻害した（各群は平均±標準誤差、n = 3を表す；二元配置分散分析、p < 0.05、\*；p < 0.05）。I. MNsにおけるp-Src/p-c-Ablの免疫細胞染色の典型的な図。スケールバー、10 μm。J. ELISAによると、Src/c-Ablのリン酸化の増加は、ボスチニブ処理によって阻害された（各群は平均±標準誤差、n = 3を表す；二元配置分散分析、p < 0.05、\*；p < 0.05）。bos；ボスチニブ。

[図3]図3は、突然変異型SOD1 ALS MNに対する、Src/c-Abl阻害剤の神經保護効果のメカニズム解析を示す。A, B. ボスチニブ処理は、突然変異型SOD1 MN培養物において増加したp62の量を減少させ、LC3-II/LC3-Iの比を減少させた（各群は平均±標準誤差、n = 3を表す；二元配置分散分析；p < 0.05、\*；p < 0.05）。C. ELISAによって、突然変異型SOD1 ALS MNにおけるp62の増加が示され、ボスチニブ処理が、p62の量を減少させた（各群は平均±標準誤差、n = 3を表す；二元配置分散分析；p < 0.05、\*；p < 0.05）。D. ラパマイシンは、突然変異型SOD1 ALS MN（ALS1）の生存率を増加させた（各群は平均±標準誤差、n = 6を表す；一元配置分散分析、p < 0.05、\*；p < 0.05）。E. mTORのノックダウンは、突然変異型SOD1 ALS MN（ALS1）の生存率を増加させた（各群は

平均土標準誤差、n = 6を表す；スチューデントt検定、p <0.05）。F. オートファジー阻害剤、LY294002およびクロロキンは、MN生存アッセイに関するボスチニブの保護効果を減少させた（各群は平均土標準誤差、n = 6を表す；二元配置分散分析、p <0.05、\*；p<0.05）。G, H. 免疫沈降解析（G）およびELISA（H）は、ボスチニブ処理が、突然変異型SOD1 MN培養物において上昇したミスフォールドしたSOD1タンパク質レベルを減少させることを示した。I. ボスチニブ処理は、SOD1 mRNA発現レベルを低下させなかった。J. 細胞内ATPレベルは、突然変異型SOD1 MN培養物において減少した。ボスチニブはATP欠損を部分的に減弱させた（各群は平均土標準誤差、n = 6を表す；二元配置分散分析；p <0.05、\*；p<0.05）。K. 単細胞RNA配列決定の遺伝子セット濃縮解析（GSEA）は、TCAサイクルおよび呼吸電子伝達系における遺伝子の上方制御を示した（コントロール1；n = 10、コントロール2；n = 11、ALS1；n = 23、ALS3；n = 21）。bos;ボスチニブ。

[図4]図4は、異なる遺伝子型を有するiPS細胞由来MN、およびALSモデルマウスに対するSrc/c-Abl阻害剤の効果を示す。A. 7日目の各クローンのiPS細胞由来MN。スケールバー、100 μm。B. ボスチニブは、突然変異型TDP-43媒介家族性ALSおよびC9orf72リピート伸長媒介家族性ALSおよび孤発性ALSの一部のMN生存率を増加させた（各群は平均土標準誤差、n = 6を示す；一元配置分散分析、p <0.05;事後検定、p <0.05）。C. カプランーマイヤー解析は、ボスチニブが、突然変異型SOD1 Tgマウスの疾患発症を遅らせることを示した（ボスチニブ；123.2±9.1日、ビヒクル；112.4±14.4日、平均土標準偏差、ログランク検定、p = 0.0021、群当たりn = 26）。D. カプランーマイヤー解析は、ボスチニブが、突然変異型SOD1 Tgマウスの生存時間を延長することを示した（ボスチニブ；164.1±9.4日、ビヒクル；156.3±8.5日、平均土標準偏差、ログランク検定、p = 0.0019、群当たりn = 26）。E. 12週齢での、脊髄中のミスフォールドしたSOD1タンパク質をELISAにより評価した。ボスチニブは、脊髄におけるミスフォールドしたSOD1の蓄積を減少させた（各群は平均土標準誤差、非トランスジェニック同腹子（非Tg）、n = 3、ビヒクルで処置

したTg、n = 3、ボスチニブで処置したTg、n = 3を表す、一元配置分散分析、 $p < 0.05$ ；事後検定、 $p < 0.05$ ）。F. 後期症候段階の腰椎からの腹側角のクレシルバイオレット染色切片の典型的な画像。スケールバー、 $50 \mu\text{m}$ 。G. 腰椎脊髄の片側にあるMNの数を定量した（各群は平均±標準誤差、非Tg、n = 4、ビヒクリで処理したTg、n = 5、ボスチニブで治療したTg、n = 5を表す、一元配置分散分析； $p < 0.05$ 、\*； $p < 0.05$ ）。bos；ボスチニブ。

[図5]図5はコントロールおよびALS患者由来のiPS細胞の作製を示す。A. SOD1遺伝子変異を有する家族性ALS患者、TDP-43遺伝子変異を有する家族性ALS患者、C9orf72リピート配列の伸長を有する家族性ALS患者、及び孤発性ALS患者からiPS細胞を作製した。作製したiPS細胞は、胚性幹細胞（ESC）様の形態（位相像）を示し、多能性幹細胞マーカーであるNANOGおよびSSEA4を発現した。スケールバーは $100 \mu\text{m}$ 。核型分析により、作製したiPS細胞は正常な核型を保つことが明らかになった。B. iPS細胞、ESC (H9)、HDFおよびPBMCにおける網羅的遺伝子発現解析。19細胞株の対になったサンプルについて、ピアソンの相関係数を計算した。値を左上のカラースケールにより示す。C. ピアソンの相関係数に基づく平均連結法およびディスタンス メトリック (distance metric) を用いて、RMAサマライズド マイクロアレイ データ (RMA-summarized microarray data) の階層的クラスタリングを行った。D. 各網羅的遺伝子プロファイルのピアソンの相関係数。

[図6]図6は、ALS-MNのモデリングのためのMNのキャラクタリゼーションおよびSOD1変異iPS細胞の遺伝子修復を示す。A. 作製したMNは、TrkA、TrkB、TrkCおよびGFR $\alpha$ 1のmRNAを発現した（各群において、mean ± SEM、n = 3；スチューデントt検定、\*  $p < 0.05$ である）。B. 作製したMNは、TrkA、TrkB、TrkCおよびGFR $\alpha$ 1のタンパク質を発現したことがウエスタンブロッティングにより示された。C. 作製したMNは、NR1、NR2、gluR1およびgluR2のmRNAを発現した（各群において、mean ± SEM、n = 3；スチューデントt検定、\*  $p < 0.05$ である）。D. CRISPR-Cas9システムを用いてALS1における変異 (SOD1 L144FVX) を修復した（修復したALS1-1、修復したALS1-2）。CRISPR-Cas9は、二本鎖

切断を生じ、修復された配列とピューロマイシン耐性カセットとを有するターゲッティングプラスマミドによる相同組換えを誘導した。ターゲッティングに成功後、*piggyBac*トランスポザーゼの一過性の発現によってピューロマイシン耐性カセットを除去した。E. 正確に標的とされたクローンを選択するためのPCR遺伝子型決定。F. サンガーシーケンス解析により、遺伝子編集後の変異の修復が明らかになった。G. 7日目における、HB9およびDAPIの免疫染色。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。HおよびI. ミスフォールドしたSOD1の蓄積を評価した。図1H、Iと一致して、SOD1遺伝子の変異を有する異なる患者由来のALS2 MNにおけるミスフォールドしたSOD1タンパク質の蓄積は明らかである。しかし、修復したSOD1変異を有する第2のクローン（修復したALS1-2）は、ミスフォールドしたSOD1を示さなかった。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ 。J. ほぼ100%の $\beta$ III-チューブリン陽性ニューロンがHB9を発現した。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。K. MN生存試験の生データ。最適化された蛍光レベルにより、神経突起（赤）および細胞体（青）を検出した。神経突起を有する細胞体の数を、生存している神経の数として定義した。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。

[図7]図7は、Src/c-Ablインヒビターの効果の調査を示す。A. 他のSrc/c-Ablインヒビターであるサラカチニブ、イマチニブおよびニロチニブは、MNの生存を増加させた（各群において、mean  $\pm$  SEM、n = 6；一元配置分散分析：p < 0.05、\*；p < 0.05である）。B. 野生型Src（上）または野生型c-Abl（下）のsiRNA耐性型をiPS細胞に導入した。C. 野生型Srcおよび野生型c-AblのsiRNA耐性型は、Src siRNAおよびc-Abl siRNAの効果をそれぞれ阻害した（各群において、mean  $\pm$  SEM、n = 6、n.s.である）。D. 100日目における、iPS細胞由来星状細胞の分化の免疫染色。スケールバーは100  $\mu\text{m}$ 。EおよびF. Srcのリン酸化は、SOD1変異ALS星状細胞において100日目に増加し、ボスチニブはリン酸化を阻害した（各群において、mean  $\pm$  SEM、n = 3；二元配置分散分析：p < 0.05, \*p < 0.05である）。c-Ablのリン酸化は、SOD1変異ALS星状細胞において増加しなかった（n = 3）。GおよびH. Srcのリン酸化は、SOD1変異ALS iPS細胞において増加し、ボスチニブはリン酸化を阻害した（各群において

、mean ± SEM、n = 3; 二元配置分散分析: p<0.05, \*p<0.05である）。c-Ab Iのリン酸化は、SOD1変異ALS iPS細胞において増加しなかった（n = 3）。

[図8]図8は、単一細胞分析における、ボスチニブ処理によるmRNA発現の変化を示す。72時間ボスチニブ処理した、または処理していないALS1 MNについて単一細胞分析を行った。mRNA発現はTCAサイクルに関連しており、ボスチニブ処理したMNにおける電子伝達は、未処理のMNと比較して減少した（GSEA: FDR = 0.07、vehicleで処理したALS1: n = 23; ボスチニブで処理したALS1: n = 25）。

[図9]図9は、ボスチニブ処理によるミスフォールドしたタンパク質の減少を示す。A. ボスチニブは、還元条件下で、変異TDP-43関連ALS MNにおいて、非還元条件下で、ミスフォールドしたTDP-43を減少させたことが、ウエスタンプロッティングによって示された。B. ボスチニブは、C9orf72リピート配列の伸長に関連するALS MNにおけるRAN（抗GPリピート抗体）を減少させたことがドットプロット分析において示された（各群において、mean ± SEM、n = 3; 二元配置分散分析: p<0.05, \*p<0.05である）。C. ボスチニブは、還元条件下で、孤発性ALS MNにおける断片化したTDP-43を減少させたこと、および孤発性ALS MNにおいて、非還元条件下で、ミスフォールドしたTDP-43を減少させたことが、ウエスタンプロッティングによって示された。D. ボスチニブは、SOD1変異Tgマウスの脊髄におけるSrc/c-Ablを阻害した（各群において、mean ± SEM、n = 3; スチューデントt検定、\*; p<0.05である）。

[図10]図10は、ALS患者の脊髄の調査を示す。A. リン酸化されたSrcの免疫活性は、ALS患者の脊髄のMNにおいて増加した。スケールバーは10 μm。B. ヒト脊髄サンプルを用いてELISAにより、Src/c-Ablのリン酸化を調査した。ALS患者の脊髄におけるSrcのリン酸化は、コントロールと比べて統計的な有意差は無かったが、増加傾向にあった。ALS患者の脊髄におけるc-Ablのリン酸化は、コントロールと比べて有意に増加した。各群において、mean ± SEM、コントロール n = 12、ALS患者 n = 9; スチューデントt検定、\*; p<0.05であ

る。

### 発明を実施するための形態

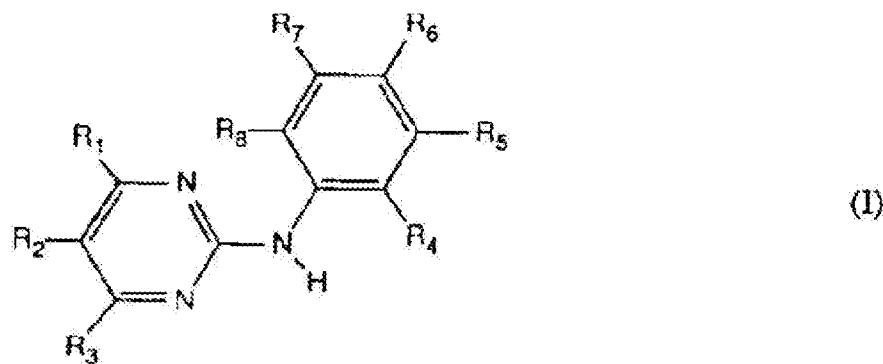
- [0014] 本発明は、Src/c-Abl経路阻害薬を含有してなる、筋萎縮性側索硬化症（ALS）の予防及び／又は治療剤（以下、「本発明の予防／治療剤」ともいう。）を提供する。
- [0015] 本発明において、治療対象となるALSは、孤発性及び家族性のいずれのALSも包含される。家族性ALSの場合、原因遺伝子は特に制限されず、SOD1、TDP-43、C9orf72、alsin、SETX、FUS/TLS、VAPB、ANG、FIG4、OPTN、ATXN2、DAO、UBQLN2、PFN1、DCTN1、CHPM2B、VCP等をはじめとする任意の既知原因遺伝子であり得る。一実施態様において、SOD1変異を有する家族性ALSの場合、当該SOD1遺伝子変異としては、SOD1タンパク質の144番目のLeuがPhe-Val-Xaa（Xaaは任意のアミノ酸を示す）に置換される変異（SOD1-L144FVX）、93番目のGlyがSerに置換される変異（SOD1-G93S）、106番目のLeuがValに置換される変異（SOD1-L106V）等が挙げられるが、これらに限定されない。別の一実施態様において、TDP-43変異を有する家族性ALSの場合、当該TDP-43遺伝子変異としては、TDP-43 タンパク質の337番目のMetがValに置換される変異（TDP-43-M337V）、343番目のGlnがArgに置換される変異（TDP-43-Q343R）、298番目のGlyがSerに置換される変異（TDP-43-G298S）等が挙げられるが、これに限定されない。さらに別の一実施態様において、C9orf72変異を有する家族性ALSの場合、当該C9orf72遺伝子変異としては、イントロン1中の(GGGGCC)<sub>n</sub>リピートの異常伸長が挙げられるが、これに限定されない。
- [0016] 本明細書において「Src/c-Abl経路」とは、図2Eに示される、Src、c-Abl、Srcを基質としてリン酸化する受容体型チロシンキナーゼ（RTK）及びプロテインキナーゼC（PKC）が関与するシグナル伝達経路（図中、矢印はリン酸化反応を示す。）を意味する。本発明の予防／治療剤の有効成分であるSrc/c-Abl経路阻害薬は、Src/c-Abl経路を構成する上記キナーゼの少なくとも1つの活性及び／又は発現を阻害する限り、微生物等由来の天然物質、それから誘導される半合成物質、及び全合成化合物のすべてが含まれる。

[0017] 例えば、Src/c-Abl経路阻害薬として、ボスチニブ (bosutinib) 、ダサチニブ (dasatinib) 、レバスチニブ (rebastinib) 、ラドチニブ (radotinib) 、チボザニブ (tivozanib) 、パゾパニブ (pazopanib) 、スニチニブ (sunitinib) 、BMS777607、CYC116、アキシチニブ (axitinib) 、KW2449、VX-680、クリゾチニブ (crizotinib) 、MGCD-265、エンザスタウリン (enzastaurin) 、ビスインドリルマレイミドI (bisindolylmaleimide I) 、サラカチニブ (sarakinib) 、イマチニブ (imatinib) 、ニロチニブ (nilotinib) 及びそれらの類縁体などの低分子化合物が挙げられる。これらのうち、bosutinib、dasatinib及びrebastinibはSrcとc-Ablの両方を阻害し、radotinib、tivozanib、pazopanib、sunitinib、BMS777607、CYC116、axitinib、KW2449、VX-680、crizotinib及びMGCD-265はRTKを阻害し、enzastaurin及びbisindolylmaleimide IはPKCを阻害する。

[0018] Bosutinibの類縁体、tivozanibの類縁体、pazopanibの類縁体、sunitinibの類縁体、axitinibの類縁体及びcrizotinibの類縁体としては、上記特許文献6に記載の化合物をそれぞれ例示することができる。

[0019] imatinibの類縁体としては、下記式(1)：

[0020] [化1]



[0021] [式中：

R<sub>1</sub> は4-ピラジニル、1-メチル-1H-ピロリル、アミノーもしくはアミノー低級アルキル-置換化フェニル〔ここで各ケースにおけるアミノ基は遊離、アルキル化もしくはアシル化されている〕、5員環の炭素原子にて結合した1H-インドリルもしくは1H-イミダゾリルであるか、又は環の炭素

原子にて結合し、且つ窒素原子にて酸素によって置換されているかもしくは置換されていない、未置換もしくは低級アルキル置換化ピリジルであり、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はそれぞれ互いに独立して水素又は低級アルキルであり、基R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>及びR<sub>8</sub>のうちの1又は2個の基はそれ respectiveニトロ、フルオロー置換化低級アルコキシであるか、又は次式（II）の基

[0022] [化2]



[0023] [式中、R<sub>9</sub>は水素又は低級アルキルであり、Xはオキソ、チオ、イミノ、N—低級アルキル—イミノ、ヒドロキシイミノ又はO—低級アルキル—ヒドロキシイミノであり、Yは酸素又は基NHであり、nは0又は1であり、そしてR<sub>10</sub>は少なくとも5個の炭素原子を有する脂肪族基であるか、又は芳香族、芳香族—脂肪族、脂環式、脂環式—脂肪族、複素環もしくは複素環—脂肪族基である]であり、そして残りの基R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>及びR<sub>8</sub>はそれぞれ互いに独立して水素であるか、未置換であるか又は遊離もしくはアルキル化アミノ、ピペラジニル、ピペリジニル、ピロリジニルもしくはモルホリニルにより置換された低級アルキルであるか、又は低級アルカノイル、トリフルオロメチルであるか、遊離、エーテル化もしくはエステル化ヒドロキシであるか、遊離、アルキル化もしくはアシル化アミノであるか、又は遊離もしくはエステル化カルボキシである]で表される化合物が挙げられる。

[0024] 上記式（II）の各基の説明において上位概念として記載される各用語（例えば、「低級アルキル」、「少なくとも5個の炭素原子を有する脂肪族基」等）やその他の用語は、特開平6-087834における定義に従う。

[0025] imatinibの類縁体の具体的な例としては、以下の化合物が挙げられる。

N-(3-ニトロフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(4-クロロベンゾイルアミド)-フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-(3-ベンゾイルアミド)フェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピ

リミジンーアミン；

N-[3-(2-ピリジル)カルボキサミドフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(3-ピリジル)カルボキサミドフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(4-ピリジル)カルボキサミドフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-(3-ペンタフルオロベンゾイルアミドフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(2-カルボキシベンゾイルアミド)フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-(3-n-ヘキサノイルアミドフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-(3-ニトロフェニル)-4-(2-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-(3-ニトロフェニル)-4-(4-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(2-メトキシベンゾイルアミド)フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(4-フルオロベンゾイルアミド)フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(4-シアノベンゾイルアミド)フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-[3-(2-チエニルカルボキサミド)フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジンーアミン；

N-(3-シクロヘキシルカルボキサミドフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピジンーアミン；

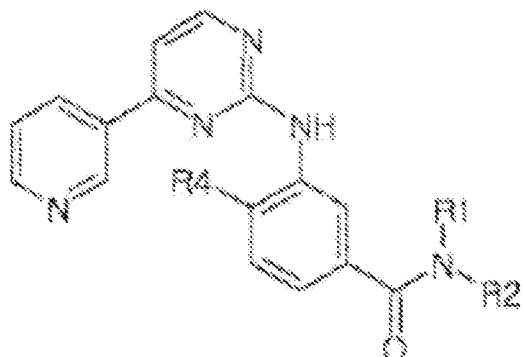
N-[3-(4-メチルベンゾイルアミド)フェニル]-4-(3-ピ

リジル) -2-ピリミジン-アミン；  
N-[3-(4-クロロベンゾイルアミド)-フェニル]-4-(4-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-[3-[4-(4-メチル-ピペラジノメチル)-ベンゾイルアミド]-フェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-(5-ベンゾイルアミド-2-メチルフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-[5-[4-(4-メチル-ピペラジノ-メチル)-ベンゾイルアミド]-2-メチルフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-[5-(4-メチル-ベンゾイルアミド)-2-メチルフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-[5-(2-ナフトイルアミド)-2-メチルフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-[5-(4-クロロ-ベンゾイルアミド)-2-メチルフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-[5-(2-メトキシ-ベンゾイルアミド)-2-メチルフェニル]-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-(3-トリフルオロ-メトキシフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-(3-[1, 1, 2, 2-テトラフルオロエトキシ]-フェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-(3-ニトロ-5-メチルフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-(3-ニトロ-5-トルフルオロメチルフェニル)-4-(3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；  
N-(3-ニトロフェニル)-4-(N-オキシド-3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン；

N-(3-ベンゾイル-アミド-5-メチルフェニル)-4-(N-オキシド-3-ピリジル)-2-ピリミジン-アミン

[0026] nilotinibの類縁体としては、下記式：

[0027] [化3]



[0028] [式中：

R<sub>1</sub>は水素、低級アルキル、低級アルコキシ-低級アルキル、アシルオキシ-低級アルキル、カルボキシ-低級アルキル、低級アルコキカルボニル-低級アルキルまたはフェニル-低級アルキルを示し；

R<sub>2</sub>は水素、所望により1個もしくはそれ以上の同一もしくは相異なる残基R<sub>3</sub>で置換されていてもよい低級アルキル、シクロアルキル、ベンズシクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール基、または環の窒素原子0個、1個、2個もしくは3個および酸素原子0個もしくは1個および硫黄原子0個もしくは1個を有する単環もしくは双環のヘテロアリール基を示す、ここに各基はいずれも非置換であるかまたはモノーもしくはポリ置換されている；そして

R<sub>3</sub>はヒドロキシ、低級アルコキシ、アシルオキシ、カルボキシ、低級アルコキカルボニル、カルバモイル、N-モノーもしくはN,N-ジ置換カルバモイル、アミノ、モノーもしくはジ置換アミノ、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリール基、または環の窒素原子0個、1個、2個もしくは3個および酸素原子0個もしくは1個および硫黄原子0個もしくは1個を有する単環もしくは双環のヘテロアリール基を示す、ここに各基はいずれも非置換であるかまたはモノーもしくはポリ置換されている；または

R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は一体となって、所望により低級アルキル、シクロアルキル、

ヘテロシクリル、フェニル、ヒドロキシ、低級アルコキシ、アミノ、モノーもしくはジ置換アミノ、オキソ、ピリジル、ピラジニルもしくはピリミジニルでモノーもしくはジ置換されていてもよい、炭素原子4個、5個もしくは6個を有するアルキレン；炭素原子4個もしくは5個を有するベンズアルキレン；または酸素1個および炭素原子3個もしくは4個を有するオキサアルキレン；あるいは窒素が非置換であるかまたは低級アルキル、フェニルー低級アルキル、低級アルコキシカルボニルー低級アルキル、カルボキシー低級アルキル、カルバモイル低級アルキル、N—モノーもしくはN,N—ジ置換カルバモイル低級アルキル、シクロアルキル、低級アルコキシカルボニル、カルボキシ、フェニル、置換フェニル、ピリジニル、ピリミジニルもしくはピラジニルで置換された、窒素1個および炭素原子3個もしくは4個を有するアザアルキレンを示し；そして

R<sub>4</sub>は水素、低級アルキルまたはハロゲンを示す]

で表される化合物が挙げられる。

[0029] 上記式(I-V)の各基の説明において上位概念として記載される各用語（例えば、「低級アルキル」、「ハロゲン」等）やその他の用語は、WO 2004/005281（特表2005-533827）における定義に従う。

[0030] nilotinibの類縁体の具体的な例としては、以下の化合物が挙げられる。

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] ] アミノベンズアニリド；

4-メチル-N-(3-ピリジニル)-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；

N-(4-クロロフェニル)-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；

2(R)-および2(S)-[4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンゾイルアミノ] プロパン酸；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(8-キノリニル)ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(3-[トリフルオロメトキシ]フェニル)ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(2-ピロリジノエチル)ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(3-ピロリジノフェニル)ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(1-[2-ピリミジニル]-4-ピペリジニル)ベンズアミド；  
N-(4-ジ[2-メトキシエチル]アミノ-3-トリフルオロメチルフェニル)-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]ベンズアミド；  
N-(4-[1H-イミダゾリル]-3-トリフルオロメチルフェニル))-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(2-ピロリジノ-5-トリフ N-(3,4-ジフルオロフェニル))-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-(3-トリフルオロメチルフェニル)ベンズアミド；  
N-(3-クロロ-5-トリフルオロメチルフェニル)-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]ベンズアミド；  
N-(4-ジエチルアミノブチル)-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]ベンズアミド；  
4-メチル-N-[4-(4-メチル-1-ピペラジニル)-3-トリフル

オロメチルフェニル] - 3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2 - ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] - N - [4 - (2, 2, 2-トリフルオロエトキシ) - 3-トリフルオロメチルフェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-N - [4 - (2-メチル-1H-イミダゾリル) - 3-トリフルオロメチルフェニル] - 3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-N - (4-フェニル-3-トリフルオロメチルフェニル) - 3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-N - [4 - (4-メチル-1H-イミダゾリル) - 3-トリフルオロメチルフェニル] - 3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
2 (R) - および2 (S) - [4-メチル-3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンゾイルアミノ] - 3 - [4-ヒドロキシフェニル] プロパン酸メチル；  
N - [2 - (N-シクロヘキシル-N-メチルアミノメチル) フェニル] - 4-メチル-3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
N - [3 - [2 - (1H-イミダゾリル) エトキシ] フェニル] - 4-メチル-3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-N - [3-モルホリノ-5-トリフルオロメチルフェニル] - 3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-3 - [ [4 - (3-ピリジニル) 4-メチル-3 - [ [4 - (3-ピリジニル) - 2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；

N-(4-ジエチルアミノ-3-トリフルオロメチルフェニル)-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[3-(3-ピリジニル)-5-トリフルオロフェニル] ベンズアミド；  
N-[3-[3-(1H-1-イミダゾリル) プロポキシ] フェニル]-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(3-ピリジニル)-3-トリフルオロフェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-N-[3-(4-メチル-1-ピペラジニル)-5-トリフルオロフェニル]-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-N-[3-メチルカルバモイル-5-トリフルオロフェニル]-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ] ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[3-[3-(1H-イミダゾール-1-イル) プロポキシ] フェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[3-[2-(1H-イミダゾール-1-イル) エトキシ] フェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(エチルアミノ)-3-(トリフルオロメチル) フェニル]

ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(ジエチルアミノ)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

(±)-4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-[ (2-ヒドロキシプロピル) アミノ]-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-[ビス(2-メトキシエチル) アミノ]-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(4-メチル-1-ピペラジニル)-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(1-ピペリジニル)-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(1-ピロリジニル)-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(4-モルホリニル)-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-フェニル-3-(トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[3-[4-(3-ピリジニル)-3-(トリフルオロメチル) フェニル] メチル] ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(1H-イミダゾール-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(2,4-ジメチル-1H-イミダゾール-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(4-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[4-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[3-(4-モルホリニル)-5-[ (メチルアミノ)カルボニル]フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[3-[ (メチルアミノ)カルボニル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[5-(3-ピリジニル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[5-(4-モルホリニル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]-N-[5-(2-メチル-1H-イミダゾール-1-イル)-3-(トリフルオロメチル)フェニル]ベンズアミド；

4-メチル-3-[ [4-(3-ピリジニル)-2-ピリミジニル] アミノ]

] -N- [5- (4-メチル-1H-イミダゾール-1-イル) -3- (トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-3- [[4- (3-ピリジニル) -2-ピリミジニル] アミノ]  
] -N- [5- (5-メチル-1H-イミダゾール-1-イル) -3- (トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-3- [[4- (3-ピリジニル) -2-ピリミジニル] アミノ]  
] -N- [3- (4-メチル-1-ピペラジニル) -5- (トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド；  
4-メチル-3- [[4- (3-ピリジニル) -2-ピリミジニル] アミノ]  
] -N- [2- (1-ピロリジニル) -5- (トリフルオロメチル) フェニル] ベンズアミド

[0031] 上記の低分子Src/c-Abl経路阻害薬は、市販品を用いるか、あるいは各化合物についてそれぞれ自体公知の方法により製造することができる。

例えば、bosutinibもしくはその類縁体は、例えば、米国特許第6,002,008号および第6,780,996号、あるいは、Boschelli,D.H.ら、J.Med.Chem.,44,3965(2001)、Boschelli,D.H.ら、J.Med.Chem.,44,822(2001)、Boschelli,D.H.ら、Bioorg.Med.Chem.Lett.,13,3797(2003)、Boschelli,D.H.ら、J.Med.Chem.,47,1599(2004)、およびYe,F.ら、221th National Meeting of the American Chemical Society, San diego, California(April, 2001)に記載される方法に従って製造することができる。

tivozanibもしくはその類縁体は、例えば、WO 02/088110に記載される方法に従って製造することができる。

pazopanibもしくはその類縁体は、例えば、WO 2002/059110(特表2004-517925)に記載される方法に従って製造することができる。

crizotinibもしくはその類縁体は、例えば、WO 2004/076412(特表2006-519232)に記載される方法に従って製造することができる。

sunitinibもしくはその類縁体は、例えば、WO 01/060814(特表2003-523340)に記載される方法に従って製造することができる。

axitinibもしくはその類縁体は、例えば、WO 01/002369(特表2003-503481)に記載される方法に従って製造することができる。

imatinibもしくはその類縁体は、例えば、特開平6-087834に記載される方法に従って製造することができる。

nilotinibもしくはその類縁体は、例えば、W02004/005281(特表2005-533827)に記載される方法に従って製造することができる。

[0032] Src/c-Abl路阻害薬は、フリーボディだけでなく、その薬理学的に許容される塩も包含されるものとする。薬理学的に許容される塩は化合物の種類によって異なるが、例えば、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩等）、アルミニウム塩、アンモニウム塩等の無機塩基塩、並びにトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N' -ジベンジルエチレンジアミン等の有機塩基塩などの塩基付加塩、あるいは塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩、クエン酸塩、シユウ酸塩、酢酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、パラトルエンスルホン酸塩等の有機酸塩などの酸付加塩が挙げられる。

[0033] Src/c-Abl経路阻害薬が、光学異性体、立体異性体、位置異性体、回転異性体等の異性体を有する場合には、いずれか一方の異性体も混合物も本発明におけるSrc/c-Abl経路阻害薬に包含される。例えば、Src/c-Abl経路阻害薬に光学異性体が存在する場合には、ラセミ体から分割された光学異性体も本発明におけるSrc/c-Abl経路阻害薬に包含される。

これらの異性体は、自体公知の合成手法、分離手法（例、濃縮、溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー、再結晶等）、光学分割手法（例、分別再結晶法、キラルカラム法、ジアステレオマー法等）等によりそれぞれを単品として得ることができる。

Src/c-Abl経路阻害薬は、結晶であってもよく、結晶形が单一であっても結

晶形混合物であっても本発明の化合物に包含される。結晶は、自体公知の結晶化法を適用して、結晶化することによって製造することができる。

Src/c-Abl経路阻害薬は、溶媒和物（例、水和物等）であっても、無溶媒和物（例、非水和物等）であってもよく、いずれも本発明の化合物に包含される。

また、同位元素（例、<sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>125</sup>I等）等で標識された化合物も、本発明におけるSrc/c-Abl経路阻害薬に包含される。

[0034] 別の実施態様において、Src/c-Abl経路阻害薬として、Src/c-Abl経路を構成するキナーゼ、即ち、Src、c-Abl、Srcを基質としてリン酸化するRTK又はPKCに対するアンチセンス核酸、siRNA、shRNA、miRNA、リボザイムなどの抑制性核酸が挙げられる。これらの抑制性核酸は、Src/c-Abl経路を構成する各キナーゼをコードする遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいて、例えば、自体公知の設計ソフトを用いて適宜設計し、DNA/RNA自動合成機を用いて容易に合成することができる。また、これらの抑制性核酸の一部は市販されており、それを用いることもできる。例えば、Life Technologies社から、Src siRNA (siRNA ID:s13414、s13413等)、c-Abl siRNA (siRNA ID:s866、s864等)などを入手することができる。

[0035] また別の実施態様において、Src/c-Abl経路阻害薬は、Src/c-Abl経路を構成するキナーゼに対する中和抗体であり得る。特に、膜貫通タンパク質である、Srcを基質としてリン酸化するRTKの細胞外ドメインを特異的に認識し、RTKによるSrcのリン酸化を阻害する抗体を好ましい例として挙げることができが、それに限定されない。これらの抗体は、自体公知の手法を用いて、適宜製造することができ、また、市販の抗体を用いることもできる。

[0036] 本発明の予防／治療剤は、有効成分である本発明の化合物をそのまま単独で、または薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等と混合し、適當な剤型の医薬組成物として経口的又は非経口的に投与することができる。

[0037] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプ

セル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。一方、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 $\alpha$ 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；磷酸水素カルシウムのような磷酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤である）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蟻のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体である）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物である）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類である）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシ

エチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤である）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸である）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等である）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

- [0038] 本発明の予防／治療剤の有効成分であるSrc/c-Abl経路阻害薬の投与量は、化合物の種類、投与対象の症状、齢、体重、薬物受容性等の種々の条件により変化し得るが、経口投与の場合には、1回当たり下限0.1mg（好適には0.5mg）、上限1000mg（好適には500mg）を、非経口的投与の場合には、1回当たり下限0.01mg（好適には0.05mg）、上限100mg（好適には50mg）を、成人に対して1日当たり1乃至6回投与することができる。症状に応じて增量もしくは減量してもよい。特に、Src/c-Abl経路阻害薬が上記疾患以外の疾患に対する医薬品として、既に上市されている場合には、各化合物について、安全性が確認されている範囲で、適宜投与量を選択することができる。
- [0039] さらに、本発明のALS予防・治療剤は、他の薬剤、例えば、グルタミン酸作用抑制剤（例、riluzole等）、抗酸化剤（例、エダラボン等）、神経栄養因子（例、インスリン様増殖因子-1、5-HT<sub>1A</sub>受容体アゴニスト（例、ザリプロデン）等）などと併用してもよい。本発明の予防／治療剤およびこれらの他の薬剤は、同時に、順次又は別個に投与することができる。
- [0040] 本発明はまた、Src/c-Abl経路を構成するキナーゼ（即ち、Src、c-Abl、Srcをリン酸化するRTK又はPKCと試験化合物とを接触させ、該キナーゼのリン酸化を阻害した試験化合物をALSの予防及び／又は治療薬の候補として選択することを特徴とする、ALS予防及び／又は治療薬のスクリーニング方法（以下、「本発明のスクリーニング方法」ともいう。）を提供する。
- [0041] 例えば、一実施態様において、本発明のスクリーニング方法は、

- (1) Src/c-Abl経路を有する哺乳動物細胞を試験化合物と接触させる工程、
  - (2) Src/c-Abl経路を構成するいずれかのキナーゼのリン酸化の程度を測定する工程、
  - (3) 上記(2)のリン酸化の程度を、試験化合物を接触させなかった細胞における該キナーゼのリン酸化の程度と比較する工程、並びに
  - (4) 該キナーゼのリン酸化の程度を低下させた試験化合物を、ALSの予防及び／又は治療薬の候補として選択する工程
- を含む。

- [0042] 工程(1)に用いられる哺乳動物細胞は特に制限されない。ALS-MNを用いてもよいが、通常よく用いられる細胞株であってもよい。例えば、後の測定を容易にするため、恒常的活性化型のRTK遺伝子を組み込んだ細胞を用いることもできる。
- [0043] 本発明のスクリーニング方法において用いられる試験化合物に特に限定は無く、タンパク質、ペプチド、核酸、無機化合物、天然もしくは合成化学的に調製された有機化合物等が挙げられる。試験化合物として、具体的には、アミノ酸3～50残基、好ましくは5～20残基のペプチドライブラリーや、当業者に公知のコンビナトリアルケミストリーの技術を用いて調製された分子量100～2000、好ましくは200～800の低分子有機化合物ライブラリーを挙げることができる。
- [0044] 細胞と接触させる試験化合物の濃度としては、特に限定は無く、通常約0.01 μM～約100 μMであればよく、好ましくは0.1 μM～50 μMであればよい。細胞と試験化合物とを接触させる時間は、特に限定されるものでなく適時設定するものであるが、例えば5分間～30分間程度あり、好ましくは10分間～20分間程度である。試験化合物は適宜、水、リン酸バッファーもしくはトリスバッファー等のバッファー、エタノール、アセトン、ジメチルスルホキシドもしくはこれらの混合物などの溶媒に溶解または懸濁して用いることができる。
- [0045] 工程(2)におけるリン酸化の程度は、例えば、リン酸化された各キナ-

ゼタンパク質に特異的な抗体を用いて、試験化合物との接触前後で（あるいはコントロール細胞との比較で）のリン酸化キナーゼの量をウェスタンプロット法やプルダウンアッセイ、その他の免疫学的手法により測定することができる。好ましい実施態様として、例えば、蛍光免疫染色による共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析や、蛍光抗体を用いたフローサイトメトリーなどを挙げることができる。

- [0046] 試験化合物を添加した細胞におけるキナーゼタンパク質のリン酸化の程度が、試験化合物を添加しないコントロール細胞でのリン酸化の程度と比較して統計学的に有意に低下していれば、該試験化合物はALS予防及び／又は治療薬の候補として選択することができる。
- [0047] 以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

## 実施例

- [0048] <材料及び方法>

### 研究設計

家族性及び孤発性患者由来iPS細胞から、上記特許文献5に記載の方法により誘導した運動ニューロン（ALS-MN）の細胞表現型を用いて、スループット薬物スクリーニングを行った。ヒット薬物のうち、ALS治療の候補標的に焦点を当て、複数のALS iPS細胞クローンを用いて検証した。ALSモデルマウスを用いて、インビボでの効果を解析した。ヒトiPS細胞の作製及び使用は、京都大学を含む各部門の倫理委員会により承認された。全ての方法は、承認されたガイドラインに従って行った。すべての被験者から、正式なインフォームドコンセントを得た。本実施例で解析した全てのマウスは管理され、手順は京都大学動物研究所ガイドラインに従って行い、すべての実験はCiRA動物実験委員会の承認を受けて実施した。書面のインフォームドコンセントを伴ったヒト死後試料は、京都大学、自治医科大学、並びに関西医科大学の医学部及び大学院医学研究科から入手した。

- [0049] iPS細胞の作製

iPS細胞は、レトロウイルス（Sox2、Klf4、Oct3/4およびc-Myc）、センダイウイルス（Sox2、Klf4、Oct3 / 4およびc-Myc）、またはエピソーマルベクター（Sox2、Klf4、Oct3/4、L-Myc、Lin28およびp53-shRNA）を用いて、皮膚線維芽細胞、末梢血単核細胞（PBMC）または不死化Bリンパ球から作製し [Cell 131, 861-872 (2007); Stem Cells 31, 458-466 (2013); Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 85, 348-362 (2009)]、4ng/mlのbFGF（和光純薬工業、大阪、日本）およびペニシリン/ストレプトマイシンを添加したヒトiPS細胞培地（靈長類胚性幹細胞培地；ReproCELL、横浜、日本）を用いて、SNLフィーダー層上で培養した。

#### [0050] マイクロアレイ解析

RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて、iPS細胞の全RNAを抽出した。総RNA 200 ngから、GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix) を用いてcDNAを合成し、得られたcDNAを断片化し、Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、GeneChipアレイを洗浄し、GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) で染色し、メカ力一の標準プロトコールに従ってScanner 3000 TG system (Affymetrix) で検出した。データ解析を、GeneSpringGX 12.6 (Agilent Technologies) software及びR-softwareを用いて行った。

#### [0051] スクリーニング用の化学物質

Tivozanib及びcrizotinibはLKT Laboratories (St. Paul, MN)から、bosutinibはAbcam (Cambridge, UK)から、sunitinibはSIGMA (St. Louis, MO)から、axitinib、pazopanib及びsaracatinibはSelleck Chemicals (Houston, TX)から、dasatinibはSanta Cruz Biotechnology (Dallas, TX)から、kenpau loneはTocris (Missouri, UK)から購入した。

#### [0052] CRISPR-Cas9遺伝子編集技術を用いた、同質遺伝子的な変異型SOD1に関連するALS iPS細胞クローンの作製

CRISPR-Cas9によるSOD1遺伝子の変異を修復するために、CRISPR Design (<http://crispr.mit.edu/>) を用いて、5' - GGATAACAGATGAGTTAAGGGG -3' (配列

番号31)部位を標的とするガイドRNAを設計した。ガイドRNAオリゴヌクレオチドを、ヒトH1ポリメラーゼIIIプロモーターから発現させるため、pHL-H1-ccdB-EF1 $\alpha$ -RiHプラスミド中のBamHI-EcoRI部位に挿入した (Li, H.L., et al., Stem Cell Reports 4, 143-154 (2015))。ドナープラスミドを構築するため、正常なSOD1遺伝子配列を有する5'及び3'ホモロジーアーム、並びにpiggyBac末端反復が隣接するPuro $\Delta$ TKカセットを、pBluescript SK (+) に挿入した。CRISPR-Cas9のトランスフェクションには、10  $\mu$ gのpHL-H1 ガイドRNA発現プラスミド、10  $\mu$ gのpHL-EF1 $\alpha$ -hcSpCas9プラスミド、及び10  $\mu$ gのドナープラスミドを、NEPA21エレクトロポレーション (Nepagene) により100万個のiPS細胞にエレクトロポレーションした。トランスフェクションの4日後、ピューロマイシン選択を10日間行った。ピューロマイシン耐性コロニーを無作為に選択し、プライマーA、B、C及びD (表1に示す) を用いたPCRによるゲノムDNA抽出及び遺伝子型決定のために拡大した。増幅したPCRバンドをサンガーシーケンシングによりさらに分析して、ホモロジーアームにおける予想される修復及び配列変化の欠如を確認した。Puro $\Delta$ TKカセットを除去するために、ベクター pHL-EF1 $\alpha$ -hcPBase-A (Matsui, H., et al., PLoS One 9, e104957 (2014)) を発現するpiggyBacトランスポーザーを標的クローンにエレクトロポレーションし、プライマーD、E及びFを用いたPCRにより、ピューロマイシンカセットの除去ができていることを確認した (表1)。

#### [0053] [表1]

SOD1 遺伝子編集のためのプライマーリスト		
プライマーリスト	配列 (5' → 3')	配列番号
プライマー A	TAGGTCAAGTAAGAACACATGTTCTG	1
プライマー B	TGACTCATTTCACTAAATTGGTGTG	2
プライマー C	CAAGCGGCAGACTGAGATGTCC	3
プライマー D	CTGTAATTTACGCCATGATTATCTTAAC	4
プライマー E	TTTGGGTATTGTTGGAGGAG	5
プライマー F	CAGTTTCYCACTACAGGTAC	6

#### [0054] ポリリストロニックベクターの作製及びiPS細胞への導入

rtTA及びネオマイシン耐性遺伝子を有するKW111\_PB\_TAC\_ERN (Ef1a\_rtTA\_n

eo)（図1～3及び図6～8の実験で用いた）及びKW110\_PB\_TA\_ERN (Ef1a\_r tTA\_neo) ベクター骨格（図4及び図9の実験で用いた）から、テトラサイクリンオペレーター及び最小のCMVプロモーターの制御下でマウスLhx3、マウスNgn2及びマウスIsl1を含むポリリストロニックベクターを作製した[Kim, S. I., et al., Methods Mol Biol 1357, 111-31 (2015)]。Lhx3、Ngn2及びIsl1をOrigeneから購入し、2つのF2A配列を用いて連結した（LNIカセット）。次に、作製したベクターを、リポフェクタミンLTX (Thermo Fisher Scientific) を用いて、トランスポサーチをコードするpCyL43ベクターと共にiPS細胞に共トランスフェクトした。ネオマイシンを用いたクローニング選択の後、テトラサイクリン誘導性LNIカセットを有するiPS細胞を樹立した。

#### [0055] 運動ニューロン (MN) の作製

LNIカセットを導入したiPS細胞を、Accutase (Innovative Cell Technologies) を用いて単一細胞に解離し、1 μg/mlのドキシサイクリン (TAKARA、Kusatsu、Japan) と共に、1 μM レチノイン酸 (Sigma)、1 μM Smoothened Agonist (SAG)、10 ng / mlのBDNF (R&D Systems)、10 ng/ml GDNF (R&D Systems) 及び10 ng/ml NT-3 (R&D Systems) を含むN3培地 (DMEM / F12 (Thermo Fisher Scientific)、100 μg/mlアポトランスフェリン (Sigma)、5 μg / mlインスリン (Sigma)、30nM亜セレン酸 (Sigma)、20nMプロゲステロン (Sigma)、100 nMプロトレシン (Sigma) ) を用いてマトリゲルでコーティングしたディッシュ又はカバーグラス上に播種し、7日間培養した。

#### [0056] 定量的RT-PCR

培養細胞の全RNAをRNeasy Plus Mini kit (QIAGEN) を用いて抽出した。1マイクログラムのRNAをReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写した。StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific) を用いて、SYBR Premix ExTaqII (TAKARA) との逆転写反応により定量的PCR分析を行った。プライマーセットを表2に列挙する。

#### [0057]

[表2]

## qPCR のためのプライマーリスト

プライマーリスト	配列 (5' → 3')	配列番号
HB9_F	TGCCTAAAGATGCCCGACTT	7
HB9_R	AGCTGCTGGCTGGTGAAG	8
CHAT_F	TGAAACCTACCTGATGAGCAAC	9
CHAT_R	AGCAGAACATCTCCGTGGTT	10
SOD1_F	GCACACTGGTGGTCCATGAAA	11
SOD1_R	CAAGCCAAACGACTTCCAGC	12
TrkB_F	ACCCCTCTGTACCCCCGATCT	13
TrkB_R	TCGATGTAGCTTGCTGCCAAC	14
TrkB~F	AATGACATCGGGGACACCAC	15
TrkB~R	CCACCCACAGCATAGACCGAG	16
TrkC~F	GCTCCGGTCTCGGAGTCG	17
TrkC~R	GCGAGGAGCGCCTAGTG	18
GFR α 1_F	GGGACACCATTGCCCTGAAA	19
GFR α 1_R	GACCCAACCTGGACTCAACC	20
NR1_F	GTCCAAGGCAGAGAAGGTGC	21
NR1_R	CTCGCTGGCAGAAAGGATGA	22
NR2_F	GGGTGAGCGGCTGAGAATCG	23
NR2_R	GCAGCAGGGCTCGCAG	24
GluR1_F	GGGTCTGCCCTGAGAAATCC	25
GluR1_R	TCAGAGCGCTTGTCTTGTCC	26
GluR2_F	AAACTCAGTGAGCAAGGCCT	27
GluR2_R	GGGCACTGGTCTTTCTTACT	28
GAPDH_F	TCCACTGGCGTCTCACCC	29
GAPDH_R	GCCAGAGATGATGACCCCTTT	30

## [0058] 免疫細胞化学

室温で30分間、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで洗浄し、0.2%Triton X-100を含有するPBS中室温で10分間浸透させ、続いてBlock Ace (Yukijirushi) で30分間ブロッキングした。一次抗体で4°C 一晩インキュベートした後、細胞をPBSで3回洗浄し、次いで適切な二次抗体と共に室温で1時間インキュベートした。Delta Vision (GE Healthcare) 、BIOREVO (Keyence

) 又はIN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) を用いて、細胞画像を取得した。細胞数を、IN Cell Analyzer 6000及びIN Cell Developer toolbox software 1.9 (GE Healthcare) を用いて定量した。このアッセイでは、次の一次抗体を使用した： $\beta$  III-チューブリン (1 : 2,000, Covance; 1 : 1,000, Abcam) 、HB9 (1 : 200, Developmental Studies Hybridoma Bank) 、ChAT (1:100, Millipore) 、GFAP (1:500, Santa Cruz) 、Iba1 (1:1,000, Wako) 、ミスフォールドしたSOD1 (B8H10) (1:100, MEDIMABS) 、Nestin (1:200, Millipore) 、Nanog (1:700, ReproCELL) 、SSEA-4 (1:200, Millipore) 、リン酸化Src (1:100, R&D Systems) 及びリン酸化c-Abl (1:100, SAB, College Park, MD) 。

#### [0059] 電気生理学的記録

全細胞パッチクランプ記録を、微分干渉造影画像法と組み合わせて、顕微鏡下でiPS細胞由来のMNを用いて行った。記録用マイクロピペットを、NaOHでpH7.4に調整した、140 mM KCl、2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM HEPES及び1 mM EGTAからなる細胞内溶液で充填した。実験中は細胞を30°Cに維持し、125 mM NaCl、2.5 mM KCl、1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、26 mM NaHCO<sub>3</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM CaCl<sub>2</sub>、及び20 mM グルコースからなる酸素を添加したクレブス・リンガー液を連続的に灌流した。電圧クランプ及び電流クランプ記録をEPC9 amplifier (HEKA) を用いて行い、データをPatchmaster software (HEKA) を用いて分析した。機能的な神経伝達物質の受容体の試験のために、以前記載したように (Miles, G. B., et al., J Neurosci 24, 7848-7858 (2004)) 、500 μMのグルタミン酸塩及び500 μMのGABAを、pneumatic PicoPump (World Precision Instruments) を用いて、2-3 μmの先端直径を有するマイクロピペットを介して低圧 (10psi未満) により50 ms間排出し、細胞体から約5 μm離して置いた。

#### [0060] ウエスタンプロット

細胞を回収し、0.1% SDS、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% デオキシコレート、50 mM Tris-HCl (pH8.0) 、プロテアーゼ阻害剤 (Roche) 及びホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含有するRIPA緩衝液中に溶解した。サンプルを13,0

00×gで15分間 4°Cで遠心分離した。上清中のタンパク質濃度を、ビシンコニン酸 (BCA) アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。全タンパク質の抽出物 (10 μg/レーン) を、10–20% ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離し、Immobilon-Pメンブレン (Millipore) に移した。メンブレンをBlocking One (Nacalai Tesque) でブロッキングし、適切な抗体とハイブリダイズさせ、ECL Prime detection kit (GE Healthcare) を用いて可視化した。ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で画像を取得した。次の一次抗体を使用した：リン酸化Src (1:1,000, CST)、Src (1:1,000, CST)、リン酸化c-Abl (1:1,000, CST)、c-Abl (1:1,000, CST)、p62 (1:1,000, MBL)、LC-3 (1:1,000, MBL)、SOD1 (1:1,000, ENZO)、及びβ-アクチン (1:5,000, Sigma)。

#### [0061] 免疫沈降

細胞を回収し、1% Triton-X、0.5% デオキシコレート、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、150 mM NaCl、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤 (Roche)、及びホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含有するIP緩衝液中に溶解した。サンプルを13,000×gで15分間 4°Cで遠心分離した。Immunoprecipitation Kit Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) を用いて、免疫沈降法を行った。上清を、抗ミスフォールドしたSOD1抗体 (MS785) (Fujisawa, T., et al., Ann Neurol 72, 739-749 (2012)) と結合させたプロテインGと4°Cで一晩インキュベートした。ビーズを磁石で回収し、3回洗浄した後、70°Cで10分間溶出した。サンプルを、10–20% ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離し、Immobilon-Pメンブレン (Millipore) に移した。メンブレンをBlocking One (Nacalai Tesque) でブロッキングし、SOD1抗体(1:1,000, ENZO)とハイブリダイズさせ、ECL Prime detection kit (GE Healthcare) を用いて可視化した。

#### [0062] MN生存アッセイ及びハイコンテント分析

LNIカセットを有するiPS細胞を、Accutaseを用いて単一細胞に解離し、1 μg/mlのドキシサイクリン (TAKARA、Kusatsu、Japan) と共に、1 μM レチ

ノイン酸、 $1 \mu\text{M}$  SAG、 $10 \text{ ng/ml}$  BDNF、 $10 \text{ ng/ml}$  GDNF、及び $10 \text{ ng/ml}$  NT-3を含有するN3培地を用いてマトリゲルでコーティングした96ウェルプレート(BD Bioscience)上に播種した。細胞を固定し、7日目及び14日に染色した。 $\beta$  III-チューブリンで染色した生存MNの数をIN Cell Analyzer 6000により定量し、14日目/7日目の数として表した。LNIカセットを有するiPS細胞から分化したほぼ100%  $\beta$  III-チューブリン陽性のニューロンは、HB9陽性染色を示したため、このアッセイでは $\beta$  III-チューブリン陽性ニューロンをMNとして定義した。神経突起及び細胞体を、最適化した蛍光レベルにより検出し、神経突起を有する細胞体の数を、IN Cell Developer toolbox software 1.9を使用して生存ニューロンの数として計数した。

#### [0063] ALS MNを使用した大規模スクリーン

LNIカセットを有するiPS細胞を、Accutaseを用いて単一細胞に解離し、 $1 \text{ ng/ml}$ のドキシサイクリンと共に、 $1 \mu\text{M}$  RA、 $1 \mu\text{M}$  SAG、 $10 \text{ ng/ml}$  BDNF、 $10 \text{ ng/ml}$  GDNF及び $10 \text{ ng/ml}$  NT-3を含有するN3培地を用いてマトリゲルでコーティングした96ウェルプレート(BD Bioscience)上に播種した。薬物スクリーニングで用いたライブラリーは、Microsource US Drugs (Microsource Discovery Systems)、Microsource International Drugs (Microsource Discovery Systems)、並びにEMD及びSelleck Chemicalsから購入したキナーゼ阻害剤であった。Integrity及びNextbioデータベースを使用してこれらのライブラリーから既存の薬物及び臨床試験の試験薬を選択し、スループットスクリーニングに使用した。7日目に1,416種類の化合物（最終濃度 $10 \mu\text{M}$ ）を添加し、14日に細胞を固定して染色した。陰性コントロールとしてDMSOを用い、ALS治療の候補薬物であるkenpau loneを陽性コントロールとして用いた。 $\beta$  III-チューブリンで染色された生存MNの数をIN Cell Analyzer 6000により定量した。

#### [0064] MNにおけるsiRNAを用いたSrc/c-Abl及びmTORのノックダウン

短干涉RNA (siRNA) を、Life Technologies (Src siRNA 1のsiRNA ID: s13414; Src siRNA 2のsiRNA ID: s13413; c-Abl siRNA 1のsiRNA ID: s866; c-

Abl siRNA 2のsiRNA ID: s864; mTOR siRNAのsiRNA ID: s604) から購入した。Life Technologiesから購入したスクランブルsiRNAをsiRNAの陰性コントロールとして使用した。iPS細胞を解離し、96ウェルプレートにdoxと共にプレーティングした。7日目に、siRNAをリポフェクタミンRNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いてトランスフェクトした。β III-チューブリンで免疫染色し、続いてIN Cell Analyzer 6000及びIN Cell Developer toolbox software 1.9で分析することにより、トランスフェクションの4日後に生存MNを評価した。

#### [0065] 酵素結合免疫吸着測定 (ELISA)

7日目のMNにビヒクル又は1 μMのbosutinibを3日間添加した。ミスフォールドしたSOD1のELISAのため、細胞を回収し、1% Triton-X、0.5% デオキシコレート、50 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、0.1% SDS、150 mM NaCl、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤 (Roche)、及びホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含有する緩衝液中に溶解した。サンプルを13,000×gで15分間 4°Cで遠心分離した。96ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) を、0.05 M炭酸ナトリウム緩衝液中で3 μg/mlのMS785抗体で4°C、一晩コーティングした。1%BSAを含むTBS-Tで洗浄及びブロッキングした後、100 μlのサンプル当たり200 μgのタンパク質を添加し、室温で2時間インキュベートした。組換え変異型SOD1タンパク質 (G93A) を用いて標準曲線を得た。検出のために、プレートを3 μg/mlの抗SOD1抗体 (ENZ0) で、次に西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヒツジ抗ウサギIgG F (ab)' 2 フラグメント (1 : 3,000; GE Healthcare) と共にインキュベートした。室温で30分間のテトラメチルベンジジン溶液 (BD Bioscience)とのインキュベーション後、VersaMax (Molecular Device)により450nmでの吸光度を測定した。p-Src及びp-Ab1のELISAのために、細胞を採取し、0.1% SDS、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% デオキシコレート、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、プロテアーゼ阻害剤 (Roche)、及びホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含有するRIPA緩衝液中に溶解した。サンプルを13,000×gで15分間 4°Cで遠心分離した。PathScan Phospho

o-Src (Tyr416) Sandwich ELISA kit (CST)、PathScan Phospho-c-Abl (Tyr 412) Sandwich ELISA kit (CST)、ヒトチロシンタンパク質キナーゼ src (SRC) ELISA kit (CUSABIO、College Park、MD) ヒトチロシンタンパク質キナーゼ ABL1 (ABL1) ELISA kit (CUSABIO) 及びp62 ELISA kit (Enzo) をメーカーのプロトコールに従って使用した。

#### [0066] iPS細胞から星状細胞の作製

以前に報告された方法 (Kondo, T., et al., Cell Stem Cell 12, 487-496 (2013)) に軽微な改変を加えて、iPS細胞から星状細胞に分化させた。iPS細胞を単一細胞に解離し、低細胞接着U字型96ウェルプレートに再凝集させた。5%KSR (Thermo Fisher Scientific)、2 μMドルソモルフィン (Sigma)、10 μM SB431542 (Cyman Chemical) 及び3 μ MCHIR99021 (Sigma) を含むDMEM/F12と共に凝集物を4日間培養し、5% KSR、2 μMドルソモルフィン、及び10 μM SB431542と共にさらに10日間培養した。凝集物を、Acumaxを用いて解離し、Neurobasal Medium (Thermo Fisher Scientific) 及びB27 (Thermo Fisher Scientific) を用いてmatrigelでコーティングした24ウェルプレート上で培養した。40日目に細胞を解離し、コーティングしていない6ウェルプレート上に播種し、DMEM/F12及び10% FBS (Thermo Fisher Scientific) で培養した。2週間ごとに継代を繰り返した。

#### [0067] ATP測定

iPS細胞を96ウェルプレートに、50,000細胞/ウェルで播種し、N3培地及びdoxを用いてMNを作製した。7日目にビヒクリル及び1 μM bosutinibを加えた。48時間後、培地をウェルから除去し、CellTitier-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞のATPを測定した。ATPレベルは、BCAアッセイによるATP測定に用いた細胞溶解物中のタンパク質濃度により補正した。

#### [0068] 単一細胞のRNAシーケンシング

レンチウイルスによりHB9::GFPで標識した (Egawa, N., et al., Sci Transl Med 145ra104 (2012)) 7日目のMNを、Accumaxを用いて単離し、SMARTer U

ltra Low Input RNA-HV kit (Clontech) の反応緩衝液 (10  $\mu$ l) を満たした 96 ウェルプレート上に、FACS AriaII (BD Biosciences) を使用して選別し、 続いて cDNA 合成及び増幅をメーカーの説明書に従い実施した。シーケンシングライブラリーは、Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina) を用いて 構築した。HiSeq 2500 (Illumina) の 100-cycle Single-Read モードでライブラリーをシーケンシングした。すべての配列リードは、CASAVA 1.8.4 パイプラインの BCL2FASTQ Conversion Software 1.8.4 を使用して FASTQ 形式で抽出した。配列リードを、hg19 参照遺伝子にマッピングし、RPKMforGenes により 定量した。Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を用いて生物学的なシグネチャを見積もった。

#### [0069] ドットプロット分析

細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤及びホスファターゼ阻害剤を含有する RIPA 緩衝液中に溶解した。超音波処理及び  $15,000 \times g$  で 10 分間の遠心分離後、 各溶解物サンプル (2  $\mu$ g/スポット) をニトロセルロースメンブレン (0.45  $\mu$ m 孔径、GE Healthcare) に充填した。メンブレンを 5% スキムミルクでブロッキングし、適切な抗体とハイブリダイズさせ、Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer) を用いて可視化した。ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) で画像を取得した。次の一次抗体を用いた：抗 C9orf72 (poly-GP) (1:1,000, Cosmo Bio) 及び  $\beta$ -アクチン (1:5,000, Sigma)。

#### [0070] ALS モデルマウス

G93A 変異を有し、ヒト SOD1 遺伝子を過剰発現する ALS モデルマウス (B6.Cg-Tg (SOD1 \* G93A) 1Gur / J (Tg-G93A SOD1 マウス)) を、Jackson Laboratories から入手した。全ての動物の世話をし、手順は全て京都大学動物研究所 のガイドラインに従い実施した。全ての実験は、CIRIA 動物実験委員会によつて 承認された (No. 24)。出生後 8 週目から、マウスに 5 mg/kg の bosutinib (Selleck Chemicals) 又はビヒクリ (DMSO) を 5 週の間、1 週につき 5 回腹腔内 注射した。疾患の発症は、体重が最大に達した時点として決定し、最終段階は、動物が横向きに置かれたときに、20 秒以内に動物自体が元の正しい状態

にならぬことにより決定した (Van Hoecke, A., et al., Nat Med 18, 141 8–1422 (2012)、Lobsiger, C.S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 110, E4385–4392 (2013))。

#### [0071] ニッスル染色

ニッスル染色及びMNの計数は、以前記載したのと同様に行った (Van Hoecke, A., et al., Nat Med 18, 1418–1422 (2012)、Lobsiger, C.S., et al., Proc Natl Acad Sci USA 110, E4385–4392 (2013)、Fujisawa, T., et al., Hum Mol Genet 25, 245–253 (2016))。簡潔に述べると、マウスを4%PFAで固定し、腰髄を30% ショ糖水溶液中で脱水し、Tissue-Tek O.T.C Compound (Sakura Finetek) 中に凍結した。クライオスタッフにより、脊髄を20 μm の横断切片にスライスした。ニッスル染色のために、凍結切片を1% クレシルバイオレット溶液 (MP Biomedicals) で染色し、100% エタノール及びキシレンで洗浄し、Mount-Quick Tube (Daido Sangyo) を用いてスライドに載せた。動物1匹につき10枚ごとにL3腰椎の片側の前角を評価した。脊髄の片側の前角の直径が20 μmを超える大きなニューロンを数えた。

#### [0072] ヒトの死後検体

患者はEl Escorial基準 (Brooks, B.R., et al., Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1, 293–299 (2000)) でALSと診断され、剖検で病理学的に診断された。脊髄を除去し、各レベルのブロックを直ちに10% 緩衝ホルマリン中に置き、パラフィンに包埋し、神経病理検査に付したか、又は生化学検査のために直ちに凍結した。

免疫組織化学的検査のため、ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋したコントロール及びALS由来の厚さ6 μmの切片を脱パラフィンし、熱/オートクレーブ (10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中で121°C、10分間) により抗原賦活化した後、抗リン酸化Src (1 : 100、R&D) と共に4°Cで一晩インキュベートした。結合した抗体を、色素原として3,3'-ジアミノビンジジンテトラヒドロクロライドを用いて、適切なVectastatin Elite ABC kit (Vector Laboratories) で検出した。免疫組織化学的検査のための剖検組織を、表3

に詳細に記載する。

ELISAのために、凍結した脊髄ブロックを、0.1% SDS、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% デオキシコレート、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、プロテアーゼ阻害剤 (Roche) 及びホスファターゼ阻害剤 (Roche) を含有するRIPA緩衝液中に溶解した。サンプルを13,000×gで15分間 4°Cで遠心分離した。

PathScan Phospho-Src (Tyr416) Sandwich ELISA kit (CST)、PathScan P phospho-c-Abl (Tyr412) Sandwich ELISA kit (CST)、ヒトチロシンタンパク質キナーゼ src (SRC) ELISA kit (CUSABIO)、及びヒトチロシンタンパク質キナーゼABL1 (ABL1) ELISA kit (CUSABIO) をメーカーのプロトコールに従って使用した。ELISAのための剖検組織を、表4に詳細に記載する。

#### [0073] [表3]

免疫組織化学的検査のための脊髄の剖検組織のリスト

	サンプル ID	性別	死亡時の年齢(y)	疾患	遺伝子型	死後からの間隔(h)
コントロール	189	男性	75	meningitis	N. A.	3.5
コントロール	5852	男性	76	myasthenia gravis	N. A.	2.9
コントロール	5922	男性	60	myasthenia gravis	N. A.	2.4
ALS	5902	男性	72	sporadic ALS	N. A.	2.4
ALS	5962	女性	90	sporadic ALS	N. A.	9.6
ALS	H283	男性	62	sporadic ALS	N. A.	15.4
ALS	4330	女性	40	familial ALS	SOD1 (L144FVX)	8

#### [0074]

[表4]

ELISA のための脊髄の剖検組織のリスト

	サンプル ID	性別	死亡時の年齢(y)	疾患	遺伝子型	死後からの間隔(h)
コントロール	H270	女性	75	dermatomyositis	N. A.	7.3
コントロール	H290	男性	61	dermatomyositis	N. A.	3.2
コントロール	H315	男性	71	multiple system atrophy	N. A.	14
コントロール	H333	男性	73	PSP	N. A.	2
コントロール	MG1	男性	76	myasthenia gravis	N. A.	2.9
コントロール	MG2	男性	60	myasthenia gravis	N. A.	2.4
コントロール	PSP1	男性	72	PSP	N. A.	7.4
コントロール	PSP2	男性	68	PSP	N. A.	12.2
コントロール	PSP3	女性	76	PSP	N. A.	1.4
コントロール	PSP4	男性	76	PSP	N. A.	23.2
コントロール	MSA1	男性	66	multiple system atrophy	N. A.	5.6
コントロール	PD1	男性	78	Parkinson's disease	N. A.	1.9
ALS	H280	男性	63	sporadic ALS	N. A.	43.2
ALS	H283	男性	62	sporadic ALS	N. A.	15.4
ALS	ALS1	男性	70	sporadic ALS	N. A.	3.5
ALS	ALS3	男性	63	sporadic ALS	N. A.	5.3
ALS	ALS4	女性	81	sporadic ALS	N. A.	6.6
ALS	ALS5	女性	78	sporadic ALS	N. A.	1.4
ALS	ALS6	男性	55	sporadic ALS	N. A.	2.2
ALS	ALS7	女性	60	sporadic ALS	N. A.	9.3
ALS	ALS8	男性	57	sporadic ALS	N. A.	1.6

## [0075] 統計解析

データの統計学的な有意性を決定するために、one-way又はtwo-wayのANOVA followed by Tukey's post hoc testを用いて、結果を分析した。疾患の発症及び生存期間の分析は、log-rank testによって行った。差はp <0.05で有意とみなした。解析はSPSS software (IBM) を用いて行った。

## [0076] &lt;結果&gt;

3つの転写因子、LIMホメオボックスタンパク質3 (Lhx3) 、ニューロゲニン2 (Ngn2) 、およびISL LIMホメオボックス1 (Isl1) をiPS細胞に形質導入することによるMN分化方法を用いた（上記特許文献5参照）。要約すると、piggyBacベクターを用いて、テトラサイクリンオペレーターの制御下にあるLhx3

、Ngn2、およびIsl1を含有するポリリストロニックベクターをiPS細胞（図5 A-Dおよび表5および6）に導入し、ベクターが導入されたクローンを、ネオマイシンセレクション後の安定したiPS細胞クローンとして樹立した。

## [0077] [表5]

	clone name at establishment	gender	onset age (y)	age at diagnosis (y)	biopsy age (y)	genotype	medication with riluzole	origin	reprogramming
Control1	201B7	female	N.A.	N.A.	36	N.A.	N.A.	skin fibroblast	retrovirus
Control2	N112E14	female	N.A.	N.A.	51	N.A.	N.A.	skin fibroblast	episomal
Control3	N117113	male	N.A.	N.A.	74	N.A.	N.A.	skin fibroblast	episomal
Control4	N116213	female	N.A.	N.A.	67	N.A.	N.A.	skin fibroblast	episomal
ALS1 (SOD1 L144FVX)	A3316	male	40	40	43	SOD1 (L144FVX)	-	skin fibroblast	episomal
ALS2 (SOD1 L144FVX)	A3536	male	45	45	46	SOD1 (L144FVX)	+	skin fibroblast	episomal
ALS3 (SOD1 G93S)	A37228	female	29	29	30	SOD1 (G93S)	+	skin fibroblast	episomal
ALS4 (TDP-43 M337V)	A3411	female	55	56	62	TDP-43 (M337V)	+	skin fibroblast	episomal
ALS5 (TDP-43 Q343R)	A21EL3	male	52	52	55	TDP-43 (Q343R)	+	Peripheral blood mononuclear cell	episomal
ALS6 (TDP-43 G298S)	ND32947E18	male	62	63	64	TDP-43 (G298S)	+	skin fibroblast	episomal
ALS7 (C9orf72)	S11E1	male	N.R.	N.R.	C9orf72 repeat expansion	N.R.	skin fibroblast	*	episomal
ALS8 (C9orf72)	ND0679E4	female	45	46	46	C9orf72 repeat expansion	+	immortalized B-lymphocyte	episomal
ALS9 (C9orf72)	B46 3-7	male	56	64	64	C9orf72 repeat expansion	-	skin fibroblast	sendai virus
ALS10 (SALS)	A13-1	female	58	59	59	N.A.	+	skin fibroblast	episomal
ALS11 (SALS)	A1142	male	64	64	64	N.A.	+	skin fibroblast	retrovirus
ALS12 (SALS)	A4114	male	30	31	35	N.A.	+	skin fibroblast	episomal

N.A. : 該当せず、N.R. : 記録なし、\* Coriell Institute より入手

## [0078]

[表6]

孤癥性ALS由来iPSCのエキソン領域における変異

ALS genes	ALS10	ALS11	ALS12
<i>SOD1</i>	none	none	none
<i>TDP-43</i>	none	none	none

- [0079] ドキシサイクリン処理後、MNを、iPS細胞から7日以内に作製した（図1 A）。作製したMNは、MNマーカーを発現し（図1 BおよびC）、MNの機能的特性（図1 D – Fおよび図6 A – C）を示した。
- [0080] ALS-MN表現型のスクリーニング系を確立するために、SOD1遺伝子（ALS1）におけるL144FVXの突然変異を有するALS患者由来のiPS細胞を作製し（図5 A – D）、樹立したiPS細胞における突然変異を、CRISPR-Cas9を用いて修正し

、同質遺伝子のコントロールを作製した（修正ALS1）（図6 D – F）。転写因子を用いて、iPS細胞をMNに分化させた。MNマーカーであるHB9の陽性細胞は、コントロールで $62.3 \pm 2.3\%$ 、修正ALS1-1で $63.4 \pm 1.3\%$ 、及びALS1で $60.3 \pm 2.8\%$ であった（図1 Gおよび図6 G）。作製したMNにおいて、突然変異型SOD1関連ALSにおいて病理学的役割を果たすミスフォールドしたSOD1タンパク質（図1 HおよびI並びに図6 HおよびI）の蓄積が観察された[Ann Neurol 72, 739–749 (2012), J Neurochem 113, 1188–1199 (2010)]。さらに、ALS-MNにおける脆弱性が、突然変異を修正した同質遺伝子のコントロール（図1 JおよびK）を含むコントロールMNとの比較により見出された。

[0081] 本発明者らは、この細胞モデルを用いて、ALS MNの生存率の読み取りによる化合物スクリーニングを設定した。iPS細胞を7日間MNに分化させ、化合物をさらに7日間添加し、続いて、 $\beta$  III-チューブリンの免疫染色を用いた高含量解析により、生存MNを評価した。 $\beta$  III-チューブリン陽性ニューロンの約100%がHB9を発現したためである（図2 A並びに図6 JおよびK）。アッセイの性能は、Z'因子（Z'因子=  $0.42 \pm 0.30$ （平均±標準偏差））を算出することによって決定した。ポジティブコントロールのアッセイのために、細胞を、 $50 \mu\text{M}$ の、ALSに対する候補薬物として同定されたケンパウロン [Cell Stem Cell 12, 713–726 (2013)] で処理し、その陽性の効果を確認した。ネガティブコントロールのアッセイにおいては、細胞を、ビヒクル (DMSO) で処理した。上市薬及び臨床試験中の薬物を含めた1,416の化合物のスループットスクリーニングを行った。該スクリーニングの結果を図2 Bに示す。ヒット化合物は、ネガティブコントロールから3標準偏差 (3SD) を超えるものとして定義し、27化合物をヒットと同定した（ヒット率1.7%）（表7）。

[0082]

[表7]

ヒット化合物のリスト	MN index
tivozanib	17.25877193
budesonide	10.26755853
enzastaurin	9.841029981
VX-680	9.57835133
riboflavin	9.553571429
pazopanib hydrochloride	9.533464181
alpha-tocopherol	9.455782313
amodiaquine dihydrochloride	8.979591837
BMS 777607	8.55052879
CYC116	8.142394504
sunitinib malate	8.133120707
bisindolylmaleimide I	7.963302752
hydroquinone	7.956989247
flunisolide	7.857142857
KW 2449	7.732412431
MGCD-265	7.622860153
PF-2341066	7.595240432
hydrastine (1R, 9S)	7.525083612
piperine	7.391304348
butamben	7.391304348
axitinib	7.352646826
apomorphine hydrochloride	7.236637168
feenbufen	7.224080268
bosutinib (SKI-606)	7.196207532
mebeverine hydrochloride	6.856187291
flumethasone	6.755952381
dasatinib	6.63858685

[0083] ヒット化合物 (bosutinib) の神経保護効果を示す代表的な図を図2Cに示す。いくつかのヒット化合物の保護効果の用量依存性が確認された（図2D）。

[0084] 27のヒット化合物のうち14化合物が、Src/c-Abl経路に含まれていた（図2E）。したがって、本発明者らは、これらのヒット化合物の共通の標的としてSrc/c-Abl経路に焦点を当てた。まず、一次スクリーニングでヒットしなか

った他のSrc/c-Abl経路阻害薬を再評価し、ヒット化合物と比較して有効性は低いが、それらもMN保護効果を示すことを確認した（図7 A）。さらに、Srcまたはc-AblのノックダウンがMNの生存を促進し（図2 F）、ノックダウン効果はsiRNA耐性形態のSrcまたはc-Ablの過剰発現によって相殺されることも確認した（図7 BおよびC）。これらの結果は、ALS-MNの治療標的としてのSrc/c-Abl経路の有用性を実証するものである。そこで、Src/c-Abl経路阻害薬の中でも、Src/c-Ablに対して直接的阻害活性を有する、ボスチニブおよびダサチニブ等の薬物に焦点を当てた。ボスチニブは、ダサチニブで観察されたベル型応答を伴わずに、MN保護に関して用量依存性を示し、他のヒット化合物と比較して、インビトロで、より低い用量で保護効果を示した。これらの結果から、以後の実験ではSrc/c-Abl経路阻害薬としてボスチニブを選択した。

[0085] 次に、ALS-MNにおけるSrc/c-Ablのタンパク質レベルおよびリン酸化を調査した。Src/c-Ablのリン酸化は、変異型SOD1 ALS-MN培養物において、コントロールと比較して増加し、ボスチニブ処理は、ウェスタンプロット解析によって検出される通り、リン酸化を減少させた（図2 GおよびH）。リン酸化Src（p-Src）/リン酸化c-Abl（p-c-Abl）の典型的な免疫細胞化学の図を図2 Iに示す。我々は、ELISAを用いて、変異型SOD1 ALS-MN培養物において、Src/c-Ablのリン酸化がコントロールと比較して増加し、ボスチニブ処置がそれらを減少させることも確認した（図2 J）。次に、他のタイプの細胞において、Src/c-Ablのタンパク質レベルおよびリン酸化を評価した。iPS細胞（図8 D）およびALS iPS細胞から作製されたALS星状細胞は、c-Ablのリン酸化の增加なしに、Srcのリン酸化の増加を示した（図8 E-H）。

[0086] 次に、ALS-MNに対するボスチニブの防御機構を解析するために、ミスフォールドしたタンパク質の分解を調査した。その結果、ALS MNsにおいてはp62レベルが上昇していたが、ボスチニブ処理によって減少し、ALS-MNにおけるオートファジーの効果を示唆するLC3-II/LC3-I比の変化も、ALS-MNにおいて、ボスチニブ処理により減退した（図3 A-C）。そこで、オートファジーの過程がALS-MNと関連するか否かを確認するために、mTORの阻害効果を調査

した。オートファジーを促進することが知られているmTOR阻害剤のラパマイシンおよびmTOR siRNAが、MNの生存を増加させた（図3 DおよびE）。このことは、オートファジーが、ALS-MNにおいて損なわれていることを示唆している。次に、ボスチニブの保護効果が、オートファジーの経路と関連するか否かを調査するために、オートファジー阻害剤であるLY294002およびクロロキンを、ボスチニブ処理したMNに添加した。これらのオートファジー阻害剤は、ボスチニブの保護効果を部分的に遮断した（図3 F）。以上より、ボスチニブの防御効果は、オートファジーの促進と関連することが強く示唆された。さらに、ウェスタンプロッティング（図3 G）およびELISA（図3 H）によって、ボスチニブ処理が、SOD1 mRNAの発現レベルを低下させずに（図3 I）、ALS-MNにおいてミスフォールドしたSOD1タンパク質レベルを低下させることを見出した。ALS-MN培養物もATPレベルの低下を示し、ボスチニブは、細胞内ATPの不足に対する減弱効果を有していた（図3 J）。これらのデータは、ボスチニブが、ミスフォールドしたSOD1タンパク質の分解を促進し、細胞のエネルギー不足を改善することを示唆するものである。ALS-MNの分子的背景をさらに調べるために、単一細胞RNAシーケンシングを用いて、トランスクリプトーム解析を行った（表8および9）。

[0087]

[表8-1]

脳細胞 RNA-Seq により同定された変異 3091 ALS-MN において高発現する遺伝子		
Gene name	log2 (fold change)	q-value
RWDD2B	14.22	0.003
MAD2L1BP	10.98	0.006
DTD1	10.77	0.001
ZNHIT6	9.82	0.029
ILF3-AS1	9.43	0.025
ELP3	7.97	0.014
CTDSPL2	6.81	0.039
LINC00665	6.61	0.019
COMMD9	5.14	0.005
KIAA1211	5.05	0.003
ST18	4.78	0.036
SECNLIC	4.73	0.016
RRAGD	4.19	0.013
FBXL20	4.12	0.047
LIG4	3.94	0.028
MRP86/SLC5A3	3.50	0.013
CLE1	3.38	0.009
BIRC2	3.08	0.001
AMY2B/BNPC3	3.01	0.025
AP182	2.91	0.036
LOC440434	2.91	0.021
SMIM14	2.61	0.013
PRYL	2.60	0.009
SELK	2.60	0.005
DCAF6/MPC2	2.57	0.047
SLU7	2.50	5.E-04
BEX1	2.43	0.009
SPTAN1/WDR34	2.35	0.019
DDX52	2.23	0.044
OCIAD2	2.10	3.E-04
SYT11	2.05	0.028
MAP2	2.04	0.013
HBS1L	1.99	0.001
SERINC1	1.94	0.004
IP6K2	1.77	0.014
BEX4	1.74	0.005
SESN3	1.69	0.028
RAB3D	1.67	0.009
RWDD1	1.67	0.006
GFM2/HEXB/NSA2	1.65	0.044
AUTS2	1.63	0.038
ZKSCAN1	1.62	0.009

[0088]

[表8-2]

单一生細胞 RNA-Seq により測定された変異 SOD1 ALS-MNにおいて高発現する遺伝子(続き)		
Gene name	log2 (fold change)	q-value
FUNDCC2	1.54	0.028
IGFBP7/LOC255130/POLR2B	1.51	0.009
ATP8B5P	1.51	0.040
GDI2	1.49	0.044
ATP6V0B	1.49	0.004
NDUFA8	1.46	0.018
PPP2R1A	1.44	0.003
GOLGA4	1.41	0.038
TMEM245	1.34	0.044
FNBPL	1.34	0.040
DNAJA1	1.29	5.E-05
ZFAND6	1.28	0.003
GTF2B	1.28	0.038
C1orf57/TIMM8B	1.22	0.013
GPRP1L1	1.21	0.044
SML4	1.16	0.038
SCG5	1.11	0.017
LOC389831	1.09	0.019
LRRK40	1.03	0.014
THOC7	1.02	0.005
POLR2J3	1.00	0.015

変異 SOD1 ALS-MN の平均発現レベルがコントロール MN のそれよりも 2 倍以上高い遺伝子をリストした。

[0089]

[表9]

Gene name	log2 (fold change)	q-value
HBG2	*	8.7674E-08
HBG1	*	8.7674E-08
HBE1	*	8.7674E-08
HBA1	*	3.9734E-07
ALAS2	*	0.0001
HBZ	*	0.0009
S100A8	*	0.0033
TDGF1	*	0.0046
AHSP	*	0.0054
TDGF1P3	*	0.0058
AIFI	*	0.0172
RHAG	*	0.0186
CRIL	*	0.0389
GYPA	*	0.0448
TAL1	*	0.0468
HBA2	-11.70	3.1443E-07
MEG3/MIR770	-9.32	0.0425
MTRNR2LI	-6.35	0.0001
TP10/WRAP53	-3.70	0.0425

コントロール MN の平均発現レベルが変異 SOD1 ALS-MN のそれよりも 2 倍以上高い遺伝子をリストした；\*ネガティブ・イシファイニティ

[0090] コントロールとALS MNとの間で差次的に発現する遺伝子の生物学的意義を明らかにするために、遺伝子セット濃縮解析（GSEA）を行った。その結果、mRNA発現の増加が、ALS-MNにおけるTCAサイクルおよび呼吸電子伝達系と関連しており、エネルギー不足を補償していることが見出された（図3 K）。ボスチニブ処理後、ALS-MNにおいて、TCAサイクルおよび呼吸電子伝達系に関連するmRNA発現は減少した（図9）。

[0091] さらに、突然変異型TDP-43-関連家族性ALS、C9orf72リピート伸長関連家族性ALSを含む、他の遺伝型の家族性ALSおよび孤発性のMNに対するSrc/c-Abl阻害剤の効果を評価した。家族性ALSの診断は遺伝子型（図5 A）によって確認し、孤発性ALSは患者線維芽細胞を用いた再配列決定によって検査した（表6）。死後の病理学的解析により、SALS患者（SALS1）の脊髄MNにおいて、TDP-43封入体が観察された。MNは、各iPS細胞から作製され（図4 A）、ボスチニブ処理は、種々のタイプの家族性ALSおよび孤発性ALSにおいて、生存してい

るMNを増加させた（図4 B）。ボスチニブ処理は、家族性および孤発性のALSのMNにおける異常タンパク質の蓄積を減少させた（図9 A – C）。

[0092] Src/c-Abl阻害剤がインビボで有効か否かを解析するために、ボスチニブを、突然変異型SOD1関連ALSの既知のモデルである突然変異型SOD1トランスジェニック（Tg）マウスに投与した。インビボでのMN変性に対するSrc/c-Abl阻害剤の効果を調査するために、我々のインビトロALSモデルと同様に、8週齢で、腹腔内注射によるボスチニブ（5mg/kg/日）処理を開始し、13週まで継続した。ボスチニブは疾患発症を遅延させ（図4 C）、突然変異型SOD1 Tgマウスの生存期間を延長した（図4 D）。Src/c-Ablは阻害され（図9 D）、脊髄中のミスフォールドしたSOD1タンパク質は、ビヒクリル処理と比較して、ボスチニブ処理突然変異型SOD1 Tgマウスにおいて減少した（図4 E）。MNの数は、ビヒクリル処理と比較して、ボスチニブ処理突然変異体型SOD1 Tgマウスにおいて有意に多かった（図4 FおよびG）。これらの結果は、Src/c-Abl阻害が、インビボでミスフォールドしたSOD1媒介性神経変性からMNを保護することを示すものである。

[0093] 最後に、ALS患者の死後脊髄組織を調査した。ALS脊髄全体においてSrcのリン酸化の増加傾向は顕著ではなかった（図10 B）が、リン酸化されたSrcの免疫反応性は、ALS脊髄の残存MNにおいて、リン酸化c-Ablのそれ[Katsumata, R., et al., PLoS One 7, e46185(2012)]と同様に増加した（図10 A、表3）。ALS患者のiPS細胞由来MNにおいてはSrcのリン酸化が増加していたので、これらの結果は、ALSにおいては初期段階でSrcのリン酸化が起こり得、患者のiPS細胞が、臨床開始前の初期段階で、ALS患者のMNを解析するのに有用であることを示唆する。

### 産業上の利用可能性

[0094] Src/c-Abl経路阻害薬は、ALSの予防及び／又は治療に有用である。特に、他の疾患に対する医薬品として既に上市されている薬剤は、安全性等の臨床及び非臨床データが蓄積されており、また、周辺化合物のライブラリーが既に存在するため、低コストにかつ迅速に、神経変性症を予防及び／又は治療

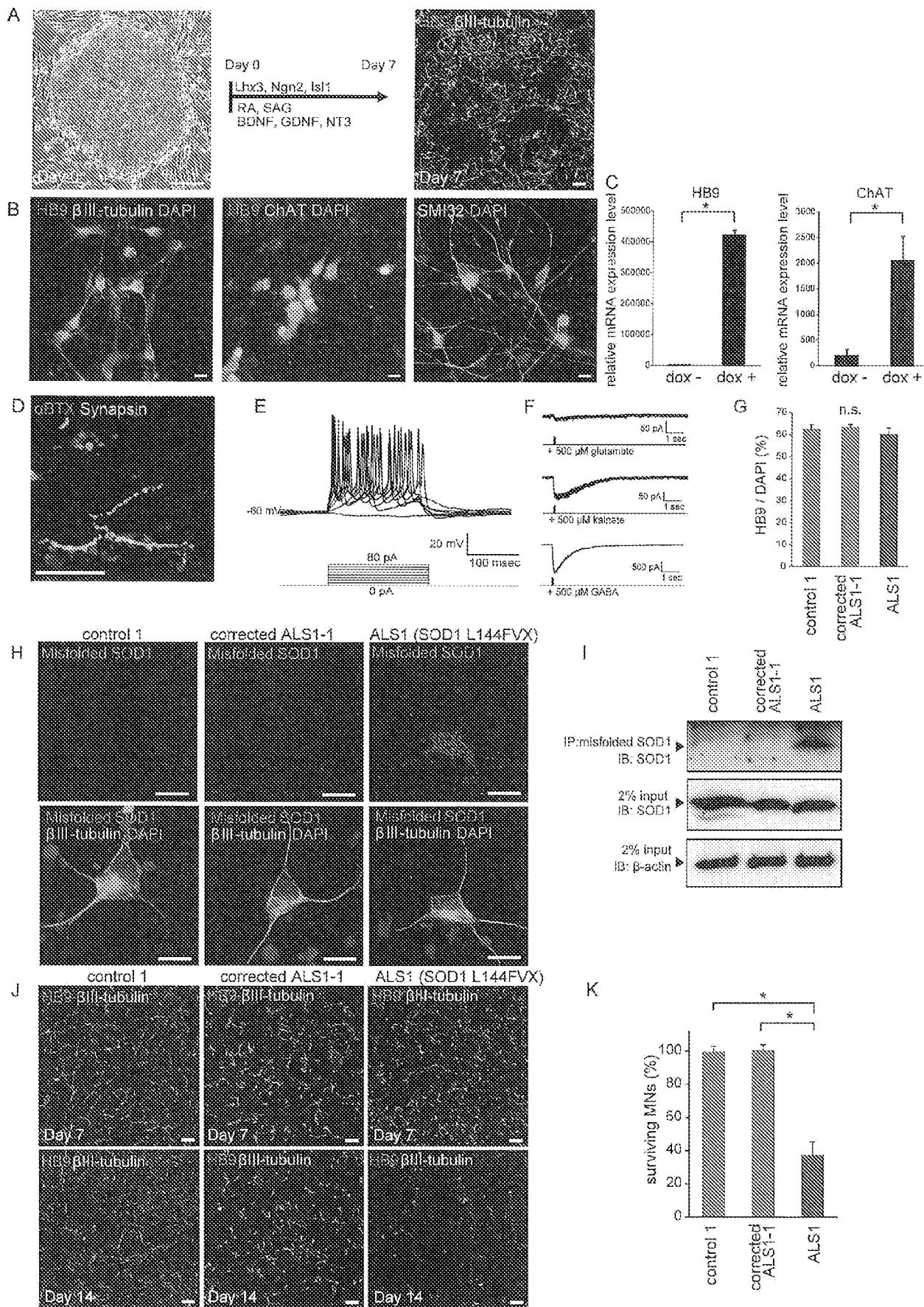
可能な医薬品を開発できる可能性がある。

[0095] 本出願は、日本で出願された特願2017-226368（出願日：2017年11月24日）を基礎としており、ここで言及することにより、その内容は全て本明細書に包含されるものである。

## 請求の範囲

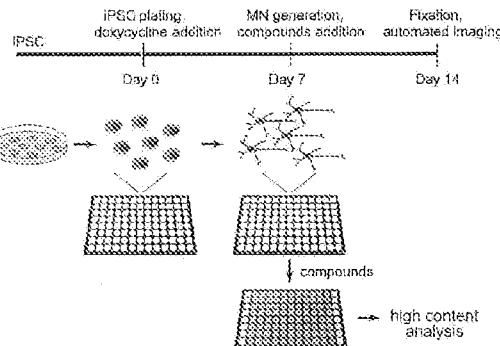
- [請求項1] Src/c-Abl経路阻害薬を含有してなる、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療剤。
- [請求項2] Src/c-Abl経路阻害薬が、ボスチニブ、ダサチニブ、レバスチニブ、ラドチニブ、チボザニブ、パゾパニブ、スニチニブ、BMS777607、CYC116、アキシチニブ、KW2449、VX-680、クリゾチニブ、MGCD-265、エンザスタウリン、ビスインドリルマレイミドI、サラカチニブ、イマチニブ、ニロチニブ及びそれらの類縁体から選択される、請求項1に記載の剤。
- [請求項3] Src/c-Abl経路阻害薬が、Src、c-Abl、Srcをリン酸化する受容体チロシンキナーゼ、もしくはプロテインキナーゼCに対する抑制性核酸又は中和抗体である、請求項1に記載の剤。
- [請求項4] 有効量のSrc/c-Abl経路阻害薬を、予防及び／又は治療を必要とする対象に投与することを含む、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療方法。
- [請求項5] Src、c-Abl、Srcをリン酸化する受容体チロシンキナーゼ、もしくはプロテインキナーゼCと試験化合物とを接触させ、該キナーゼのリン酸化を阻害した試験化合物を筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療薬の候補として選択することを含む、筋萎縮性側索硬化症の予防及び／又は治療薬のスクリーニング方法。

## [FIG 1]

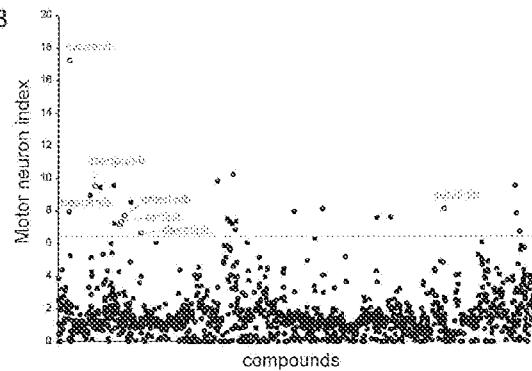


## [图2]

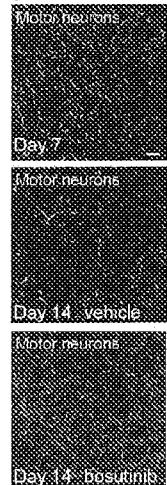
A



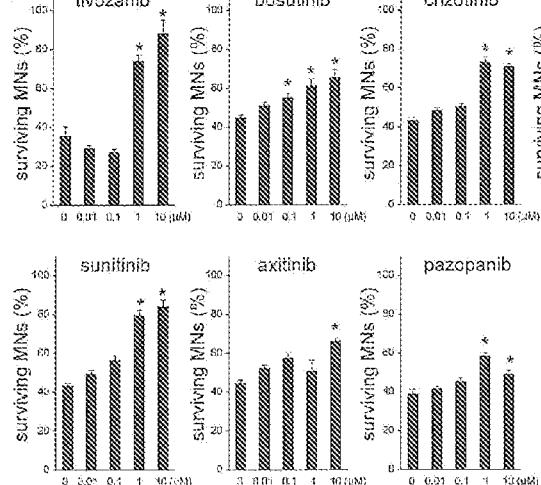
B



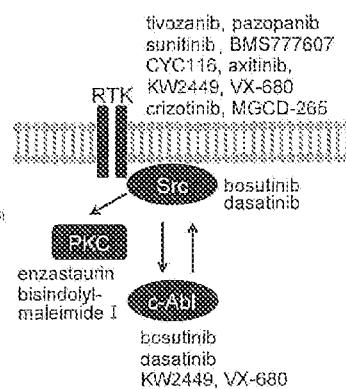
C



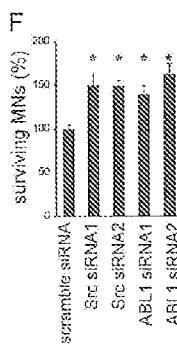
D



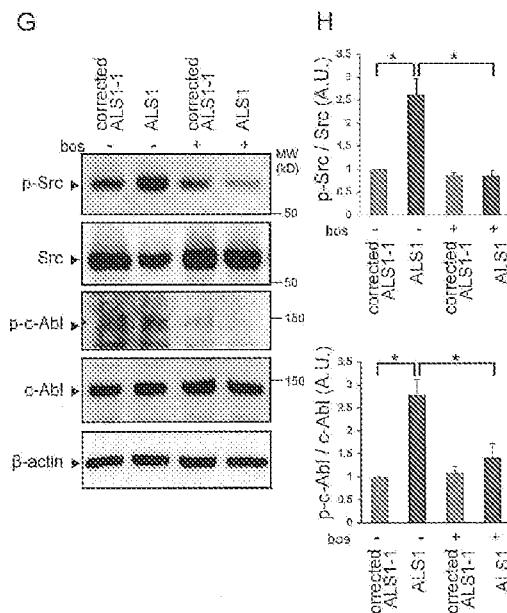
E



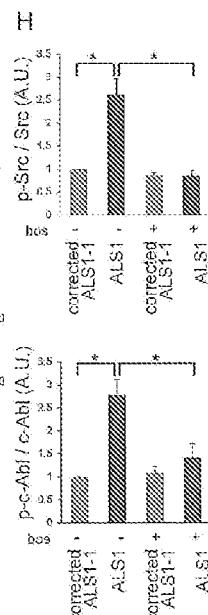
F



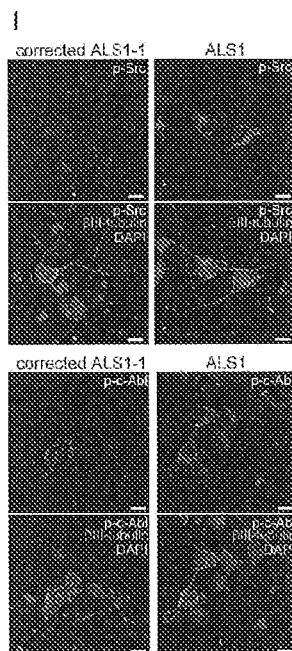
G



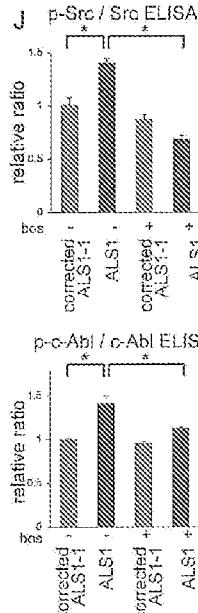
H



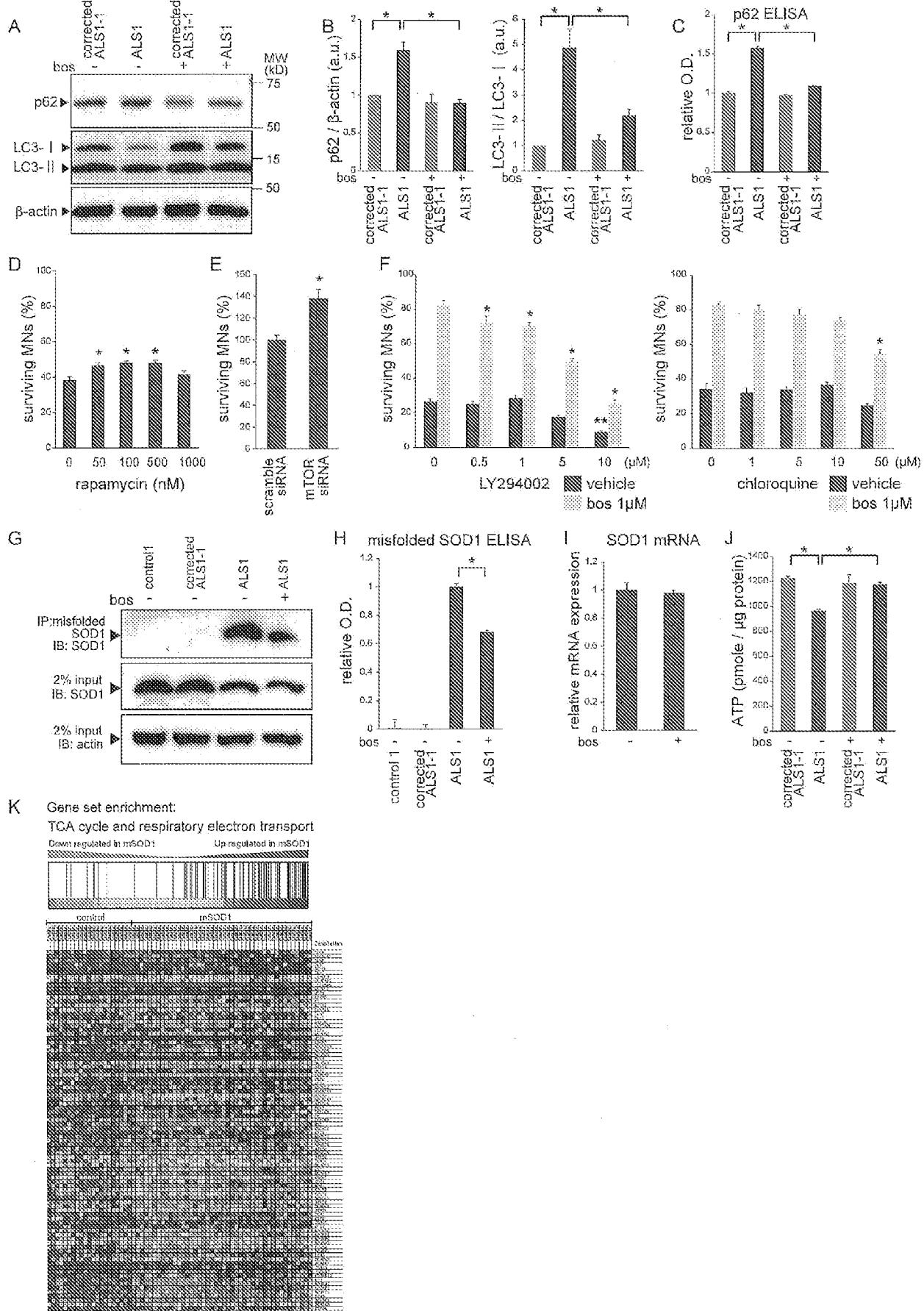
I



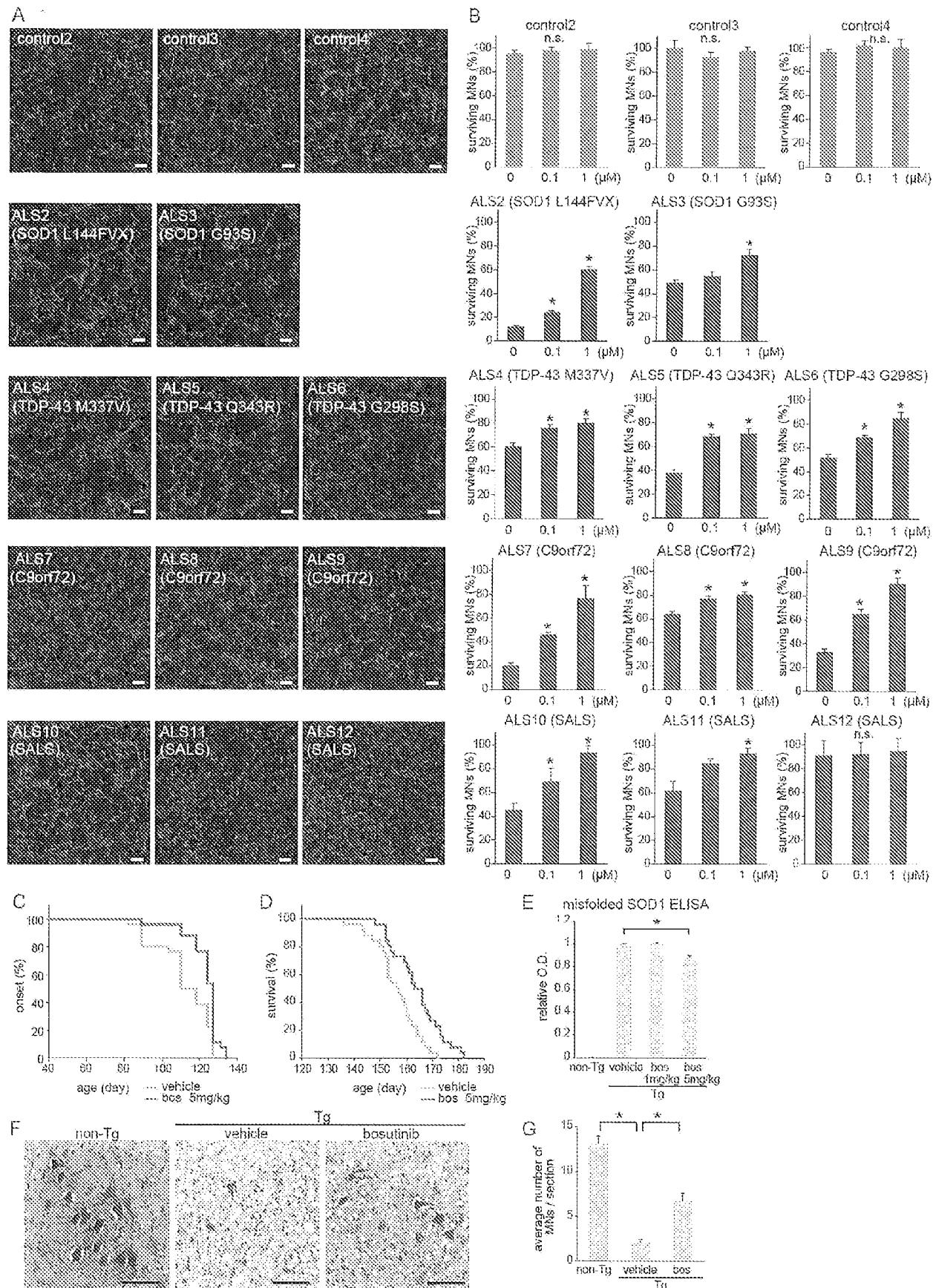
J



[FIG 3]

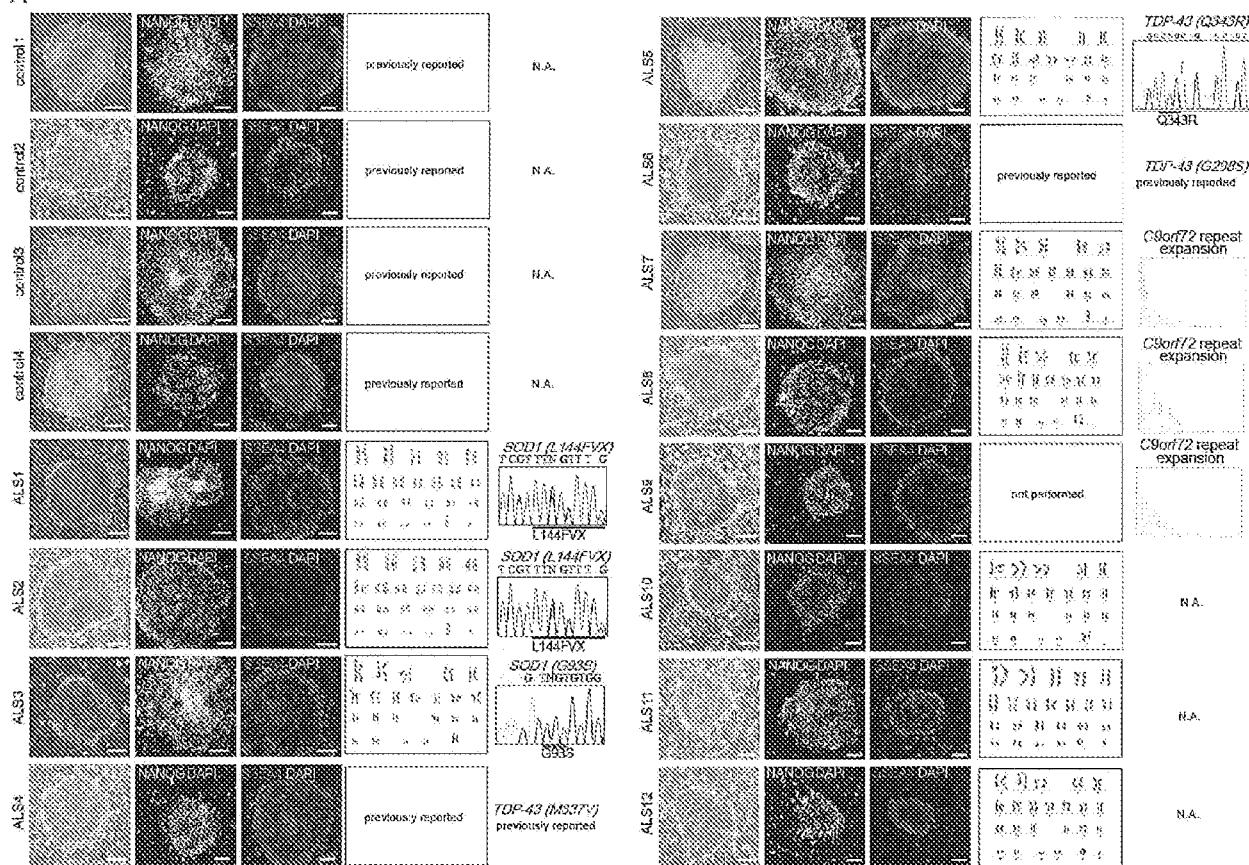


## [图4]

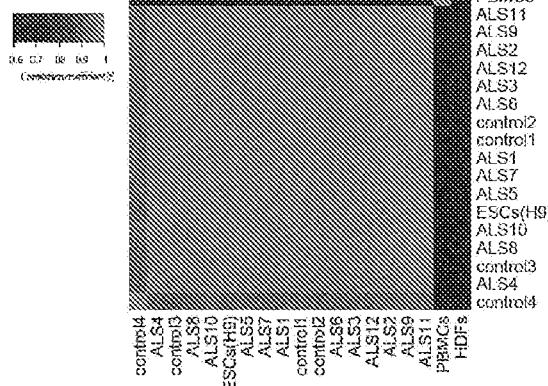


[FIG 5]

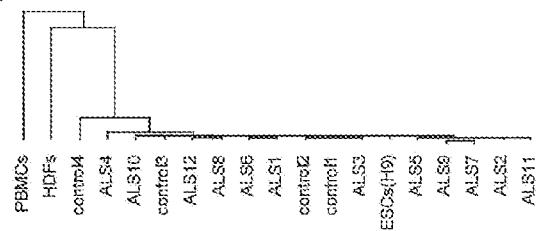
A



B



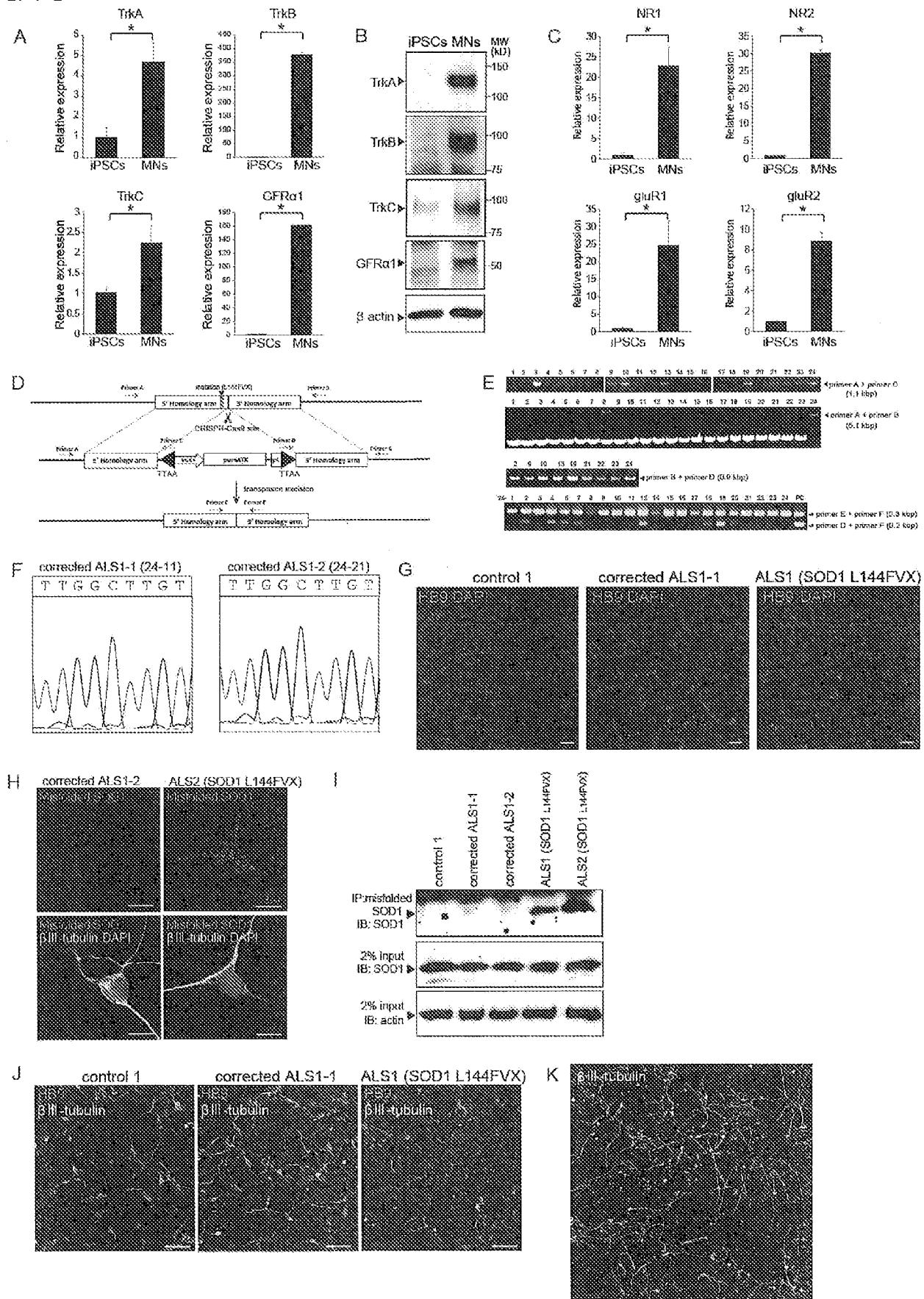
C



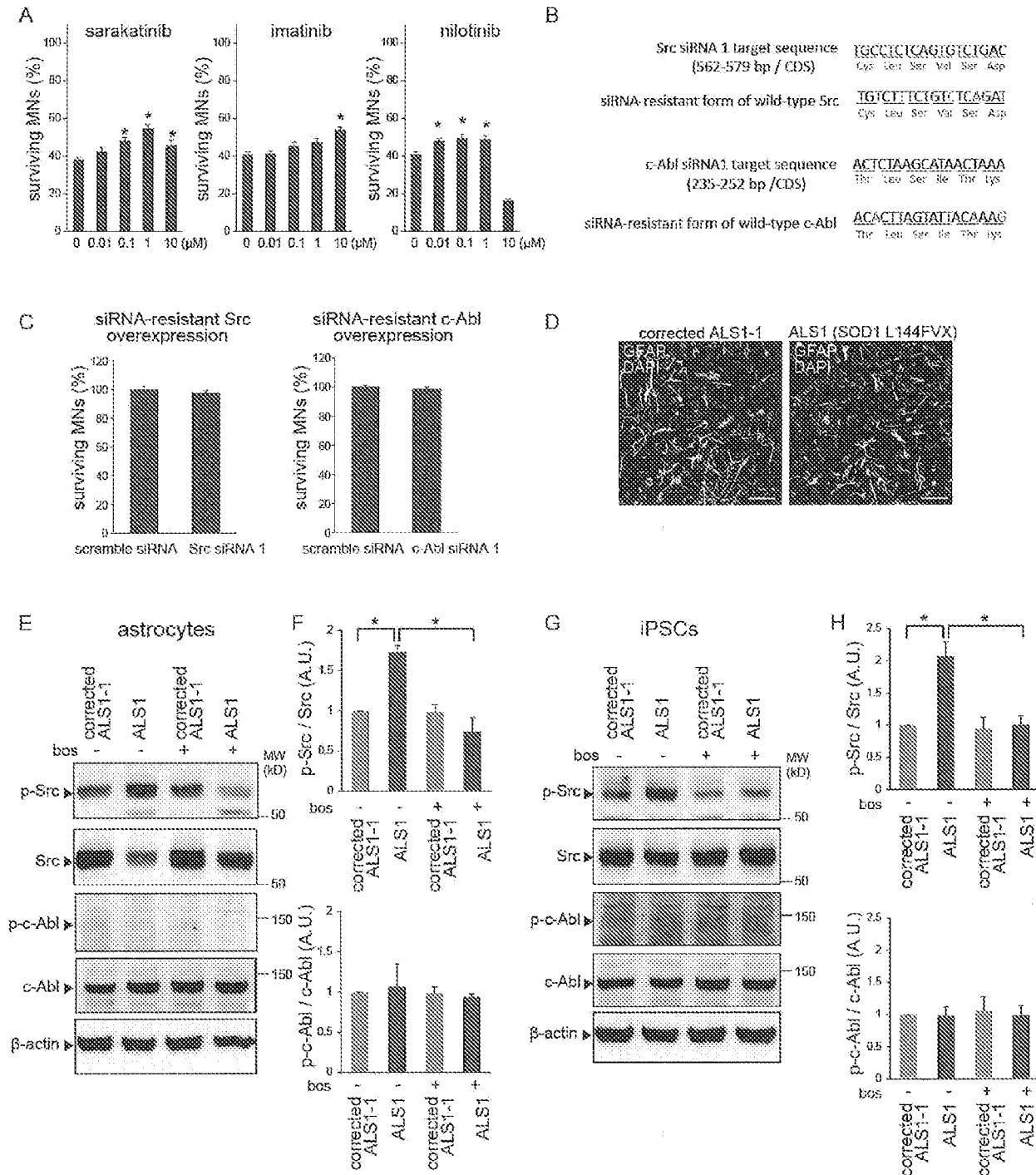
D

	control4	ALS4	control3	ALS8	ALS10	ALS1	control1	control2	ALS8	ALS5	ALS12	ALS2	ALS9	ALS11	ESCs(H9)	ALS5	ALS7	PBMCs	HDFs	
control4	1																			
ALS4	0.922307	1																		
control3		0.970213	1																	
ALS8	0.922301		0.977094	0.988003	1															
ALS10	0.946643		0.973988	0.983912	0.984706	1														
ALS1	0.927283		0.977038	0.961236	0.991862	0.893298	1													
control1	0.930015		0.977771	0.960345	0.993358	0.989374	0.993107	1												
control2	0.938478		0.978024	0.960122	0.993636	0.989321	0.992233	0.992473	1											
control3	0.94732		0.978377	0.961118	0.989843	0.982034	0.984771	0.982724	0.991251	1										
ALS2	0.942632		0.978304	0.969302	0.991616	0.980723	0.982021	0.984107	0.992453	0.993546	1									
ALS12	0.936982		0.99267	0.989002	0.993114	0.983588	0.98308	0.980989	0.981438	0.982028	0.982214	1								
ALS2	0.939448		0.981923	0.969305	0.950202	0.901525	0.993498	0.980721	0.9003	0.902356	0.902416	0.953794	1							
ALS9	0.939313		0.962234	0.967703	0.928873	0.983771	0.992602	0.982248	0.967723	0.982507	0.981219	0.983078	0.984473	1						
ALS11	0.941029		0.905364	0.988722	0.980603	0.980628	0.991777	0.989316	0.989321	0.986186	0.980778	0.992521	0.984496	0.984704	1					
ESCs(H9)	0.933893		0.988654	0.988112	0.988552	0.987586	0.987571	0.987806	0.988184	0.988341	0.988631	0.981438	0.982495	0.982065	0.980348	1				
ALS5	0.942447		0.980427	0.980703	0.989559	0.985725	0.988682	0.989168	0.989589	0.982586	0.982804	0.981198	0.982053	0.983361	0.983911	0.988748	1			
ALS7	0.938718		0.881244	0.887769	0.980801	0.985758	0.988251	0.989246	0.888738	0.888702	0.888742	0.981644	0.983658	0.984391	0.984098	0.889021	0.981848	1		
PBMCs	0.948443		0.821313	0.805631	0.813826	0.825985	0.813614	0.813706	0.814532	0.819086	0.921087	0.824627	0.623909	0.817125	0.620639	0.613985	0.811101	0.503160	1	
HDFs	0.587710		0.873857	0.865597	0.854277	0.869135	0.86712	0.897347	0.666198	0.875544	0.87863	0.684658	0.677217	0.871410	0.680188	0.684283	0.682327	0.685205	0.682860	1

## [图6]



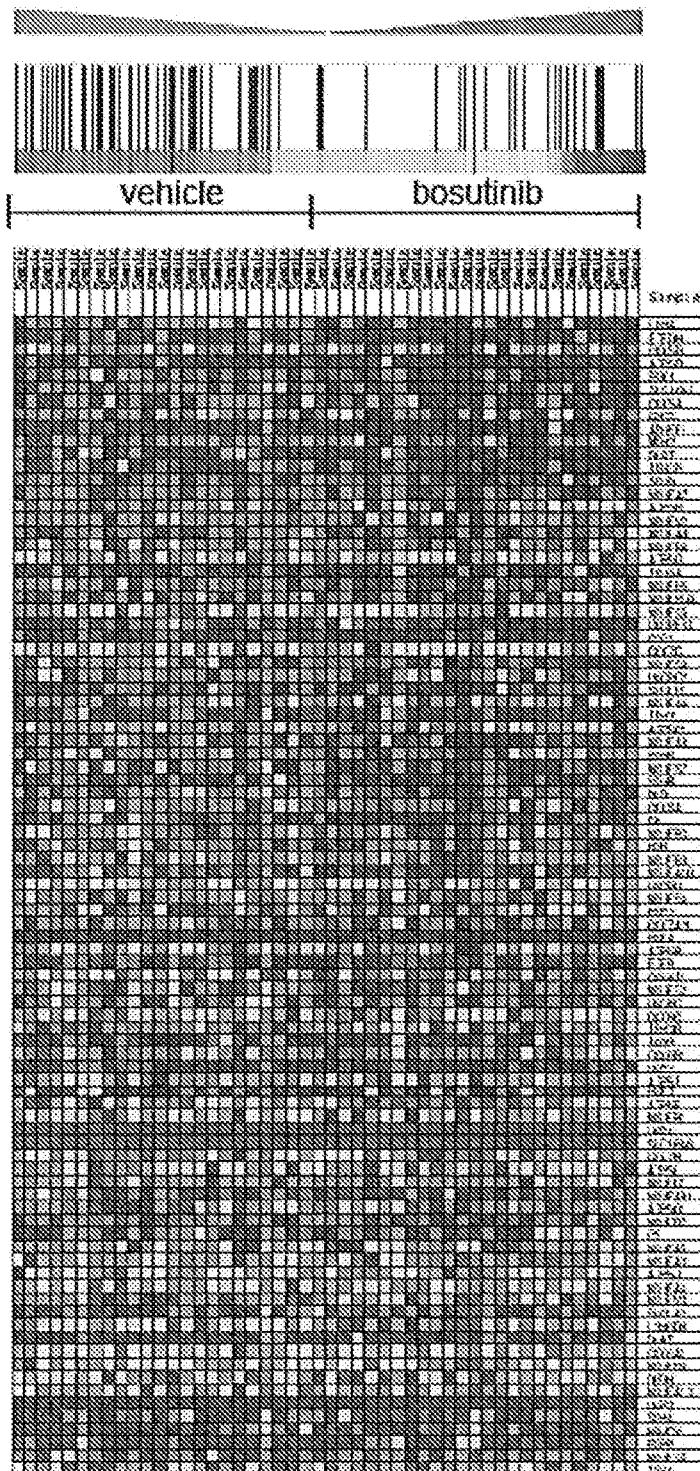
## [图7]



[図8]

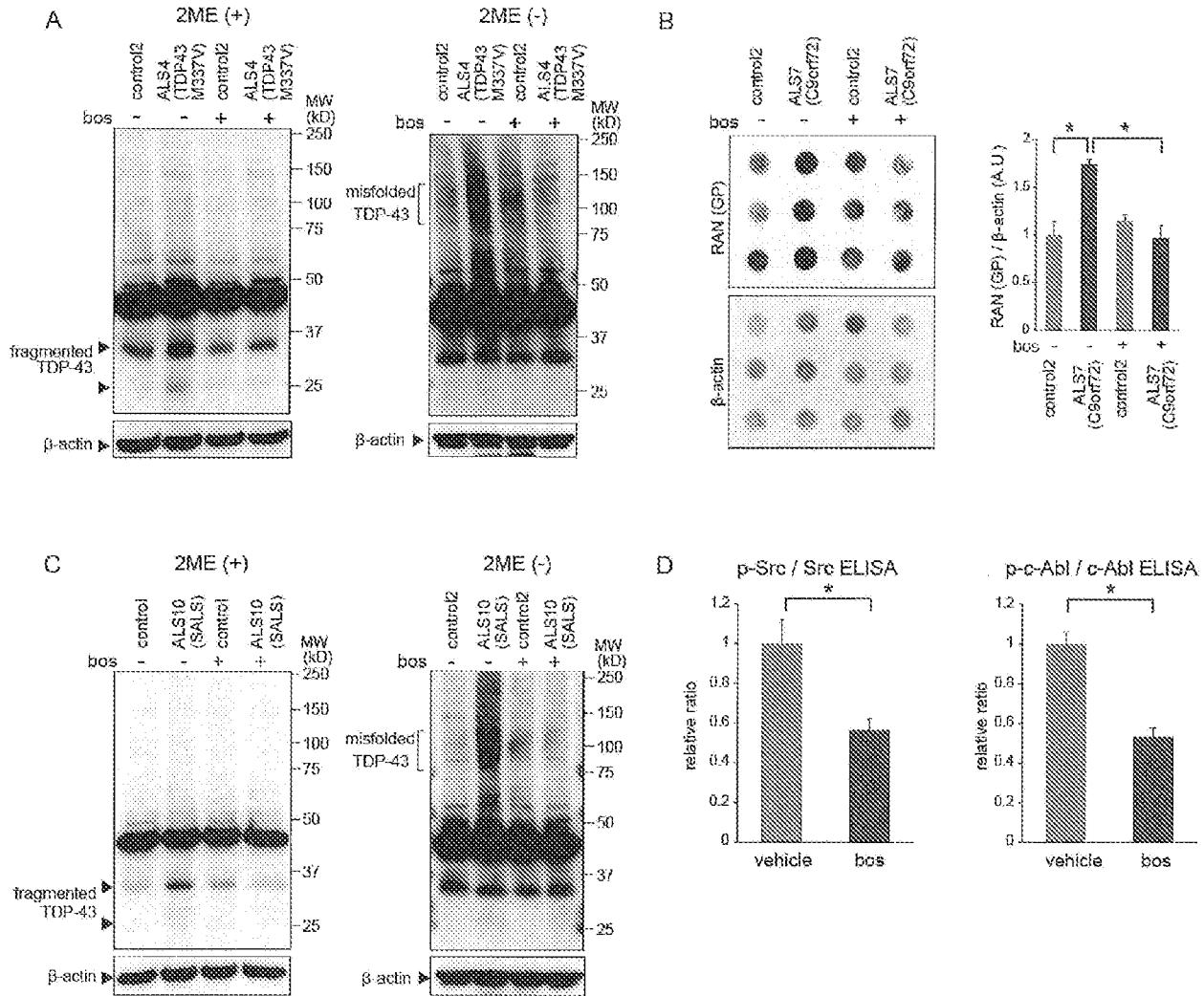
**Gene set enrichment:****TCA cycle and respiratory electron transport**

Down regulated in mSOD1      Up regulated in mSOD1

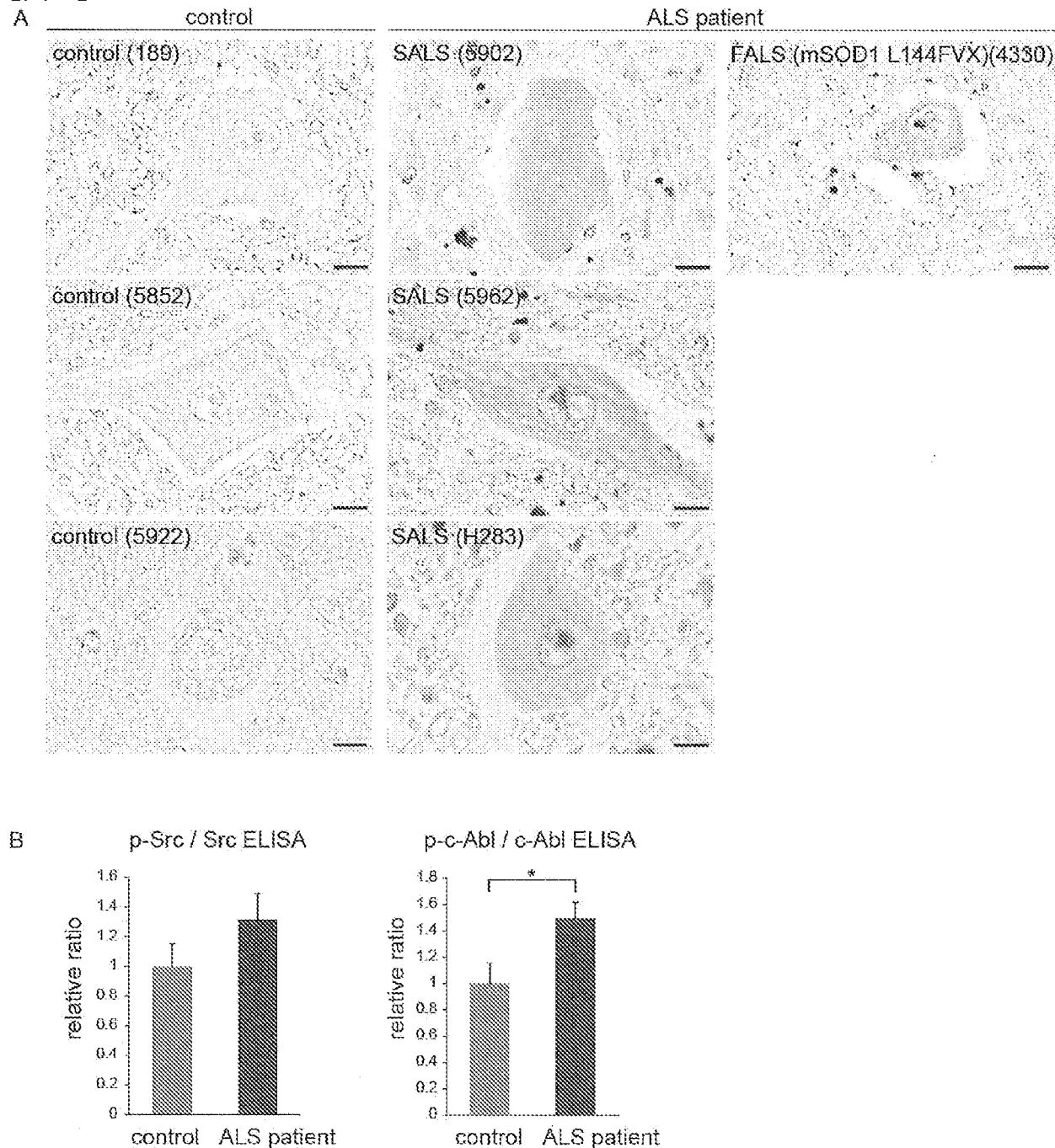


.

[図9]



[図10]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/043242

### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.	A61K45/00 (2006.01) i, A61K31/506 (2006.01) i, A61K39/395 (2006.01) i, G01N33/15 (2006.01) i, G01N33/50 (2006.01) i	A61K31/496 (2006.01) i, A61K31/7088 (2006.01) i, A61P21/02 (2006.01) i,
---------	--	---

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.	A61K45/00, A61K31/496, A61K31/506, A61K31/7088, A61K39/395, A61P21/02, G01N33/15, G01N33/50
---------	---

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

Published examined utility model applications of Japan	1922–1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971–2019
Registered utility model specifications of Japan	1996–2019
Published registered utility model applications of Japan	1994–2019

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2016-114322 A (KYOTO UNIVERSITY) 21 July 2016, examples 1–4 (Family: none)	1–4
X	KATSUMATA, R. et al., "c-Abl Inhibition Delays Motor Neuron Degradation in the G93A Mouse, an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis", PLOS ONE, 2012, vol. 7, no. 9, e46185, pp. 1–14, ISSN 1932-6203, in particular, abstract, fig. 2–6	1–5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
21 January 2019 (21.01.2019)

Date of mailing of the international search report  
05 February 2019 (05.02.2019)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer  
Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2018/043242

**C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IMAMURA, K. et al., "The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis", <i>Science Translational Medicine</i> , May 2017, vol. 9, eaaf3962, pp. 1-10, ISSN 1946-6242, in particular, abstract, fig. 2-4	1-5
P, X	OSAKI, T. et al., "Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons", <i>Science Advances</i> , October 2018, vol. 4, eaat5847, pp. 1-15, ISSN 2375-2548, in particular, abstract	1-5
P, X	MALLOZZI, C. et al., "Activation of Phosphotyrosine-Mediated Signaling Pathways in the Cortex and Spinal Cord of SOD1 <sup>G93A</sup> , a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis", <i>Neural Plasticity</i> , August 2018, vol. 2018, Article ID 2430193, pp. 1-10, ISSN 1687-5443, in particular, abstract	1-5

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/496(2006.01)i, A61K31/506(2006.01)i, A61K31/7088(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P21/02(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl. A61K45/00, A61K31/496, A61K31/506, A61K31/7088, A61K39/395, A61P21/02, G01N33/15, G01N33/50

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2019年
日本国実用新案登録公報	1996-2019年
日本国登録実用新案公報	1994-2019年

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2016-114322 A (国立大学法人京都大学) 2016.07.21, 実施例1-4 (ファミリーなし)	1-4
X	KATSUMATA, R. et al., c-Abl Inhibition Delays Motor Neuron Degradation in the G93A Mouse, an Animal Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis, PLOS ONE, 2012, Vol. 7, No. 9, e46185, p. 1-14, ISSN 1932-6203, 特にAbstract, Figures 2-6	1-5

☞ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☞ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリ

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 21.01.2019	国際調査報告の発送日 05.02.2019
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 高橋 樹理 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 4C 4498

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	IMAMURA, K. et al., The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis, <i>Science Translational Medicine</i> , 2017.05, Vol.9, eaaf3962, p.1-10, ISSN 1946-6242, 特に Abstract, Figures 2-4	1-5
P, X	OSAKI, T. et al., Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons, <i>Science Advances</i> , 2018.10, Vol.4, eat5847, p.1-15, ISSN 2375-2548, 特に Abstract	1-5
P, X	MALLOZZI, C. et al., Activation of Phosphotyrosine-Mediated Signaling Pathways in the Cortex and Spinal Cord of SOD1 <sup>G93A</sup> , a Mouse Model of Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis, <i>Neural Plasticity</i> , 2018.08, Vol.2018, Article ID 2430193, p.1-10, ISSN 1687-5443, 特に Abstract	1-5