

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関

国際事務局

(43) 国際公開日

2021年4月29日(29.04.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/079887 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A61K 31/197* (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

NOLOGY) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稻毛区穴川四丁目9番1号 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号 :

PCT/JP2020/039450

(22) 国際出願日 : 2020年10月20日(20.10.2020)

(25) 国際出願の言語 : 日本語

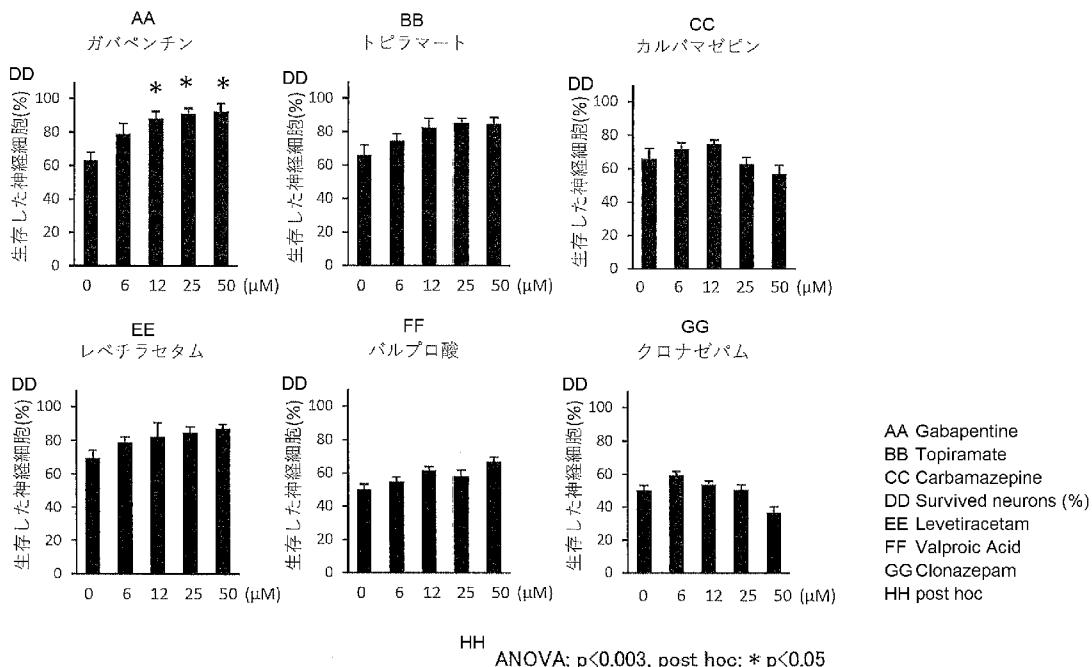
(26) 国際公開の言語 : 日本語

(30) 優先権データ :
特願 2019-194758 2019年10月25日(25.10.2019) JP(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (**KYOTO UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP). 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 (**NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM AND RADIOLOGICAL SCIENCE AND TECH-**(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). 橋口真人 (**HIGUCHI, Makoto**); 〒2638555 千葉県千葉市稻毛区穴川四丁目9番1号 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構内 Chiba (JP). 佐原成彦 (**SAHARA, Naruhiko**); 〒2638555 千葉県千葉市稻毛区穴川四丁目9番1号 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構内 Chiba (JP). 小野麻衣子 (**ONO, Maiko**); 〒2638555 千葉県千葉市稻毛区穴川四丁目9番1号 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構内 Chiba (JP).

(54) Title: PREVENTATIVE OR THERAPEUTIC AGENT FOR TAUOPATHY

(54) 発明の名称 : タウオパチーの予防又は治療剤

[図 2]

(57) Abstract: The present invention provides a preventative or therapeutic agent for tauopathy, that contains an $\alpha_2\delta$ inhibitor for voltage-gated calcium channels.(57) 要約: 本発明は、電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ の阻害薬を含有してなる、タウオパチーの予防又は治療剤を提供する。

[続葉有]



(74) 代理人: 高島一 (TAKASHIMA, Hajime);
〒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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

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

添付公開書類 :

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称：タウオパチーの予防又は治療剤

技術分野

[0001] 本発明は、タウオパチーに対する新規の予防又は治療剤に関する。より具体的には、本発明は細胞内へのカルシウムイオンの流入阻害薬を含有してなる、タウオパチーの予防又は治療剤に関する。

背景技術

[0002] 認知症患者は社会の高齢化に伴って増加の一途を辿っており、その多くはタウオパチー (Tauopathy) 患者であると推測されている。タウオパチーとは、脳内においてタウタンパク質の凝集化と細胞内蓄積を伴い、タウの凝集化が発症に寄与すると考えられる神経変性疾患の総称である。代表的な疾患としては、アルツハイマー病やタウオパチーを呈する前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration-Tau ; FTLD-Tau) が挙げられる。いずれも有効な治療法が確立されていないため、治療または予防効果を有する薬剤の開発が切望されている。

[0003] 近年、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 技術の進歩により、さまざまな神経変性疾患の細胞モデルが作成されている。本発明者らはこれまで、人工多能性幹細胞においてNeurogenin2 (Ngn2) を強制発現させることで、該細胞をグルタミン酸作動性の大脳皮質神経細胞へと迅速且つ高効率で分化誘導できることを報告した（特許文献1）。そして、この方法を用いて家族性FTLD-患者由来iPS細胞から作製される大脳皮質神経細胞は、タウのオリゴマー化が自発的に起こり細胞死に向かうこと、すなわち、優れたタウオパチー細胞モデルであることを明らかにした（特許文献2）。

[0004] さらに、本発明者らは、抑制性の人工受容体 (designer receptors exclusively activated by designer drug; DREADD) であるhM4Diを用いた解析により、前記タウオパチー細胞モデルでは神経活動が抑制されるとタウのオリゴマー化及び細胞死が軽減されることを明らかにした（特許文献3、非特許文

献1）。そして、NMDA型またはAMPA型グルタミン酸受容体のアンタゴニスト(AP5 (APV, R-2-amino-5-phosphonopentanoate)、CNQX(6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione))によっても、タウのオリゴマー化及び細胞死が軽減できることを明らかにした（特許文献2、3、非特許文献1）。

[0005] これらの知見から、神経活動に伴うカルシウム流入を阻害し得る薬剤が、タウオパチーの予防または治療薬になり得ることが示唆された。しかしながら、カルシウム流入に関与するタンパク質の内、どのタンパク質がタウオパチーの病態に特に重要であるかは依然として不明のままである。

[0006] 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。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO 2014/148646

特許文献2：WO 2016/076435

特許文献3：WO 2018/066701

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Imamura, K., et al., Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. Sci. Rep., 6:34904–34913, 2016.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 従って、本発明の課題は、ドラッグ・リポジショニングにより、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を用いた、タウオパチーの予防又は治療手段を提供することである。

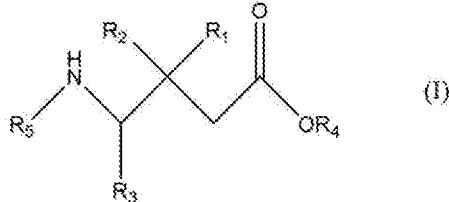
課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者らにより、AP5及びCNQXのタウオパチーモデル細胞に対する細胞死抑制効果が示されたが、これらの薬剤の使用はヒト以外の実験用途に限定されているため、予防・治療剤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。そこで、本発明者らは、既存薬の中から同様の効果を奏する薬剤の探索を試みた。具体的には、種々の既存薬約200種類と6種類のんかん治療薬について、前記タウオパチー細胞モデルに対する細胞死抑制効果を解析した。その結果、意外にも、電位依存性カルシウムチャネルの直接的な阻害剤ではなく、その補助的サブユニットの一つである $\alpha_2\delta$ のリガンドに過ぎないガバペンチンが、顕著な細胞死抑制効果を有することが明らかとなった。さらに、ガバペンチンには、タウオリゴマーの形成を阻害する効果もあることが確認された。
- [0011] また、ガバペンチンと同様に $\alpha_2\delta$ 阻害剤として知られるプレガバリンおよびミロガバリンにも、前記タウオパチー細胞モデルにおける細胞死とタウオリゴマー形成を顕著に阻害する効果があることが確認された。
- [0012] さらに、ガバペンチンは、タウオパチーマウスモデルの脳内で生じるタウ凝集化も阻害し得ることが示された。これらの結果に基づき、本発明を完成するに至った。
- [0013] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ の阻害薬を含有してなる、タウオパチーの予防又は治療剤。

[2] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、式(1)：

[0014] [化1]



[0015] [式 (I) 中、

R_1 は、炭素数 1 ~ 6 の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

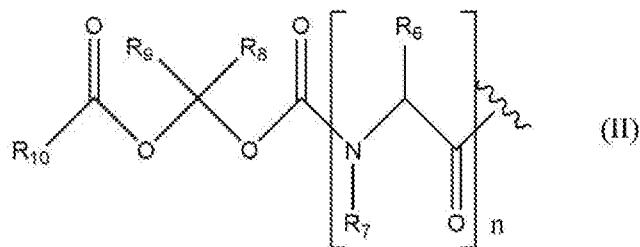
R_2 は水素原子又は炭素数 1 ~ 6 の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、 R_1 と R_2 とが結合して、5 員の炭素環と縮合していてもよい炭素数 4 ~ 6 のシクロアルカンを形成し、該 5 員の炭素環は、炭素数 1 ~ 6 のアルキル基、炭素数 2 ~ 6 のアルケニル基又は炭素数 3 ~ 7 のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

R_3 は、水素原子、メチル基又はカルボキシリル基であり；

R_4 は、水素原子又は炭素数 1 ~ 6 の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R_5 は、水素原子又は式 (II) :

[0016] [化2]



[0017] [式 (II) 中、

n は 0 又は 1 であり；

R_6 は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_6 と R_7 はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_7 は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリー

ルアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R_8 及び R_9 は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_8 と R_9 はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_{10} はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルである]

で示される基である】

で示される化合物又はその塩である、[1]に記載の剤。

[3] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、ガバペンチン、プレガバリン、ミロガバリン及びガバペンチンエナカルビル並びにそれらの類縁体から選ばれる1以上の化合物又はその塩である、[2]に記載の剤。

[4] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、ガバペンチン及びプレガバリンから選ばれる1以上の化合物又はその塩である、[3]に記載の剤。

[5] タウタンパク質のミスフォールディングの阻害剤である、[1]～[4]のいずれかに記載の剤。

[6] 前記タウオパチーがアルツハイマー病またはタウオパチーを呈する前頭側頭葉変性症(FTLD-Tau)である、[1]～[4]のいずれかに記載の剤。

[7] タウオパチーがMAPT遺伝子変異に起因するものである、[6]に記載の剤。

[8] 以下の工程を含む、タウオパチーの予防又は治療剤のスクリーニング方法。

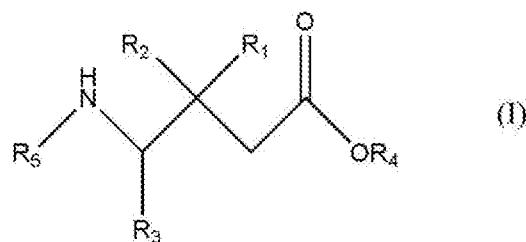
(1) 電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ と、被験物質とを接触させる工程、及び

(2) 工程(1)において $\alpha_2\delta$ と結合した被験物質を、タウオパチーの予防又は治療剤の候補として選択する工程

[9] 哺乳動物に対して、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬の有効量を投与することを含む、該哺乳動物におけるタウオパチーの予防又は治疗方法。

[10] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、式(I)：

[0018] [化3]



[0019] [式(I)中、

R₁は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R₂は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、R₁とR₂とが結合して、5員の炭素環と縮合していてよい炭素数4～6のシクロアルカンを形成し、該5員の炭素環は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

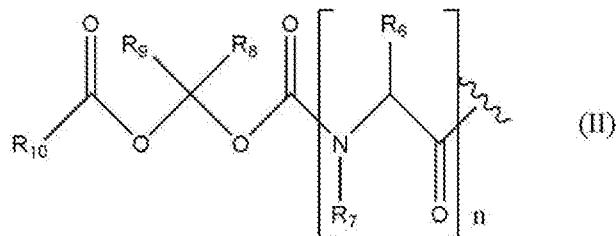
R₃は、水素原子、メチル基又はカルボキシリ基であり；

R₄は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R₅は、水素原子又は式(II)：

[0020]

[化4]



[0021] [式 (II) 中、

 n は 0 又は 1 であり；

R_6 は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_6 と R_7 はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_7 は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R_8 及び R_9 は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_8 と R_9 はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアル

キル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_{10} はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルである]で示される基である]

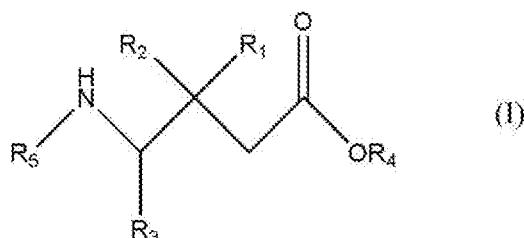
で示される化合物又はその塩である、[9]に記載の方法。

[11] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、ガバベンチン、プレガバリン、ミロガバリン及びガバベンチンエナカルビル並びにそれらの類縁体から選ばれる1以上の化合物又はその塩である、[9]又は[10]に記載の方法。

[12] タウオパチーの治療又は予防に使用するための、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬。

[13] 式(I)：

[0022] [化5]



[0023] [式(I)中、

R_1 は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

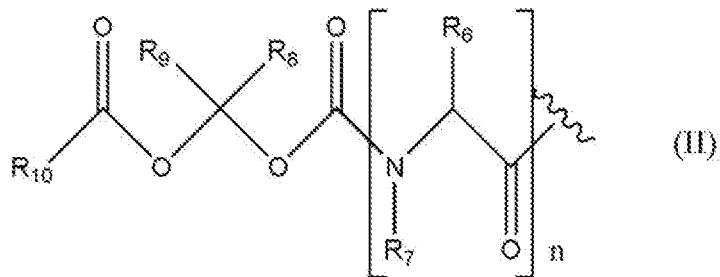
R_2 は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、 R_1 と R_2 とが結合して、5員の炭素環と縮合していてもよい炭素数4～6のシクロアルカンを形成し、該5員の炭素環は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

R_3 は、水素原子、メチル基又はカルボキシリル基であり；

R_4 は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R_5 は、水素原子又は式 (II) :

[0024] [化6]



[0025] [式 (II) 中、

n は0又は1であり；

R_6 は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_6 と R_7 はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_7 は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R_8 及び R_9 は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテ

ロアリールアルキルであり、又は、任意により、R₈とR₉はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R₁₀はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルである】
で示される基である】

で示される化合物又はその塩である、[12]に記載のα₂δの阻害薬。

[14] ガバベンチン、プレガバリン、ミロガバリン及びガバベンチンエナカルビル並びにそれらの類縁体から選ばれる1以上の化合物又はその塩である、[12]又は[13]に記載のα₂δの阻害薬。

[15] タウオパチーの予防又は治療剤の製造における、α₂δの阻害薬の使用。

発明の効果

[0026] 本発明によれば、タウオパチーに対する予防及び/又は治療が可能となる。特に、安全性が確認されている既存薬を有効成分とするものは、副作用の懸念が少ない。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]図1は、MAPT遺伝子にイントロン変異（イントロン10 + 14C→T）又はエクソン変異（R406W）のいずれかを有するFTLD-Tau患者由来のiPS細胞から誘導した、大脳皮質神経細胞のβ IIIチューブリン（TUBB3）及びNeuNの二重免疫蛍光染色の結果を示す。スケールバー=100 μm

[図2]図2は、イオンチャネルやイオン交換輸送体の阻害剤等として周知の既存薬6種類について、イントロン変異（イントロン10 + 14C→T）を有するFTLD-Tau患者由来iPS細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞の細胞死に対する抑制効果を解析した結果を示す。横軸は、各化合物の濃度、縦軸は、前記神

経細胞の生存率 (=Day21の生存細胞数／Day8の生存細胞数) ×100) を示す (n = 3; one-way ANOVA, p < 0.05; post hoc test, *p < 0.05)。エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。

[図3]図3は、エクソン変異 (R406W) を有するFTLD-Tau患者由来iPS細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞で生じるタウタンパク質のミスフォールディングに対する、ガバペンチンの抑制効果を解析した結果を示す。図3左図はウエスタンプロット分析、図3中央図はドットプロット分析の結果を示し、図3右図は前記ドットプロット分析の結果を定量化したグラフを示す (n=3; one-way ANOVA, p < 0.05; post hoc test, * p < 0.05)。エラーバーは標準誤差 (SEM) を表す。図3中央図及び右図において、上図はサンプルとして培養上清を用いた場合の結果を、下図はサンプルとして細胞溶解物を用いた場合の結果を示す。

[図4]図4は、プレガバリンとミロガバリンについて、FTLD-Tau患者由来iPS細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞の細胞死に対する抑制効果を解析した結果を示す (n=6; one-way ANOVA, p < 0.05; post hoc test, * p < 0.05)。詳細は図2と同じである。

[図5]図5は、FTLD-Tau患者由来iPS細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞で生じるタウタンパク質のミスフォールディングに対する、プレガバリンの抑制効果を解析した結果 (ドットプロット分析) を示す。詳細は図3と同じである。

[図6]図6は、FTLD-Tau患者由来iPS細胞から分化誘導した大脳皮質神経細胞で生じるタウタンパク質のミスフォールディングに対する、ミロガバリンの抑制効果を解析した結果 (ドットプロット分析) を示す。詳細は図3と同じである。

[図7]図7は、タウオパチーマウスモデルの脳内で生じるタウ凝集化に対するガバペンチン (経口投与) の抑制効果について、陽電子放出断層撮像(PET)を用いて解析した結果である。図7 Aは、ガバペンチン投与マウスおよび非投与マウスにおける、[¹⁸F]PM-PBBの時間-放射能曲線データを表す。図7 Bは、[¹⁸F]

]PM-PBB3静注後40-60分後における、海馬および大脳皮質を含む脳断面の、小脳を対象領域としたStandardized uptake value ratio (SUVR) 画像（上段）、前記SUVR画像とMRI画像との重ね合わせた画像（下段）をそれぞれ表す。図7Cは、図7BのSUVR画像で得られたradioactivityの平均値を表すグラフである（ガバペンチン投与マウス：n=2、非投与マウス：n=1）。

発明を実施するための形態

[0028] 1. 本発明の剤

本発明は、電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ の阻害薬を含有してなる、タウオパチーの予防又は治療剤（以下、予防剤と治療剤とを包含するものとして、「本発明の剤」との用語を用いる場合がある。）を提供する。別の態様において、本発明は、タウオパチーの治療又は予防に使用するための、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬を提供する。さらに別の態様において、本発明は、タウオパチーの予防又は治療剤の製造における、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬の使用も提供する。

[0029] <<タウ>>

タウは、主に神経系で発現する微小管結合タンパク質で、チューブリンの重合促進と微小管の安定化を行い、神経軸索の構築と維持に寄与している。MAPT遺伝子にコードされ、選択的スプライシングによってヒト脳では6種類のアイソフォームが発現する。特に、エクソン10の選択的スプライシングは重要で、該エクソンがスプライシングされると微小管結合に関わる反復配列を3個有する3R型（3リピートタウ）を生じ、スプライシングされないと該配列を4個有する4R型（4リピートタウ）を生じる。通常ヒト成人脳では、4リピートタウの発現量と3リピートタウの発現量はほぼ同じレベルである。

いずれのアイソフォームも過剰にリン酸化されると微小管との結合能を失い、自己凝集することが知られている（Lee V.M., et al., Annu. Rev. Neurosci., 24:1121-159, 2001）。

[0030] <<タウオパチー>>

前述した通り、タウオパチーとは、脳内においてタウタンパク質の凝集化と細胞内蓄積を伴い、タウの凝集化が発症に寄与すると考えられる神経変性

疾患の総称である。タウオパチーの代表としては、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease;AD) 、タウオパチーを呈する前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal lobar degeneration tauopathy ; FTLD-tau) 、前頭側頭型認知症(Frontotemporal dementia;FTD) 、ピック病 (Pick's disease) 、進行性核上性麻痺 (progressive supranuclear palsy;PSP) 、大脳皮質変性症 (corticobasal degeneration;CBD) 、嗜銀顆粒性認知症 (嗜銀性顆粒病) 、神経原線維変化型認知症、石灰沈着を伴うび慢性神経原線維変化病 (Diffuse neurofibrillary tangles with calcification ; DNTC) 、筋強直性ジストロフィー 、パントテン酸キナーゼ関連神経変性症 (Pantothenate kinase-associated neurodegeneration ; PKAN) 、 β プロペラ蛋白関連神経変性症 (β -propeller protein-associated neurodegeneration ; BPAN) 、鉄沈着をきたす神経変性疾患 (neurodegeneration with brain iron accumulation ; NBIA) 、ハンチントン病等が挙げられる。このうち、FTLD-tauの一種である、第17染色体遺伝子に連鎖しパーキンソンズムを伴う前頭側頭型認知症 (frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17;FTDP-17) では、当該患者より多数のMAPT遺伝子変異が同定されており、タウの異常と発症との関係が精力的に解析されている。当該変異は、変異型タウタンパク質を生じるタイプ（エクソン変異）と、エクソン10のスプライシング異常を生じるタイプ（主にイントロン変異）に大別されており、エクソン変異だけでなくイントロン変異の場合でもタウタンパク質が凝集化して蓄積することが報告されている (Hutton, M., et al., Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. Nature 393, 702-705, 1998.) 。

[0031] $\alpha_2\delta$ の阻害薬又は本発明の剤は上記いずれのタウオパチーに対しても予防または治療剤として用いることができるが、好ましくはアルツハイマー病およびFTLD-tauである。これらの患者はMAPT遺伝子に変異を有していてもよく、有していないてもよい。また、家族性であっても、孤発性であってもよい。さらに、MAPT遺伝子に変異を有する場合には、エクソンの変異（例えば、R

406Wの変異)、イントロンの変異(例えば、MAPT遺伝子のイントロン10の14番目の塩基であるシトシンがチミンに置換した、イントロン10 +14C →Tの変異)のいずれであってもよい。

[0032] <<電位依存性カルシウムチャネル>>

電位依存性カルシウムチャネル(voltage-dependent calcium channel; VDCC)とは、形質膜の脱分極を感じて活性化開口し、細胞外から細胞内へCa²⁺を選択的に透過させるイオンチャネルである。開口する電位により、VDCCは、高電位(～-20 mV)で活性化するL型および非L型と、低電位(～-60 mV)で活性するT型に大別され、非L型はさらにN型、P/Q型、R型に分けられる。VDCCは、チャネルそのもの(channel pore)を形成する巨大なα₁サブユニットと、2または3種類の補助的サブユニット(α₂δ、β、γ)から形成される。このうち、チャネルの特性を決めているのはα₁サブユニットで、補助的サブユニットは、α₁サブユニットの発現調節や細胞内局在等に寄与していると考えられている(Bauer CS., et al., A new look at calcium channel α2δ subunits. Curr Opin Neurobiol., 20:563-71, 2010.)。

[0033] α₂δサブユニット(本明細書では、「α₂δ」と省略する場合がある)は、単一の遺伝子にコードされるα₂およびδがジスルフィド結合によって結ばれた二量体であり、4種類のアイソフォームが知られている(α₂δ-1、α₂δ-2、α₂δ-3、α₂δ-4)。α₂δ-1をコードする遺伝子はCACNA2D1(GeneBank Acecession No:NM_000722(ヒト))として、α₂δ-2をコードする遺伝子はCACNA2D2(GeneBank Acecession No:NM_001005505(ヒト))として、α₂δ-3をコードする遺伝子はCACNA2D3(GeneBank Acecession No:NM_018398(ヒト))として、α₂δ-4をコードする遺伝子はCACNA2D4(GeneBank Acecession No:NM_172364(ヒト))として知られている。α₂δは、α₂δをコードする遺伝子から、α₂とδとが融合した形態(Pro-form)で発現した後に、翻訳後修飾によりα₂とδとに分断され、α₂とδとの間でジスルフィド結合が形成されて二量体となる(Dolphin A.C., Biochim Biophys Acta., 1828(7):1541-9(2013))。α₂δサブユニットは、α₁サブユニットの形質膜への輸送に寄与していることが知られている

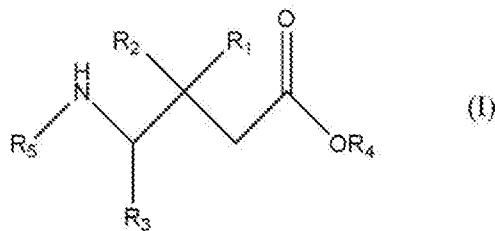
(Davies A., et al., Trends Pharmacol Sci., 28(5):220-8 (2007))。本発明で用いる $\alpha_2\delta$ の阻害薬が標的とする $\alpha_2\delta$ のアイソフォームは、特に限定されないが、中枢神経系で高発現している $\alpha_2\delta-1$ 、 $\alpha_2\delta-2$ 及び $\alpha_2\delta-3$ が好ましく、中でも $\alpha_2\delta-1$ 及び $\alpha_2\delta-2$ が好ましい。

[0034] << $\alpha_2\delta$ の阻害薬>>

本明細書において、「 $\alpha_2\delta$ の阻害薬」（「本発明の化合物」ともいう。）とは、 $\alpha_2\delta$ の機能（例： α_1 サブユニットの発現誘導、 α_1 サブユニットの形質膜への輸送等）を阻害する化合物を意味し、該阻害により、間接的にVDCCによるカルシウムイオンの細胞内への流入が抑制され得る。従って、本明細書において、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬には、VDCCのチャネルそのものに結合してVDCCによるカルシウム流入を直接阻害する物質は含まれない。かかる $\alpha_2\delta$ の阻害薬には、 $\alpha_2\delta$ リガンド、 $\alpha_2\delta$ に対する抗体、アプタマー、 $\alpha_2\delta$ の発現阻害薬などが含まれる。

[0035] 本明細書において、「 $\alpha_2\delta$ リガンド」とは、 $\alpha_2\delta$ と結合して $\alpha_2\delta$ の機能を阻害できる化合物を意味し、本発明に用いる $\alpha_2\delta$ リガンドとしては、 $\alpha_2\delta$ の機能を阻害できる限り特に制限されないが、開発コストを低く抑える観点からは、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が好ましい。また、副作用を軽減する観点からは、 $\alpha_2\delta$ に対して特異的に結合する化合物であることが好ましい。具体的には、例えば、式(1)：

[0036] [化7]



[0037] [式(I)中、

R₁は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R₂は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、R₁とR₂とが結合して、5員の炭素環と縮合していてよい炭素数4～

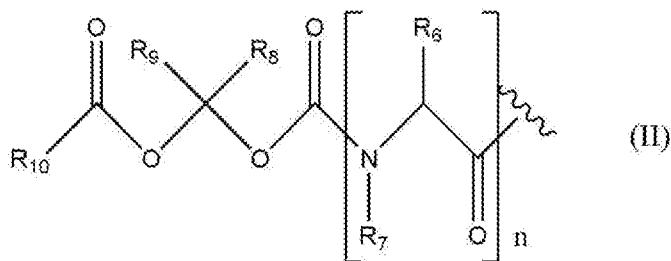
6のシクロアルカンを形成し、該5員の炭素環は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

R_3 は、水素原子、メチル基又はカルボキシリ基であり；

R_4 は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R_5 は、水素原子又は式(II)：

[0038] [化8]



[0039] [式(II)中、

n は0又は1であり；

R_6 は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_6 と R_7 はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_7 は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリール

アルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R_8 及び R_9 は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_8 と R_9 はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し：

R_{10} はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルである]

で示される基である】

で示される化合物が挙げられる。

[0040] 式(I)の R_5 が式(II)で示される基である化合物は、 R_5 が水素原子である化合物のプロドラッグとして機能する。プロドラッグとして機能する化合物のさらなる具体例として、例えば、(1) R_8 が水素であり、 R_9 が水素、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、シクロヘキシル又はフェニルであり、 R_{10} がメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、1,1-ジメトキシエチル、1,1-ジエトキシエチル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、フェニル、4-メトキシフェニル、ベンジル、フェネチル、スチリル又は3-ピリジルである化合物、(2) R_8 及び R_9 がメチルであり、 R_{10} がメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペン

チル、1,1-ジメトキシエチル、1,1-ジエトキシエチル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、フェニル、4-メトキシフェニル、ベンジル、フェネチル、スチリル又は3-ピリジルである化合物、(3) R_8 がメチルであり、 R_9 がメトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル又はシクロヘキシルオキシカルボニルであり、 R_{10} がメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、1,1-ジメトキシエチル、1,1-ジエトキシエチル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、フェニル、4-メトキシフェニル、ベンジル、フェネチル、スチリル又は3-ピリジルである化合物、(4) R_9 と R_8 がそれらが結合している原子とシクロヘキシル環を形成し、 R_{10} がメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、sec-ペンチル、ネオペンチル、1,1-ジメトキシエチル、1,1-ジエトキシエチル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、フェニル、4-メトキシフェニル、ベンジル、フェネチル、スチリル又は3-ピリジルである化合物、(5) R_8 が水素であり、 R_9 が水素、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル又はtert-ブチルであり、 R_{10} がメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、1,1-ジメトキシエチル、1,1-ジエトキシエチル、シクロブチル、シクロペンチル又はシクロヘキシルである化合物、(6) R_8 が水素であり、 R_9 がメチル、n-プロピル又はイソプロピルであり、 R_{10} がエチル又はイソプロピルである化合物、(7) R_8 が水素であり、 R_9 がメチルであり、 R_{10} がイソプロピルである化合物、(8) R_8 が水素であり、 R_9 がメチルであり、 R_{10} がエチル又はイソプロピルである化合物、(9) R_8 が水素であり、 R_9 がメチルであり、 R_{10} がイソプロピルである化合物などが挙げられる。さらに具体的には、式(I)で示される化合物として、ガバペンチンエナカルビルが挙げられる。

[0041] 上記式(I)の各基の説明で記載される各用語は、特表2005-529941における

る定義や説明に従う。上記式（1）で示される化合物は、自体公知の方法により製造することができるが、例えば、特表2005-529941に記載の方法などが挙げられる。

[0042] 本明細書において、「置換された」（単に「置換」ともいう）は、1つ以上水素原子が置換基に置き換えられることを意味する。典型的な置換基は、-M、-R⁶⁰、-O-、=O、-OR⁶⁰、-SR⁶⁰、-S-、=S、-NR⁶⁰R⁶¹、=NR⁶⁰、-CF₃、-CN、-OCN、-SCN、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-S(O)₂O⁻、-S(O)₂OH、-S(O)₂R⁶⁰、-OS(O₂)O-、-OS(O)₂R⁶⁰、-P(O)(O⁻)₂、-P(O)(OR⁶⁰)(O⁻)、-OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹)、-C(O)R⁶⁰、-C(S)R⁶⁰、-C(O)OR⁶⁰、-C(O)NR⁶⁰R⁶¹、-C(O)O-、-C(S)OR⁶⁰、-NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹、-NR⁶²C(S)NR⁶⁰R⁶¹、-NR⁶²C(NR⁶³)NR⁶⁰R⁶¹、-C(NR⁶²)NR⁶⁰R⁶¹（ここで、Mは独立してハロゲンであり；R⁶⁰、R⁶¹、R⁶²及びR⁶³は独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール又は置換ヘテロアリールであり、又は、任意により、R⁶⁰とR⁶¹はそれらが結合している窒素原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；R⁶⁴及びR⁶⁵は独立して水素、アルキル、置換アルキル、アリール、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、アリール、置換アリール、ヘテロアリール又は置換ヘテロアリールであり、又は、任意により、R⁶⁴とR⁶⁵はそれらが結合している窒素原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成する。）を含んでいるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、置換基は、-M、-R⁶⁰(=O)-OR⁶⁰、-SR⁶⁰、-S-、=S、-NR⁶⁰R⁶¹(=NR⁶⁰)-CF₃(-CN)-OCN(-SCN)-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-S(O)₂R⁶⁰、-OS(O₂)O-、-OS(O)₂R⁶⁰、-P(O)(O⁻)₂、-P(O)(O⁻)₂、-OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹)、-C(O)R⁶⁰、-C(S)R⁶⁰、-C(O)OR⁶⁰、-C(O)NR⁶⁰R⁶¹、-C(O)NR⁶⁰R⁶¹、-C(O)O-、-NR⁶²C(O)NR⁶⁰R⁶¹、更に好ましく-M、-R⁶⁰、=O、-OR⁶⁰、-SR⁶⁰、-NR⁶⁰R⁶¹、-CF₃、-CN、-NO₂、-S(O)₂R⁶⁰、-P(O)(OR⁶⁰)(O⁻)、-OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹)、-C(O)R⁶⁰、-C(O)OR⁶⁰、-C(O)NR⁶⁰R⁶¹、-C(O)O-、最も好ましくは-M、-R⁶⁰、=O、-OR⁶⁰、-SR⁶⁰、-NR⁶⁰R⁶¹、-CF₃、-CN、-NO₂、-S(O)₂R⁶⁰、-OP(O)(OR⁶⁰)(OR⁶¹)、-C(O)

R^{60} 、 $-C(O)OR^{60}$ 、 $-C(O)O-$ (ここで、 R^{60} 、 R^{61} 、 R^{62} は上で定義した通りである。)を含んでいる。

[0043] 本明細書において、 $R_6 \sim R_{10}$ 、 $R^{60} \sim R^{65}$ が炭素原子を含む場合、それぞれの炭素数は、典型的には1～20個、好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～6個である。

[0044] また、式(1)の R_5 が水素原子である化合物として、例えば、ガバペンチン、プレガバリン、ミロガバリン、それらの類縁体などが挙げられる。

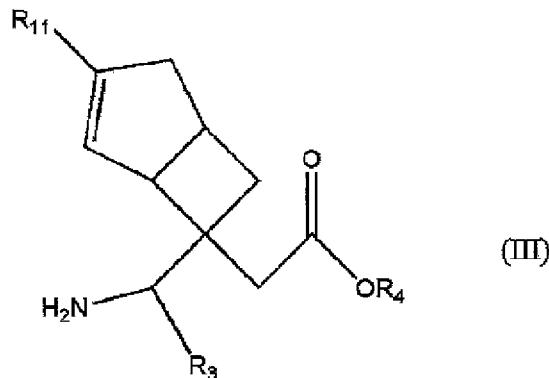
[0045] ガバペンチンの類縁体としては、上記式(1)の R_1 と R_2 とが結合して、炭素数4～6のシクロアルカン、好ましくは炭素数6のシクロアルカン、を形成し、 R_3 は、水素原子、メチル基又はカルボキシル基、好ましくは水素原子、であり、 R_4 は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基、好ましくは水素原子である化合物が挙げられる。上記式(1)の R_1 と R_2 とが結合して、炭素数6のシクロアルカンを形成し、 R_3 及び R_4 が水素原子である化合物がガバペンチンである。ガバペンチン及びその類縁体は、自体公知の方法により製造することができるが、例えば、特開昭51-88940に記載の方法などが挙げられる。

[0046] プレガバリンの類縁体としては、上記式(1)の R_1 は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基、好ましくは、イソブチル基、であり、 R_2 は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基、好ましくは水素原子であり、 R_3 は、水素原子、メチル基又はカルボキシル基、好ましくは水素原子、であり、 R_4 は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基、好ましくは水素原子である。上記式(1)の R_1 がイソブチル基であり、 $R_2 \sim R_4$ が水素原子である化合物がプレガバリンである。プレガバリン及びその類縁体は、自体公知の方法により製造することができるが、例えば、特開2000-34226に記載の方法などが挙げられる。

[0047] ミロガバリンの類縁体としては、下記式(III)：

[0048]

[化9]



[0049] [式中、 R_3 は、水素原子、メチル基又はカルボキシル基、好ましくは水素原子、であり；

R_4 は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基、好ましくは水素原子、であり、

R_{11} は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基、好ましくはエチル基、である]

で示される化合物が挙げられる。上記式(Ⅰ)の R_3 が水素原子、 R_4 が水素原子、 R_{11} がエチル基である化合物がミロガバリンである。ミロガバリン及びその類縁体は、自体公知の方法により製造することができるが、例えば、W02009/041453に記載の方法などが挙げられる。

[0050] 本発明の化合物には、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。

[0051] 本発明の化合物が、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、その混合物も本発明の化合物に包含される。例えば、本発明の化合物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の化合物に包含される。

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。

本発明の化合物は、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。

本発明の化合物は、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、³H、¹⁴C、³⁵S、¹²⁵I等）等で標識された化合物も、本発明の化合物に包含される。

[0052] 本発明で用いる抗 $\alpha_2\delta$ 抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。あるいは、市販品を用いてもよい。本発明で使用される抗体の由来は特に限定されるものではないが、好ましくは哺乳動物由来であり、より好ましくはヒト由来の抗体である。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるもののいずれもでよい。抗体産生ハイブリドーマは、自体公知の方法により作製することができ、例えば、 $\alpha_2\delta$ 又はその一部を抗原として使用して、該抗原を通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリ

ーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

- [0053] 本発明で用いるアプタマーは、核酸アプタマーであっても、ペプチドアプタマーであってもよい。核酸アプタマーの場合、該核酸は、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。また、リボース、リン酸骨格、核酸塩基、アミノ酸残基、両末端部分に修飾が加えられた核酸又はペプチドであってもよい。核酸アプタマーは、二本鎖であっても一本鎖であってもよいが、好ましくは一本鎖である。本発明のアプタマーは、当業者において周知の方法を用いて選別することができる。限定はしないが、例えば、SELEX法 (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk, C. and Gold, L., 1990, Science, 249: 505-510) や酵母のTwo-hybrid法により選別することができる。
- [0054] 本発明で用いる $\alpha_2\delta$ の発現阻害薬は、 $\alpha_2\delta$ をコードする遺伝子の転写レベル、転写後調節のレベル、タンパク質への翻訳レベル、翻訳後修飾のレベル等のいかなる段階で作用するものであってもよい。従って、 $\alpha_2\delta$ の発現阻害薬としては、例えば、 $\alpha_2\delta$ をコードする遺伝子の転写を阻害する核酸（例：アンチジーン）、初期転写産物からmRNAへのプロセッシングを阻害する核酸、mRNAからタンパク質への翻訳を阻害するか（例：アンチセンス核酸、miRNA）あるいはmRNAを分解する（例：siRNA、リボザイム、マイクロRNA(miRNA)）核酸などが含まれる。
- [0055] siRNAは、 $\alpha_2\delta$ 遺伝子のcDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)) の提唱する規則に従って設計することができる。また、siRNAの前駆体であるショートヘアピンRNA (shRNA) は、ループ構造を形成しうる任意のリンクー配列（例えば、5-25塩基程度）を適宜選択し、siRNAのセンス鎖とアンチセンス鎖とを該リンクー配列を介して連結することにより設計することができる。
- [0056] siRNA及び／又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、D

harmaconが提供するsiDESIGN Center (<http://dharmacon.horizondiscovery.com/jp/design-center/?rdr=true&LangType=1041&pageId=17179928204>)、GenScriptが提供するsiRNA Target Finder (<https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0057] miRNAは、種々のwebサイト上に無料で提供される標的予測ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、米国ホワイトヘッド研究所が公開しているTargetScan (http://www.targetscan.org/vert_72/)、ギリシアのアレクサンダー・フレミング生体医科学研究センターが公開しているDIANA-micro-T-CDS (http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT_CDS/index) 等が挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、チェザレー大学・パストール研究所等が公開している、標的mRNAに作用することが実験的に証明されているmiRNAに関するデータベースであるTarBase (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8/index) を用いて、 $\alpha_2\delta$ をコードするmRNAを標的とするmiRNAを検索することもできる。

[0058] siRNAは、mRNA上の標的配列のセンス鎖及びアンチセンス鎖をDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95°Cで約1分程度変性させた後、約30～約70°Cで約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、siRNAの前駆体となるshRNAを合成し、これをダイサー (dicer) を用いて切断することにより調製することもできる。miRNA及びpre-miRNAは、それらの配列情報に基づいて、DNA/RNA自動合成機で合成することができる。

[0059] アンチセンス核酸は、DNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。アンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてタンパク質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限は

なく、タンパク質をコードするmRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約10塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。また、アンチセンス核酸は、標的mRNAや初期転写産物とハイブリダイズしてタンパク質への翻訳を阻害するだけでなく、二本鎖DNAであるこれらの遺伝子と結合して三重鎖（トリプレックス）を形成し、RNAへの転写を阻害し得るもの（アンチジーン）であってもよい。

- [0060] アンチセンス核酸は、標的遺伝子のcDNA配列もしくはゲノミックDNA配列に基づいてmRNAもしくは初期転写産物の標的配列を決定し、市販のDNA/RNA自動合成機を用いて、これに相補的な配列を合成することにより調製することができる。
- [0061] 本発明の剤は、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、適当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。
- [0062] 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、 α 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；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；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ーチ、カルボキシメチルスターーチナトリウム、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。

[0063] 本発明の剤の有効成分である本発明の化合物の投与量は、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、本発明の化合物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。

- [0064] さらに、本発明の剤は、他の薬剤、例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害薬（例：フルボキサミン、パロキセチン、セルトラリン等）、セロトニン2Aアンタゴニスト／再取り込み阻害薬（例：トラドゾン等）などと併用してもよい。本発明の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。
- [0065] 本発明の化合物の有効量又は本発明の剤を哺乳動物（治療または予防の対象とする動物）に投与する治療及び／又は予防方法も、本発明に含まれる。該動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト）が挙げられ、好ましくはヒトである。

[0066] 2. 本発明の方法

本発明はまた、以下の工程を含む、タウオパチーの予防又は治療剤のスクリーニング方法（以下「本発明の方法」と省略する場合がある）を提供する。

（1）電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ と、被験物質とを接触させる工程、及び

（2）工程（1）において $\alpha_2\delta$ と結合した被験物質を、タウオパチーの予防又は治療剤の候補として選択する工程。

- [0067] 下述の実施例で示す通り、本発明者らにより、カルシウムチャネルを構成するサブユニットの局在等の調節を行う補助的サブユニット $\alpha_2\delta$ のリガンドであるガバペンチンが、顕著な細胞死抑制効果を示すことが明らかとなった。ガバペンチンは、 $\alpha_2\delta$ に結合することで、その機能を阻害し、その結果間接的にVDCCによるカルシウムイオンの細胞内への流入を抑制し、タウオパチーの予防又は治療効果を発揮すると考えられる。従って、 $\alpha_2\delta$ に結合する物質をスクリーニングできれば、該物質をタウオパチーの予防又は治療剤の候

補として用いることができる。

- [0068] 本発明の方法で用いる $\alpha_2\delta$ は、 $\alpha_2\delta-1$ 、 $\alpha_2\delta-2$ 、 $\alpha_2\delta-3$ 、 $\alpha_2\delta-4$ のいずれであってもよいが、 $\alpha_2\delta-1$ 、 $\alpha_2\delta-2$ 及び $\alpha_2\delta-3$ が好ましく、中でも $\alpha_2\delta-1$ 及び $\alpha_2\delta-2$ が好ましい。また、これら的一部であってもよく、例えば、 α_2 ドメインの全部または一部、各 δ ドメインの全部または一部などが挙げられる。また、 $\alpha_2\delta$ は、例えば、上記Pro-formなどの α_2 と δ との融合タンパク質の形態であってもよく、また、 α_2 と δ とがジスルフィド結合などにより結合していてもよい。また、融合タンパク質の形態で提供される場合、 α_2 と δ とは、GSリンカーなどのリンカーを介して融合していてもよい。
- [0069] 上記 $\alpha_2\delta$ は、遺伝子工学的手法または化学的合成法によって製造されたものを使用してもよい。遺伝工学的手法としては、例えば、公知の配列情報に基づき、 $\alpha_2\delta$ をコードする核酸を作製し、該核酸から、細胞を用いて、あるいは無細胞系でタンパク質を合成させることで、製造することができる。
- [0070] 本発明において、 $\alpha_2\delta$ と被験物質とが「結合する」（「結合性を有する」ともいう）とは、両方の物質を接触させた場合に、それらの物質の間で相互作用が生じ得る程度に互いに近接しているか、あるいは会合した状態になることを意味する。かかる相互作用としては、例えば、共有結合、配位結合、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス結合、疎水相互作用などが挙げられる。
- [0071] また、 $\alpha_2\delta$ と被験物質との結合性の有無は、結合活性または親和性の指標を測定することにより、決定することができる。結合親和性の指標としては、例えば、解離定数（ K_D ）やその逆数である結合定数（会合定数ともいう）などを挙げることができる。解離定数は、自体公知の方法により測定することができ、例えば、表面プラズモン共鳴を用いた方法、等温滴定カロリメトリ一法などを挙げられる。
- [0072] 表面プラズモン共鳴を測定、算出するためのシステムとしては、例えば、ビアコア（Biacore）・システム（GE Healthcare社）などが挙げられるが、これに限定されない。ビアコア・システムを用いた場合、例えば、次の手順

により K_D を測定することができる。 (1) ビアコア・システムのセンサーチップ上に $\alpha_2 \delta$ をアミンカップリング等により固定化する、 (2) 複数の濃度に調製した被験物質を含む溶液中で、 $\alpha_2 \delta$ と被験物質とを接触させる、 (3) 両者の相互作用を表面プラズモン共鳴により検出する、 (4) 一連の結合及び解離反応を、横軸を時間とし、縦軸を結合量 (RU) とする、センサーグラムとして描き出す、 (5) 各濃度で作成したセンサーグラムから、ソフトウェア (例 : BIAevaluation ソフトウェア (GE Healthcare 社) 等) を用いて、1 : 1 ラングミュアーモデルにフィッティングさせ、各種速度パラメーターを算出する、 (6) 各種速度パラメーターから解離定数を算出する。

[0073] 等温滴定カロリメトリー法に用いるシステムとしては、例えば、MicroCal・システム (GE Healthcare 社) などが挙げられるが、これに限定されない。 MicroCal・システムを用いた場合、例えば、次の手順により K_D を測定することができる。 (1) 一定温度に保たれた、 $\alpha_2 \delta$ を含むサンプルセルに被験物質を含む溶液を滴定し攪拌する、 (2) 分子間相互作用により結合量に正比例した熱の発生または吸収が起り、サンプルセル中の溶液温度が変化する、 (3) セルフィードバックネットワーク (CFB) がリファレンスセルとの温度差 (ΔT) を感知する、 (4) $\Delta T = 0$ になるようにリファレンスセルまたはサンプルセルを加熱する、 (5) $\Delta T = 0$ を保持するために要したフィードバック電力を測定することで、相互作用による発熱量または吸熱量を得る、 (6) 発生熱量を縦軸に、 $\alpha_2 \delta$ と被験物質のモル比を横軸にとり、結合等温線から解離定数を算出する。

[0074] 本明細書において、表面プラズモン共鳴を用いて測定した場合に、 K_D が 1500nM 以下であれば、 $\alpha_2 \delta$ に対して結合性を有すると評価することができ、 K_D の値が低いほど、 $\alpha_2 \delta$ に対する結合性が高いと評価することができる。 K_D は、 1000nM 以下であることが好ましく、 500nM 以下であることがより好ましく、 300nM 以下であることがさらに好ましく、 100nM 以下であることが特に好ましい。

[0075] 本発明の方法で用いる被験物質としては、例えば、細胞抽出物、細胞培養

上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、および天然化合物が例示される。前記被験物質はまた、(1) 生物学的ライブラリー、(2) デコンヴォルーションを用いる合成ライブラリー法、(3) 「1ビーズ1化合物 (one-bead one-compound)」ライブラリー法、および(4) アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する合成ライブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る (DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-13; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-6; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303-5; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液 (Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-21を参照のこと) またはビーズ (Lam (1991) *Nature* 354:82-4)、チップ (Fodor (1993) *Nature* 364:555-6)、細菌 (米国特許第5,223,409号)、胞子 (米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、および同第5,223,409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-9) 若しくはファージ (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-90; Devlin (1990) *Science* 249:404-6; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-82; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-10; 米国特許出願第2002-103360号) として作製され得る。

[0076] 本発明の方法によりタウオパチーの予防又は治療剤の候補として選択した

被験物質（以下、「候補物質」ともいう）については、さらに、神経細胞におけるタウタンパク質のミスフォールディングに対する阻害効果を評価してもよい。当該阻害効果は、ミスフォールドされたタウタンパク質の細胞内蓄積又は細胞外への放出を阻害する効果として評価してもよい。かかる評価方法は、例えば、（1）候補物質を、タウオパチーの病態を伴う神経細胞に添加し、ミスフォールドされたタウタンパク質の細胞内量又は培地中に含まれる量（培地中量）を検出又は測定する工程、及び（2）前記細胞内量又は培地中量が、該候補物質を添加する前又は添加しない対照群と比較して低値となる候補化合物を、ミスフォールドされたタウタンパク質の細胞内蓄積又は細胞外への放出を阻害する化合物と評価する工程、を含む方法などが挙げられる。ここで、低値とは、対照群の細胞内量又は培地中量（対照値）に対して、90%、80%、70%、60%、50%、又は40%以下の値であることをいう。

[0077] 本発明における“ミスフォールドされたタウタンパク質”は、好ましくは“タウオリゴマー”である。“タウオリゴマー”とは、タウ（モノマー）が3—50個会合した会合体を指し、可溶性タウオリゴマーであっても不溶性タウオリゴマーであっても良い。可溶性タウオリゴマーとは、例えば、1% Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether (Triton X-100, CAS No. 9002-93-1)に溶解後、10,000xg程度の遠心操作によって上清に回収されるオリゴマーであってよく、また、不溶性タウオリゴマーとは、該遠心操作後に沈殿として回収されるオリゴマーであってよい。なお、本発明のタウオリゴマーには、不溶性タウオリゴマーが互いに結合した線維状構造物であるタウ線維（例えば、PHF等）は、含まれない。

本発明におけるタウオリゴマーは、リン酸化を含めて、種々の化学的修飾を受けていても良い。また、他のタンパク質及び／又は核酸（DNA, RNA）と複合体を形成していてもよい。

[0078] ミスフォールドされたタウタンパク質の量は、当業者に周知に方法で測定することができる（例として、特許文献2、特許文献3）。例えば、これに限定されることは無いが、抗タウタンパク質抗体を用いたドットプロット

分析(Dot blot analysis)や、ミスフォールドされたタウタンパク質に特異的な抗体（例えば、T0C1抗体、W02011/026031に記載の抗体等）を用いたウエスタンプロット法、ELISA法等が挙げられる。

[0079] 上記評価方法に用いるタウオパチー病態を伴う神経細胞は、タウオパチー患者から採取された体細胞から樹立された多能性幹細胞(iPS細胞)から分化誘導された神経細胞であってもよい。iPS細胞は、タウオパチー患者から採取された体細胞を用いて、自体公知の方法により適宜作製することができる。iPS細胞を神経細胞へ分化誘導する方法としては、種々の公知の分化誘導方法を選択して用いることができ、例えば細胞にNgn2（例として、ヒトNgn2タンパク質：NP_076924、マウスNgn2タンパク質：NP_033848）を強制的に発現させ、大脳皮質神経細胞へと分化させる方法が挙げられる。タウオパチー患者としては、特に限定されないが、前述の通りアルツハイマー病またはFTLD-tau患者であることが好ましく、さらに、MAPT遺伝子に変異を有するFTLD-Tau患者（例として、FTDP-17患者）が特に望ましい。

[0080] 以下に実施例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが、これらは單なる例示であって、本発明を何ら制限するものではない。

実施例

[0081] 実施例1：タウオパチー細胞モデルにおける効果

[材料と方法]

倫理声明

ヒトiPS細胞の使用は、京都大学医学部・医学研究科倫理委員会により承認を受けた。全ての方法は、承認されたガイドラインに従って実施した。正式なインフォームドコンセントが全ての被験者から得られた。

[0082] Ngn2の発現誘導によるiPS細胞由来の大脳皮質神経細胞の作製

非特許文献1に記載の方法により樹立した2種類のiPS細胞株(FTLD-Tau1及びFTLD-Tau2)を用いて以下の実験を行った。FTLD-Tau1は、MAPTにイントロン変異(イントロン10 + 14C→T)を有するFTLD-Tau患者の細胞から樹立したiPS細胞株に、テトラサイクリン誘導性プロモーターに制御されるNgn2遺伝

子が導入されたstable iPS cell lineである。FTLD-Tau2は、MAPTにエクソン変異（R406W）を有するFTLD-Tau患者の細胞から樹立したiPS細胞株に、前記Ngn2遺伝子が導入されたstable iPS cell lineである。これらのiPS細胞株をアクターゼを用いて単一細胞に解離し、1:1の比のDMEM/F12 (Life Technologies) 及びNeurobasal (Life Technologies) 、1% N2サプリメント、2% B27サプリメント、10 ng/ml 脳由来神経栄養因子 (BDNF、R&D Systems) 、10 ng/ml グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF、R&D Systems) 及び10 ng/ml ニューロトロphin-3 (NT-3; R&D Systems) を含む神経培地を用いて、1 μg / mlのドキシサイクリン (Clontech) と共に、マトリゲルでコーティングしたプラスチックプレート又はカバースリップ上に播種した。この方法では通常、ドキシサイクリンを含む培地で培養を開始してから7日後には、90%以上の細胞が大脳皮質神経細胞に分化する。また、この方法で得られる大脳皮質神経細胞の多くはグルタミン酸作動性と考えられている（特許文献1）。本願実施例では、FTLD-Tau1またはFTLD-Tau2から前記方法によって分化誘導された大脳皮質神経細胞を、タウオパチー神経細胞と呼ぶ場合がある。

なお、本願実施例では、ドキシサイクリンを含む培地で培養を開始した日（=分化誘導を開始した日）をDay0 とし、当該開始日からの日数を“Day”+ “数字”で表す場合がある。

[0083] 免疫細胞化学

細胞を室温で30分間、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を含むPBS中に室温で10分間浸透した。続いてBlock Ace (Yukijirushi) で30分間ブロッキングした。一次抗体と4°Cで一晩インキュベートした後、細胞をPBSで3回洗浄し、適切な二次抗体とともに室温で1時間インキュベートした。細胞画像をDelta Vision (Applied Precision)又はIN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare)から取得した。細胞数をIN Cell Analyzer 6000及びIN CELL Developer toolbox software 1.9 (GE Healthcare)で定量化した。このアッセイでは、以下の一次抗体を用いた：β III チューブリン(1:2,000, Covance)、NeuN (1:500, Millipore)。染色の結果を図1に示す。

図1に示されるように、神経細胞の細胞体および神経突起は β IIIチューブリン陽性（イメージ上では緑色）となり、前記細胞体内の核はNeuN陽性（イメージ上では、細胞体色（緑）と重なるため黄色～オレンジ色）となる。よって、本願実施例では、生存 β IIIチューブリン陽性の細胞体数、または、 β IIIチューブリン・NeuN二重陽性のドット数を、生存神経細胞数（チューブリン陽性の神経細胞体数）として計測した。

[0084] ウエスタンプロット分析

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) を含むRIPA緩衝液に溶解した。超音波処理後、試料を13,000 × gで15分間4°Cで遠心分離し、上清を回収した。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 (Pierce) を用いて測定し、非還元条件でSDS-PAGE（レーン当たり20 μg）を行い、ミスフォールドされたタウタンパク質を特異的に認識するT0C1抗体を用いてウエスタンプロットを行った。ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いてシグナル強度を解析した。本稿で使用したタウ抗体を表3に示す。

[0085] [表1]

Tau12	ヒトタウ	Ms (IgG)	Millipore
T0C1	オリゴマータウ	Ms (IgM)	Kanaan/Binder Lab

[0086] ドットプロット分析

<培地上清の調製>

細胞培養系から培地を回収し、低速遠心（1,000rpm、3分間）を行って細胞残屑を沈殿させ、得られた上清を培養上清として回収した。各培養上清500 μl分を限外ろ過フィルター付きチューブ（Vivaspin、分画分子量：10kD、GE Healthcare社）に移し、50 μlになるまで濃縮を行った。各濃縮サンプル2 μlをニトロセルロース膜上にプロットした。

[0087] <細胞抽出液の調製>

前記細胞培養系から細胞を回収し、protease阻害剤及びphosphatase阻害剤

含有TBS (Tris buffered saline) 中に懸濁後、超音波処理を行って細胞破碎した。当該細胞破碎液を遠心し (13,000xg、15分間) 、上清を細胞抽出液として回収した。各細胞抽出液を、 $1.2\mu\text{g protein/spot}$ となるようにニトロセルロース膜 (穴径 $0.45\mu\text{m}$ 、GE Healthcare社) 上にプロットした。

[0088] 上記方法で得られたニトロセルロース膜に対し、定法に従って各種タウ抗体処理、検出 (Western Lightning Plus-ECL、PerkinElmer社) 、及びシグナルの定量化 (ImageQuant LAS4000、GE Healthcare社) を行った。ヒトのタウ特異的抗体としてTau12を、タウオリゴマー特異的抗体としてTOC1抗体を用いた。本願実施例では、Department of Translational Science and Molecular Medicine, College of Human Medicine, Michigan State University (USA) のNicholas Kanaan博士より分与されたTOC1抗体（非特許文献1）を用いた。

[0089] 細胞生存アッセイ

Day8のFTLD-Tau1またはFTLD-Tau2の培地に被験化合物を添加し、Day21に細胞を固定して β IIIチューブリンの免疫染色を行った (Day0播種時の細胞密度は 5×10^4 細胞/ウェル)。コントロールとして、被験化合物非添加のDay8の細胞を固定し、凍結保存した後、前記Day21の細胞と同時に免疫染色を行った。 β IIIチューブリン陽性細胞数 (=生存神経細胞数) をIN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) で計測し、下記式で得られる値を細胞生存率として算出した。

[0090] なお、プレガバリンおよびミロガバリンを用いたアッセイでは、Day10のFTLD-Tau2の培地に被験化合物を添加し、Day21に細胞を固定して上記解析を行った。

[0091] タウオリゴマー形成の解析

上記細胞生存アッセイで得られたDay21の細胞に対し、前述のウエスタンプロット分析およびドットプロット分析を行い、タウオリゴマー量を解析した。

[0092]

[数1]

$$\text{細胞生存率 (\%)} = (\text{Day21 の } \beta \text{ III チューブリン陽性細胞数} / \text{Day8 の } \beta \text{ III チューブリン陽性細胞数}) \times 100$$

[0093] 統計分析

統計的有意性を決定するために、one-way ANOVA及び続いてのTukey post hoc分析又はスチューデントのt検定を用いて結果を分析した。差は、 $p < 0.05$ で有意とした。解析はSPSS software (IBM) を用いて行った。全ての棒グラフは平均±SEMを表す。

[0094] てんかん治療薬

実施例に使用した6種類のてんかん治療薬の作用効果を以下に示す。

[表2]

作用	Gabapentin	Topiramet	Carbamazepine	Levetiracetam	Valproic Acid	Clonazepam	文献
Na ₃ チャネル阻害		○	○		○		1
電位依存性Ca ₃ チャネル阻害				○			2
N型チャネル阻害		○					3
L型チャネル阻害					○		4
T型チャネル阻害							5
電位依存性Ca ₃ チャネルのα2δサブユニットに結合	○					○	6
ミトコンドリアNa/Ca交換輸送体阻害							

[0095] 上記のうち、クロナゼパム (Clonazepam) は、GABA作動性神経細胞のシナプス後膜のベンゾジアゼピン受容体のアゴニストとして最も知られるが、前記方法で得られる大脳皮質神経細胞の多くはグルタミン酸作動性であるため（特許文献1）、本書ではミトコンドリアNa/Ca交換輸送体の阻害剤としての作用を記載する。また、表中の文献は以下のものである。

文献1：ガバペン錠 医薬品インタビューフォーム 2017年4月改訂（第11版）

文献2：トピナ錠 医薬品インタビューフォーム 2017年4月改訂

文献3：カルバマゼピン錠 医薬品インタビューフォーム 2018年6月改訂（第5版）

文献4：イーケプラ錠 医薬品インタビューフォーム 2018年6月改訂（第17版）

文献5：デパケン錠 医薬品インタビューフォーム 2019年7月改訂

文献6：Elinor J. Griffiths et al., Inhibition of mitochondrial calci

um efflux by clonazepam in intact single rat cardiomyocytes and effects on NADH production. *Cell Calcium*, 21(4):321–329, 1997.

[0096] [結果]

約200種類の既存薬と、てんかんの治療薬として知られる6種類の既存薬（ガバペンチン（Gabapentine）、トピラマート（Topiramate）、カルバマゼピン（Carbamazepine）、レベチラセタム（Levetiracetam）、バルプロ酸（Valproic Acid）、及びクロナゼパム（Clonazepam））について、上記方法を用いてタウオパチー患者由来大脳皮質神経細胞（タウオパチー神経細胞）に対する細胞死抑制効果を解析した。

その結果、約200種類の既存薬の解析では、非常に顕著な細胞死抑制効果を示すものは見つからなかった（結果は非開示）。

[0097] さらに、6種類のてんかん治療薬のうち、電位依存性カルシウムチャネルのL型（トピラマート）、N型（レベチラセタム）、T型（バルプロ酸）の阻害剤として知られる既存薬では、 $50\text{ }\mu\text{M}$ まで解析しても有意な細胞死抑制効果は認められなかった（図2）。また、ミトコンドリアからのカルシウム放出を担うNa/Ca交換輸送体（mitochondrial Na/Ca exchanger）を阻害し、躁うつ病の治療にも用いられるクロナゼパムや、ナトリウムチャネルの阻害剤であるカルバマゼピンで処理した場合も、細胞死抑制効果は認められなかった（図2）。

これに対し、意外にも、ガバペンチン（Gabapentine）において、非常に顕著な細胞死抑制効果が認められた。図2に示されるように、ガバペンチンは、 $12\text{--}50\text{ }\mu\text{M}$ という幅広いレンジにおいて、タウオパチー神経細胞の自発的な細胞死を有意に抑制した。

[0098] ガバペンチンは、電位依存性カルシウムチャネルの補助的サブユニットの一つである $\alpha_2\delta$ サブユニットに高親和性で結合するリガンドである。 $\alpha_2\delta$ サブユニットはイオンチャネルの構成成分ではなく、チャネルを構成する α_1 サブユニットの形質膜への輸送等を担っており、ガバペンチンの結合によって当該輸送は阻害されるが、電位依存性カルシウムチャネル電流は直接的に

はほとんど阻害されないことが報告されている (Hendrich J et al., Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha₂delta ligand gabapentin. Proc Natl Acad Sci U S A. 105:3628-33, 2008.)。

よって、上記結果より、タウオパチー神経細胞の細胞死は、意外にも、電位依存性カルシウムチャネルを直接阻害し得る既存薬ではなく、当該チャネルの補助的サブユニットである $\alpha_2\delta$ のリガンドによって効果的に抑制されることが明らかになった。

[0099] 次に、上記ガバペンチンによる細胞死抑制にタウオリゴマーの形成抑制が伴っているかどうかを検討した。検証は、上記のウエスタンプロット分析及びドットプロット分析により行った。結果を図3に示す。ウエスタンプロット分析及びドットプロット分析のいずれにおいても、ガバペンチン存在下で培養した細胞では、(10 μ Mのガバペンチン処理で既に) ガバペンチン非処理の細胞と比べて、タウオリゴマー量が大幅に減少していた。さらに、ドットプロット分析より、ガバペンチン処理した細胞では、培養上清中のタウオリゴマー量と細胞内のタウオリゴマー量のいずれもが有意に減少することが示された。

従って、ガバペンチンは、タウオパチー神経細胞内で生じるタウタンパク質のミスフォーディングおよびタウオリゴマー形成を有意に阻害することが示された。

[0100] 続いて、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬として知られる他の化合物についても、上記解析を行った。ガバペンチンエナカルビルはガバペンチンのプロドラッグであるため、プレガバリンとミロガバリンについて解析した。細胞生存アッセイの結果を図4に、ウエスタンプロット分析及びドットプロット分析の結果を図5にそれぞれ示す。

[0101] プレガバリン及びミロガバリンは、6-50 μ Mという幅広いレンジにおいて、タウオパチー神経細胞の自発的な細胞死を非常に顕著に抑制した(図4)。そして、これらの薬剤で処理した細胞では、培養上清中のタウオリゴマー量と細胞内のタウオリゴマー量のいずれもが非常に顕著に減少していた(図5)

)。特に、細胞内タウオリゴマー量に対する効果は劇的で、プレガバリンまたはミロガバリンで処理することで、細胞内に蓄積するタウオリゴマー量を約84～90%も減少させられることが明らかになった。

[0102] 従って、ガバペンチンのみならずプレガバリン及びミロガバリンも、タウオパチー神経細胞内で生じるタウタンパク質のミスフォーディングとタウオリゴマー形成を有意に阻害し、細胞死を効果的に抑制できることが示された。

[0103] 以上より、電位依存性カルシウムチャネルの補助的サブユニットである $\alpha_2\delta$ サブユニットに結合する剤は、タウタンパク質のオリゴマー化を阻害して大脳皮質神経細胞の細胞死を効果的に抑制し、タウオパチーの予防または治療剤になり得ることが示された。

[0104] 実施例2：タウオパチー動物モデルにおける効果

続いて、 $\alpha_2\delta$ 阻害薬の生体内における効果を解析した。具体的には、タウオパチーマウスマodelにガバペンチンを経口投与し、脳内タウ凝集に対する抑制効果を解析した。

[0105] [材料と方法]

マウスマodel

タウオパチーマウスマodelとして、大脳皮質・海馬領域にヒトP301L変異型タウを過剰発現するrTg4510マウス(Santacruz, K., et al., Science, 309:476-481, 2005)を用いた。本マウスでは、大脳皮質・海馬領域にて2～3ヶ月齢よりタウ病変（タウの構造異常・凝集化）が認められるようになり、5～6ヶ月齢で神経脱落を伴った進行性の脳萎縮を呈することが知られている。

[0106] 薬剤投与

約4ヶ月齢のrTg4510マウスに対し、40 mg/kgガバペンチンを週4回、6週間にわたって経口投与した(投与濃度についてはReda, H.M., et al., Eur J Pharmacol, 771:162-172, 2016を参照)。ガバペンチンは、100 mgを2.5 ml超純水に溶解したもの投与直前に飲用水にて10倍に希釀し、体重(g) × 10 μ l量を経口摂取させた(ガバベンチン投与群；3匹)。非投与のコントロ

ールとしては、同日齢のrTg4510マウスに同量の飲料水を同スケジュールで経口投与したもの用いた（コントロール；1匹）。

なお、当該タウオパチーマウスマルではタウ病変が2-3か月という短い期間で急速に進行するため、解析結果の正確性を期すために、厳密に日齢の揃ったマウスを使用した。また、性別もオスに統一した。

[0107] 陽電子放出断層撮像(PET)によるタウ病態評価

経口投与終了後のマウス（約5.5ヶ月齢）に対し、麻酔下において尾静脈より放射性リガンド[¹⁸F]PM-PBB3を注入し、Focus 220 PET scanner (Siemens)を用いて撮像を行った(Tagai et al., 2020, MedRxiv)。PM-PBB3は、タウオリゴマーがさらに伸長したタウ線維から、タウ線維がさらに凝集化した神経原線維変化まで、タウオパチーに伴って生じるさまざまなタウ凝集体に選択的に結合することが知られている。よって、[¹⁸F]PM-PBB3を生体内に注入し、PETを用いて当該radioactivityを検出することにより、タウ構造凝集体の生成と蓄積を感度良く検出することができる。

[0108] 核磁気共鳴イメージング(MRI)による脳体積測定

7T horizontal MRI scanner (Bruker)を用いてT2-weighted MRI を実施し、撮像画像よりROIs(region of interests)を決定して、大脳皮質、海馬、小脳の体積を算出した。

[0109] [結果]

ガバベンチンを投与したマウス（3匹）のうち、1匹は投与開始時点の体重が他の2匹の平均体重と比べて約9%もなく、その後も体重の回復がみられなかったため、本解析から除外した。これにより、本解析に使用した全マウスの体重幅（投与開始時）は-2.1%～+2.9%と非常に狭く、薬効評価により適した解析系となった。

[0110] ガバベンチン投与マウスと非投与コントロールマウスについて、放射性リガンド静注直後から60分後までの海馬、大脳皮質、小脳における[¹⁸F]radioactivityを経時的に測定した結果（時間-放射能曲線）を図7Aに示す。いずれのマウスのいずれの部位においても、静注後すぐにradioactivityが検出さ

れ、その後速やかに減衰し、当該タイムコースが投与 - 非投与マウス間でほぼ同じであることがわかる。なお、結果は割愛したが、本解析の投与 - 非投与マウス間では、海馬、大脳皮質、小脳の各体積に有意差がないことを確認している。

[0111] 放射性リガンド静注後40～60分後における、大脳皮質と海馬を含む脳断面のStandardized uptake value ratio (SUVR) 画像を図7Bに示す。上段はSUVRのみ、下段はSUVR画像と核磁気共鳴イメージング (MRI) 画像を重ね合わせた画像で、SUVR画像はそれぞれ小脳を対象領域として計算したイメージである。ガバペンチン投与マウスでは、非投与マウスに比べて、海馬および大脳皮質における^{[18]F]radioactivityが低い（画像上で黒っぽい）ことがわかる。}

図7Bで得られた40～60分後の値の平均値のグラフを図7Cに示す。非投与マウスに比べてガバペンチン投与マウスでは、海馬、大脳皮質のいずれにおいても^{[18]F]radioactivityが低いことがわかる。}

[0112] これらの結果より、ガバペンチン投与マウスでは、非投与マウスと比べて、大脳皮質と海馬におけるタウ凝集体の集積が少ないことが示された。よって、ガバペンチンの経口摂取により、タウオパチーマウスモデルの脳内で生じるタウ病変を効果的に抑制できることが明らかになった。

[0113] 以上より、電位依存性カルシウムチャネルの補助的サブユニットである $\alpha_2\delta$ サブユニットに結合する剤は、生体脳で生じるタウ病変を効果的に抑制することができ、タウオパチーの予防または治療薬として使用できることが明らかになった。

産業上の利用可能性

[0114] 電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ の阻害薬は、タウオパチーの予防及び／又は治療に有用であり、 $\alpha_2\delta$ への結合性を指標とするスクリーニング方法は、タウオパチーの予防及び／又は治療剤のスクリーニングに有用である。

[0115] 本出願は、日本国で出願された特願2019-194758（出願日：2

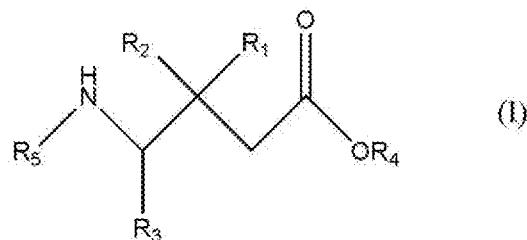
019年10月25日)を基礎としており、ここで言及することにより、それらの内容は本明細書に全て包含される。

請求の範囲

[請求項1] 電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ の阻害薬を含有してなる、タウオパチーの予防又は治療剤。

[請求項2] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、式(1)：

[化1]



[式(I)中、

R₁は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

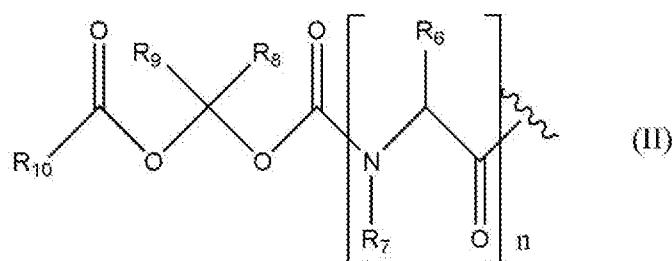
R₂は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、R₁とR₂とが結合して、5員の炭素環と縮合していくてもよい炭素数4～6のシクロアルカンを形成し、該5員の炭素環は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

R₃は、水素原子、メチル基又はカルボキシリル基であり；

R₄は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R₅は、水素原子又は式(II)：

[化2]



[式(II)中、

nは0又は1であり；

R₆は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、R₆とR₇はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R₇は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R₈及びR₉は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、R₈とR₉はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R₁₀はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロ

ヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルである】

で示される基である】

で示される化合物又はその塩である、請求項 1 に記載の剤。

[請求項3]

前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、ガバベンチン、プレガバリン、ミロガバリン及びガバベンチンエナカルビル並びにそれらの類縁体から選ばれる 1 以上の化合物又はその塩である、請求項 2 に記載の剤。

[請求項4]

前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、ガバベンチン及びプレガバリンから選ばれる 1 以上の化合物又はその塩である、請求項 3 に記載の剤。

[請求項5]

タウタンパク質のミスフォールディングの阻害剤である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の剤。

[請求項6]

前記タウオパチーがアルツハイマー病またはタウオパチーを呈する前頭側頭葉変性症 (FTLD-Tau) である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の剤。

[請求項7]

タウオパチーがMAPT遺伝子変異に起因するものである、請求項 6 に記載の剤。

[請求項8]

以下の工程を含む、タウオパチーの予防又は治療剤のスクリーニング方法。

(1) 電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha_2\delta$ と、被験物質とを接觸させる工程、及び

(2) 工程 (1) において $\alpha_2\delta$ と結合した被験物質を、タウオパチーの予防又は治療剤の候補として選択する工程

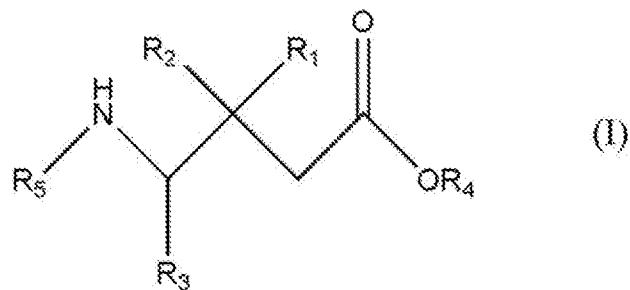
[請求項9]

哺乳動物に対して、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬の有効量を投与することを含む、該哺乳動物におけるタウオパチーの予防又は治疗方法。

[請求項10]

前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、式 (1) :

[化3]



[式 (I) 中、

R₁は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

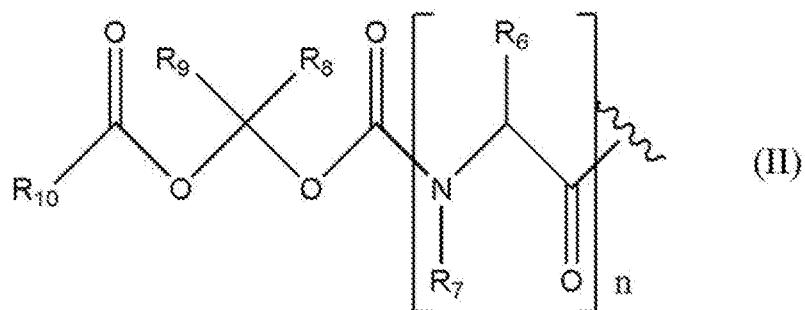
R₂は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、R₁とR₂とが結合して、5員の炭素環と縮合していてもよい炭素数4～6のシクロアルカンを形成し、該5員の炭素環は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

R₃は、水素原子、メチル基又はカルボキシリル基であり；

R₄は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R₅は、水素原子又は式 (II) :

[化4]



[式 (II) 中、

nは0又は1であり；

R₆は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシ

カルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、R₆とR₇はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R₇は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R₈及びR₉は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、R₈とR₉はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R₁₀はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロ

アリールアルキルである】

で示される基である】

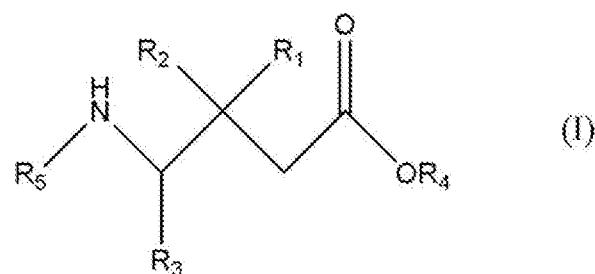
で示される化合物又はその塩である、請求項9に記載の方法。

[請求項11] 前記 $\alpha_2\delta$ の阻害薬が、ガバベンチン、プレガバリン、ミロガバリン及びガバベンチエンカルビル並びにそれらの類縁体から選ばれる1以上の化合物又はその塩である、請求項9又は10に記載の方法。

[請求項12] タウオパチーの治療又は予防に使用するための、 $\alpha_2\delta$ の阻害薬。

[請求項13] 式(1)：

[化5]



[式(I)中、

R₁は、炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

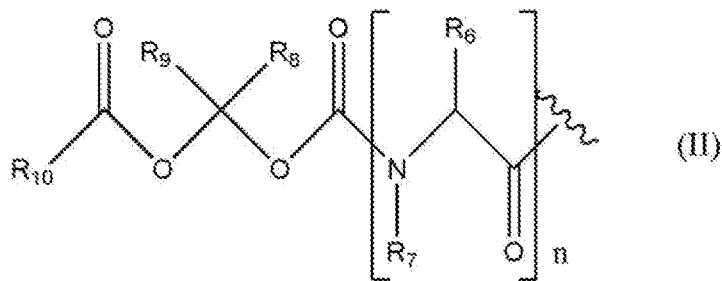
R₂は水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であるか、R₁とR₂とが結合して、5員の炭素環と縮合していくてもよい炭素数4～6のシクロアルカンを形成し、該5員の炭素環は、炭素数1～6のアルキル基、炭素数2～6のアルケニル基又は炭素数3～7のシクロアルキル基で置換されていてもよく；

R₃は、水素原子、メチル基又はカルボキシリル基であり；

R₄は、水素原子又は炭素数1～6の直鎖若しくは分岐状のアルキル基であり；

R₅は、水素原子又は式(II)：

[化6]



〔式 (II) 中、

 n は 0 又は 1 であり；

R_6 は、水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシ、置換アルコキシ、アシル、置換アシル、アルコキシカルボニル、置換アルコキカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、 R_6 と R_7 はそれらが結合している原子と共にシクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R_7 は、水素、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり；

R_8 及び R_9 は、独立して水素、アルキル、置換アルキル、アルコキシカルボニル、置換アルコキシカルボニル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、カルバモイル、置換カルバモイル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロアルキル

ル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルであり、又は、任意により、R₈とR₉はそれらが結合している原子と共にシクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル又は置換シクロヘテロアルキル環を形成し；

R₁₀はアシル、置換アシル、アルキル、置換アルキル、アリール、置換アリール、アリールアルキル、置換アリールアルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、シクロヘテロアルキル、置換シクロヘテロアルキル、ヘテロアルキル、置換ヘテロアルキル、ヘテロアリール、置換ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル又は置換ヘテロアリールアルキルである]

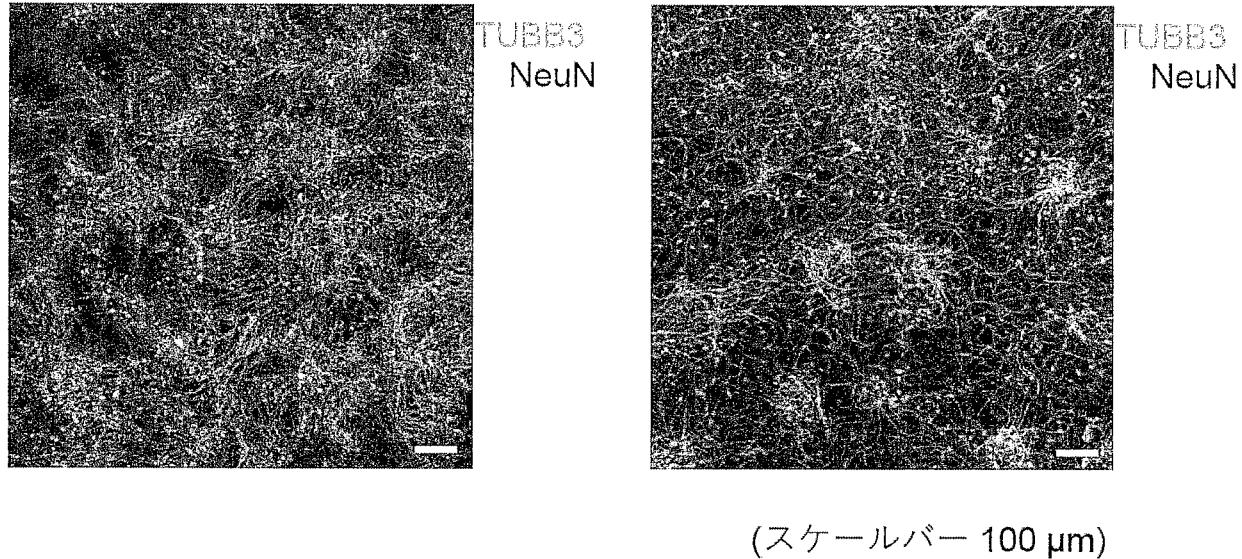
で示される基である]

で示される化合物又はその塩である、請求項12に記載のα₂δの阻害薬。

[請求項14] ガバペンチン、プレガバリン、ミロガバリン及びガバベンチンエナカルビル並びにそれらの類縁体から選ばれる1以上の化合物又はその塩である、請求項12又は13に記載のα₂δの阻害薬。

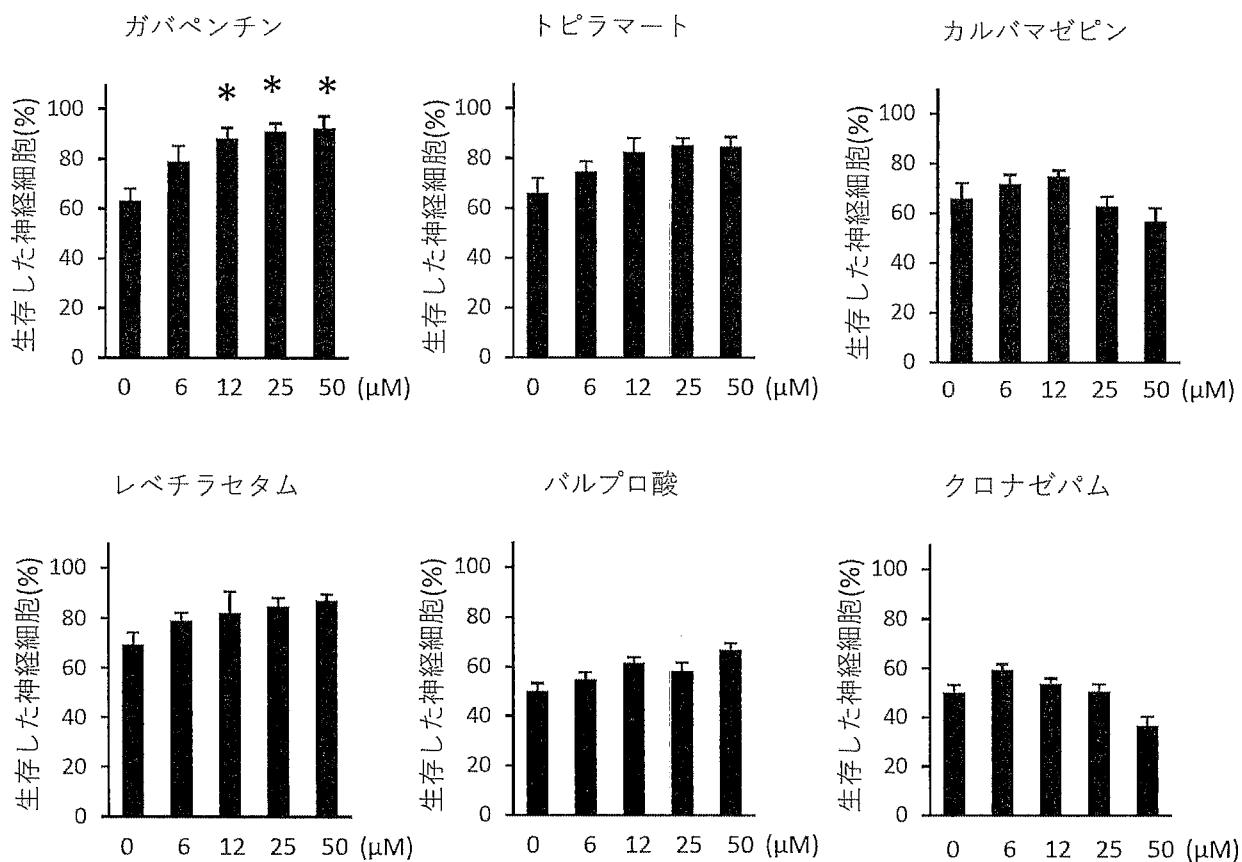
[図 1]

MAPT イントロン変異(10+14C→T) *MAPT* エクソン変異(R406W)



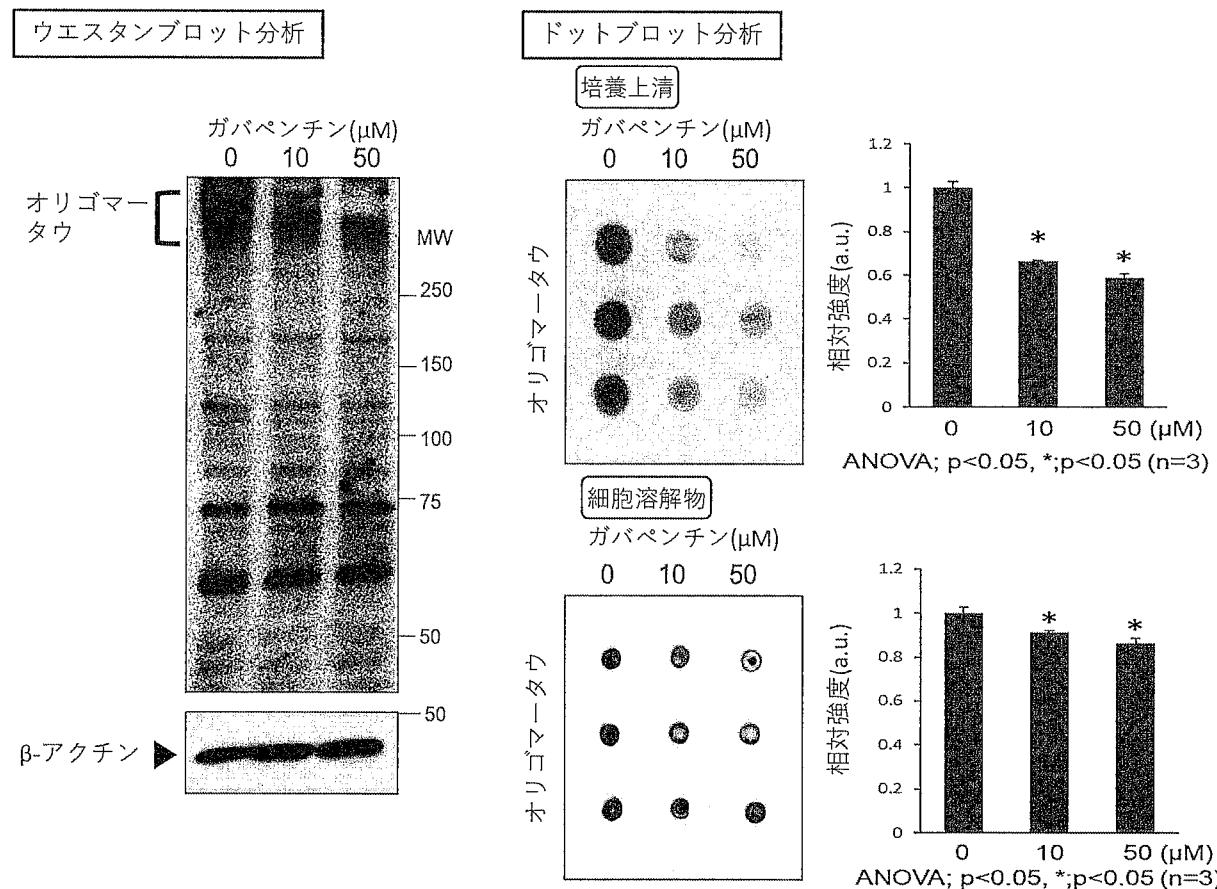
(スケールバー 100 μm)

[図 2]

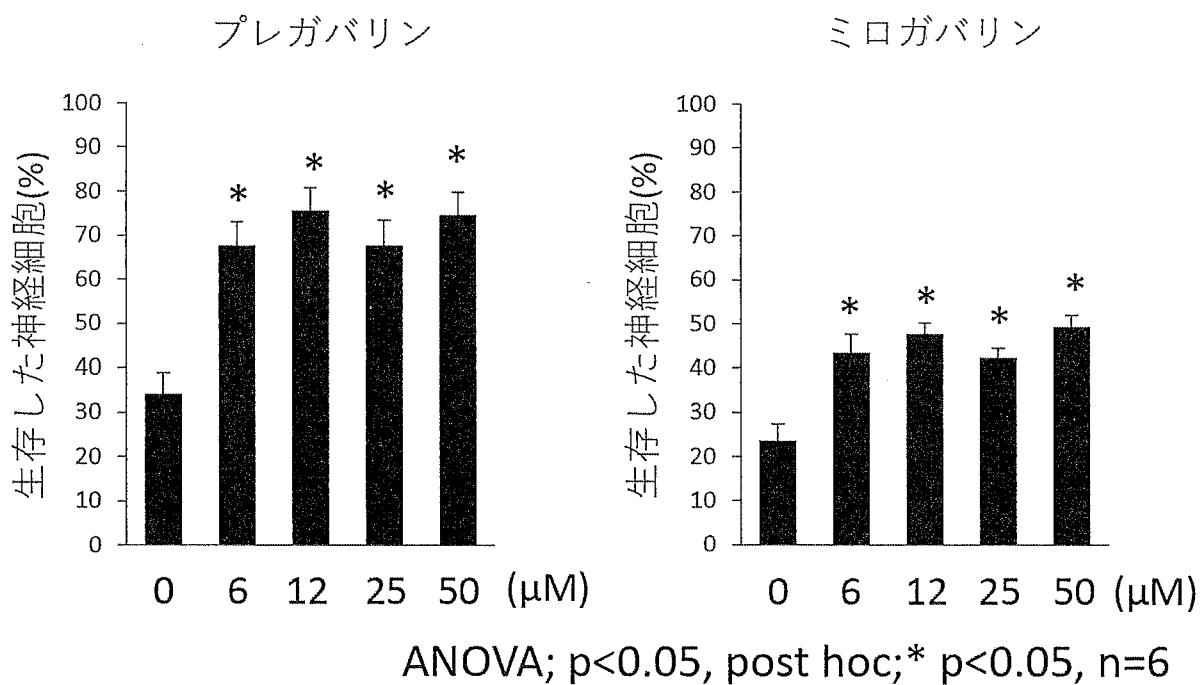


ANOVA; p<0.003, post hoc; * p<0.05

[図 3]

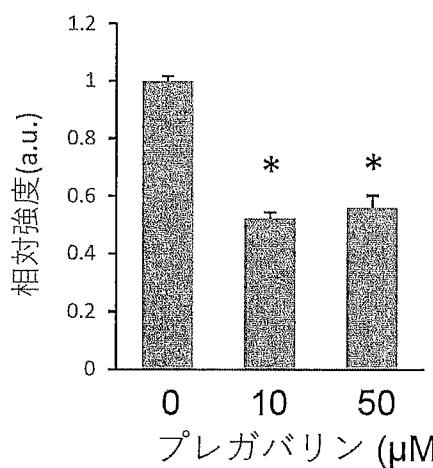
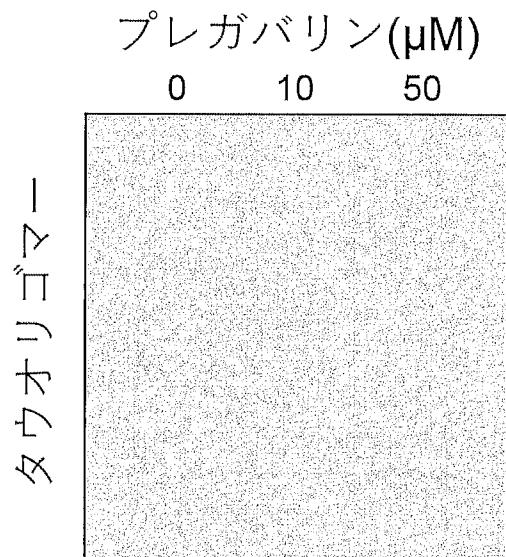


[図 4]



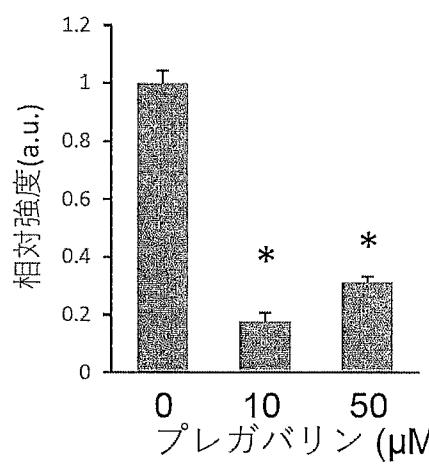
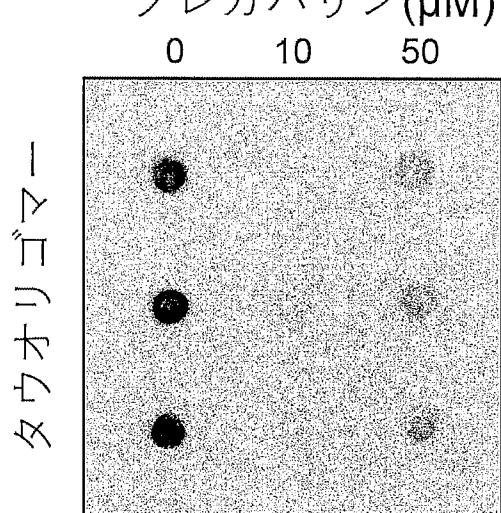
[図 5]

培養上清



n=3, ANOVA p<0.05, *p<0.05

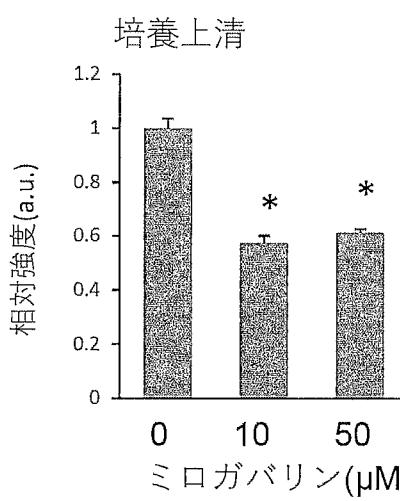
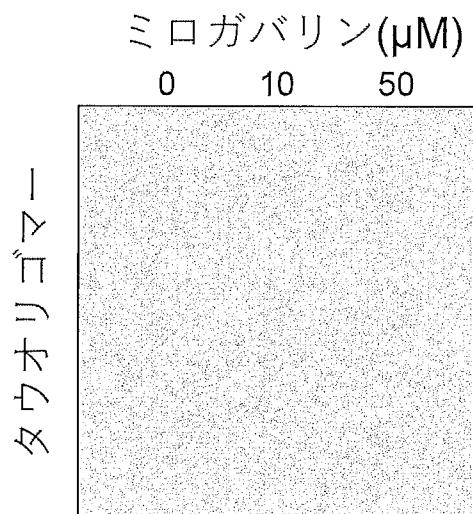
細胞溶解物



n=3, ANOVA p<0.05, *p<0.05

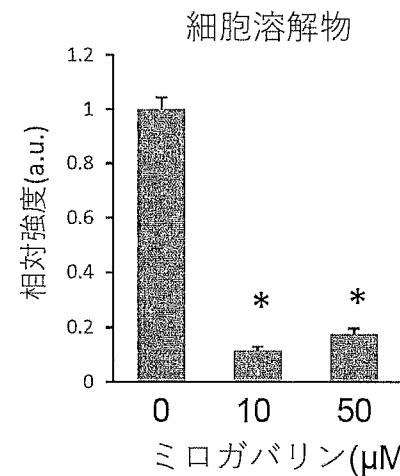
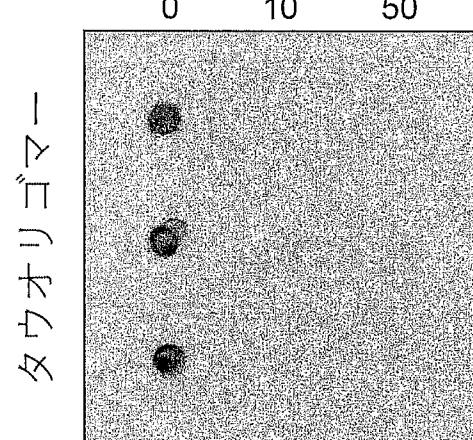
[図 6]

培養上清



n=3, ANOVA p<0.05, *p<0.05

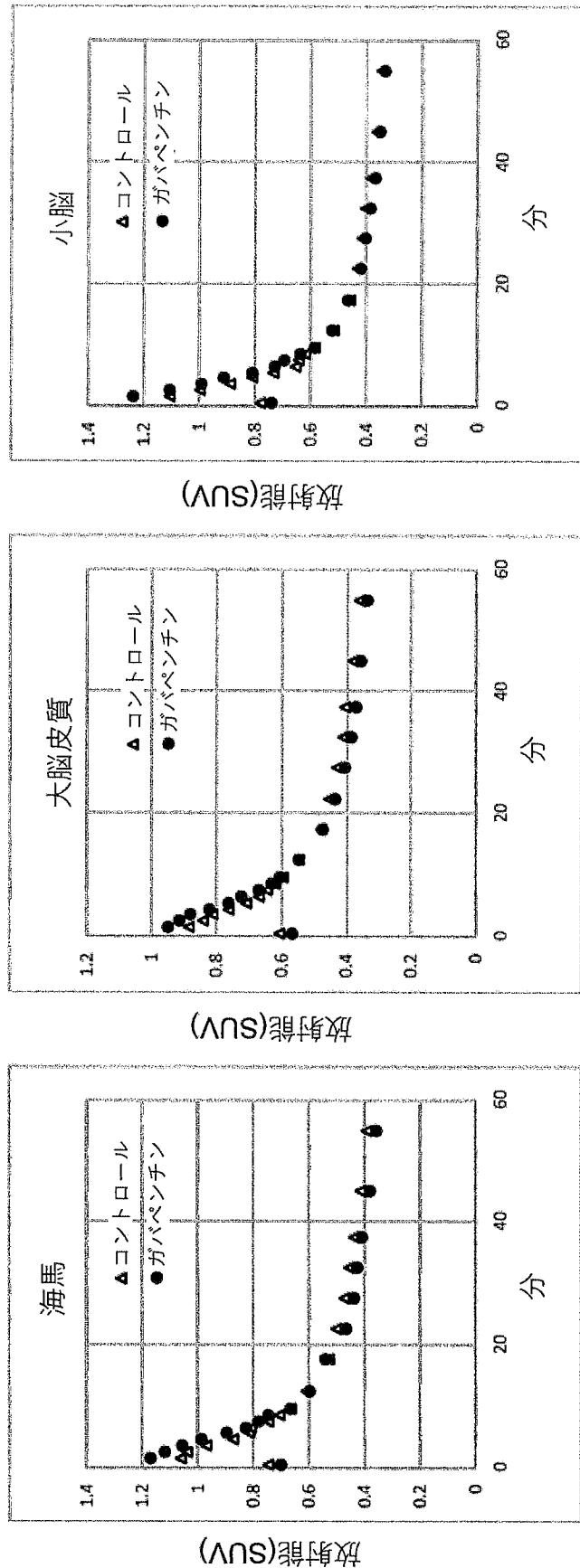
細胞溶解物



n=3, ANOVA p<0.05, *p<0.05

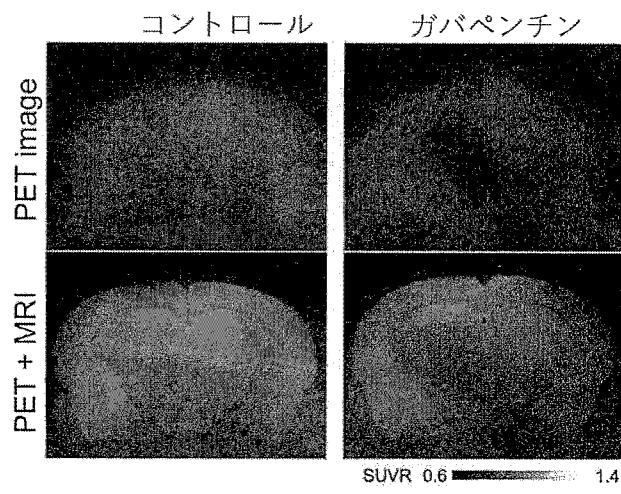
[図 7]

A. 時間-放射能曲線(SUV, コントロール; n=1, ガバベンチン; n=1)

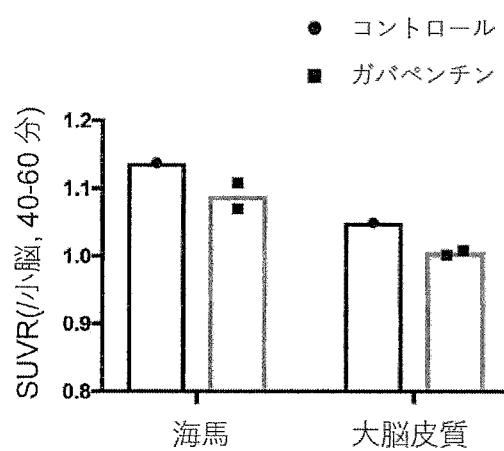


[図 7]の続き

B. SUVR (/小脳) 画像



C. SUVR (/小脳)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/039450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A6IK 45/00 (2006.01)i; A6IP 25/28(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; A61K 31/I97(2006.01)i

FI: A6IK45/00; A61K31/197; A61P25/28; G01N33/50 Z; G01N33/15 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K45/00; A61P25/28; G01N33/15; G01N33/50; A61K31/197

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	1971–2020
Registered utility model specifications of Japan	1996–2020
Published registered utility model applications of Japan	1994–2020

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDream111); CAPplus/REGISTRY/ME
LINE/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	SUPASITTHUMRONG, T. et al., "Gabapentin and pregabalin to treat aggressivity in dementia: a systematic review and illustrative case report", British Journal of Clinical Pharmacology, 2018, vol. 85, no. 4, pp. 690–703 abstract, table 2, page 691, right column, paragraph [0005]	1–7, 9–14
A	JP 2008-13555 A (PFIZER PRODUCTS INC.) 24 January 2008 (2008-01-24) claims, examples, paragraph [0018]	1–7, 9–14
A	WO 2010/060100 A2 (MAZORX, INC.) 27 May 2010 (2010-05-27) claims, examples, paragraph [0035]	1–7, 9–14
A	JP 2010-536852 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS) 02 December 2010 (2010-12-02) claims, example 5, paragraph [0030]	1–7, 9–14



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
23 December 2020 (23.12.2020)

Date of mailing of the international search report
12 January 2021 (12.01.2021)

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 / JP 2020 / 039450

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet

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

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1–7, 9–14

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/039450

<Continuation of Box No. III>

(Invention 1) Claims 1-7, and 9-14

Since document A discloses an "agent for preventing or treating Alzheimer's diseases, the agent containing gabapentin," and the "gabapentin" disclosed in document A corresponds to an "inhibitor of $\alpha 2\delta$ in a voltage-dependent calcium channel" in claim 1 or a compound of formula (1) in claim 2, and the Alzheimer's diseases correspond to "tauopathy" in light of the description of paragraph [0002] of the present specification, claims 1-7 lack novelty in light of document A, and thus do not have a special technical feature.

However, claims 9-14 also have the same technical feature as claim 1. Therefore, claims 1-7 and 9-14 are classified as invention 1.

(Invention 2) Claim 8

Claim 8 cannot be considered to have a technical feature that is identical or corresponding to that of claim 8 classified as invention 1.

In addition, claim 8 is not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

Therefore, claim 8 cannot be classified as invention 1.

In addition, claim 8 has the special technical feature of a "method for screening an agent for preventing or treating tauopathy, the method comprising the steps of: (1) (omitted); and (2) (omitted)," and thus is classified as invention 2.

Document A: JP 4-210915 A (WARNER LAMBERT CO.) 03 August 1992 (1992-08-03) claims, paragraphs [0002], [0020] & US 5084479 A claims, column 1, lines 17-19, column 3, lines 35-49 & EP 446570 A2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/039450

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2008-13555 A	24 Jan. 2008	WO 2008/004067 A2 claims, examples, page 4, bottom paragraph to page 5, paragraph [0001] TW 200819123 A	
WO 2010/060100 A2	27 May 2010	US 2011/0287014 A1	
JP 2010-536852 A	02 Dec. 2010	WO 2009/029173 A1 claims, example 5, paragraph [0070] US 2009/0053232 A1 US 2011/0104181 A1 EP 2192916 A1 CN 102316888 A	

国際調査報告

国際出願番号

PCT/JP2020/039450

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; G01N 33/15(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i;
 A61K 31/197(2006.01)i
 FI: A61K45/00; A61K31/197; A61P25/28; G01N33/50 Z; G01N33/15 Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

A61K45/00; A61P25/28; G01N33/15; G01N33/50; A61K31/197

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 - 2020年
日本国実用新案登録公報	1996 - 2020年
日本国登録実用新案公報	1994 - 2020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); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	SUPASITTHUMRONG T. et al., Gabapentin and pregabalin to treat aggressivity in dementia: a systematic review and illustrative case report, British Journal of Clinical Pharmacology, 2018, Vol. 85, No. 4, pp. 690-703 要約、表2、第691頁の右欄第5段落	1-7, 9-14
A	JP 2008-13555 A (ファイザー・プロダクツ・インク) 24.01.2008 (2008-01-24) 特許請求の範囲、実施例、[0018]	1-7, 9-14
A	WO 2010/060100 A2 (MAZORX, INC.) 27.05.2010 (2010-05-27) 特許請求の範囲、実施例、[0035]	1-7, 9-14
A	JP 2010-536852 A (ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ リランド スタン フォード ジュニア ユニヴァーシティ) 02.12.2010 (2010-12-02) 特許請求の範囲、実施例5、[0030]	1-7, 9-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

“0” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

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

“X” 特に関連のある文献であつて、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つて、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 23.12.2020	国際調査報告の発送日 12.01.2021
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 原口 美和 4U 3844 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

第III欄

発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

（発明1）請求項 1-7、9-14

文献Aには「ガバベンチンを含有するアルツハイマー病の予防又は治療剤」が記載されており、文献Aに記載された「ガバベンチン」は、請求項1の「電位依存性カルシウムチャネルの $\alpha 2 \delta$ の阻害剤」又は請求項2の式(1)の化合物に相当し、アルツハイマー病は、本願明細書の[0002]の記載からみて請求項1の「タウオパチー」に相当するから、請求項1-7は、文献Aにより新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。

しかしながら、請求項9-14も、請求項1と同一の技術的特徴を有している。したがって、請求項1-7、9-14を発明1に区分する。

（発明2）請求項 8

請求項8は、発明1に区分された請求項8と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえない。

さらに、請求項8は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係はない。

したがって、請求項8は発明1に区分できない。

そして、請求項8は、「以下の工程を含む、タウオパチーの予防又は治療剤のスクリーニング方法。

(1) (略) 工程、及び、(2) (略) 工程」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

引用文献A：JP 4-210915 A (ワーナー-ランパート・コンパニー) 03.08.1992(1992-08-03)

特許請求の範囲、[0002]、[0020]

& US 5084479 A Claims, 第1欄第17-19行、第3欄第35-49行

& EP 446570 A2

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかつた。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。
請求項1-7、9-14

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/039450

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2008-13555 A	24.01.2008	WO 2008/004067 A2 特許請求の範囲、実施例、 第4頁最終段落－第5頁第 1段落	
W0 2010/060100 A2	27.05.2010	US 2011/0287014 A1	
JP 2010-536852 A	02.12.2010	WO 2009/029173 A1 特許請求の範囲、実施例 5、[0070] US 2009/0053232 A1 US 2011/0104181 A1 EP 2192916 A1 CN 102316888 A	