

明 細 書

発明の名称：

アルツハイマー型認知症を中心とする認知症の改善・治療薬

技術分野

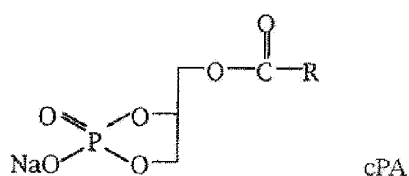
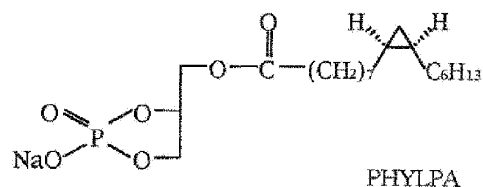
[0001] 本発明は、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸、またはカルバリゾホスファチジン酸を有効成分とするアルツハイマー型認知症を中心とする認知症の改善・治療薬に関する。

背景技術

[0002] 本特許の発明者・室伏きみ子らは、1992年に、真性（真正）粘菌 *Physarum polycephalum* の単相体ミクソアメーバから、真核細胞のDNA複製酵素であるDNAポリメラーゼ α の活性を抑え、動物培養細胞の増殖を抑制する脂溶性物質を見出し、単離・精製した（非特許文献1）。この物質はグリセロール骨格のsn-1位にシクロプロパンを含むヘキサデカン酸が結合し、2位と3位にリン酸が環状エステル結合した物質であることがわかり、*Physarum*由来のLPA様物質であることから、PHYLPAと命名した。PHYLPAがsn-1位に特徴的な脂肪酸を有することから、一般的な脂肪酸に置換した誘導体を化学合成し、その活性を検討した結果、細胞増殖を抑制することが示され、PHYLPAの増殖抑制作用が2位と3位の環状リン酸基によることが明らかになった。現在では、このような環状リン酸基を持つLPA類似体を総称して、環状ホスファチジン酸（cPA、cyclic phosphatidic acid）と呼んでいる。

[0003]

[化1]



[0004] 環状ホスファチジン酸及びその誘導体については、神経栄養因子作用と神経変性疾患への適用（特許文献1及び2）、癌細胞の増殖と浸潤・転移の抑制（特許文献3）、鎮痛作用（特許文献4）、並びにアトピー性皮膚炎への適用（特許文献5）、脱髄疾患への適用（特許文献6及び非特許文献2）、損傷治療（特許文献7）についての報告があるが、アルツハイマー型認知症を中心とする認知症の改善・治療に及ぼす影響についての知見はない。なお、特許文献8に示すように、新たな環状ホスファチジン酸類縁体2cLPAを同定し、それが環状ホスファチジン酸類似の活性を持つことも報告したが、アルツハイマー型認知症を中心とする認知症の改善・治療への効果についての知見はない。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2002-308778号公報
 特許文献2：特開2002-308779号公報
 特許文献3：国際公開WO2002/94286号公報
 特許文献4：国際公開WO2008/81580号公報
 特許文献5：特開2012-56853号公報
 特許文献6：国際公開WO2014/115885号公報

特許文献7：特開2018-080118号公報

特許文献8：特開2021-80227号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Murakami-Murofushi, K., 他, J. Biol. Chem. 267, 21512-21517 (1992)

非特許文献2：Yamamoto, S., 他, European Journal of Pharmacology 741 (2014) 17-24

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] 超高齢社会を迎え、課題先進国と言われている我が国では、平均寿命と健康寿命との差が大きく、高齢者を中心とした認知症が社会的に大きな課題となっている。アルツハイマー型認知症を中心とする認知症においては、現在までに有効な改善・治療薬が提供されていない状況がある。これらの認知症を改善・治療できる薬剤を見出すことができれば、新規な改善・治療薬を開発することが可能である。更に、本発明者らが研究を進めて来た環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸、カルバリゾホスファチジン酸は、扱いの簡単な低分子物質であり、安全性も高く、安価に製造できることから、アルツハイマー型認知症を中心とする認知症の進行を抑制し症状を改善・治療する薬剤として、大きな期待が掛かる物質である。本開発により、人々の健康寿命の延伸と生活の質の向上を図り、同時に、国の医療経済の破綻を防ぐことを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸及びその誘導体が、アルツハイマー型認知症を中心とする認知症を改善・治療する作用を有することを見だし、本発明を完成するに至った。

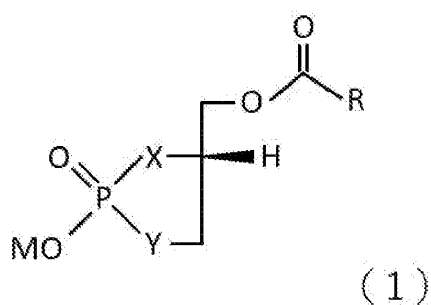
[0009] すなわち、本発明によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファ

チジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、認知症の改善・治療薬が提供される。

[0010] 好ましくは、認知症は、アルツハイマー型認知症である。

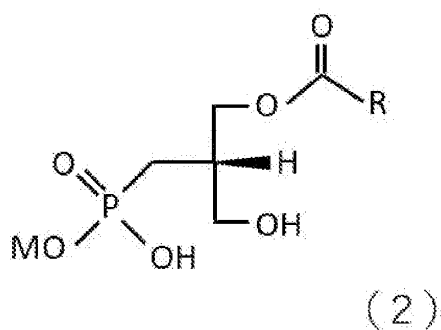
[0011] 好ましくは、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸又はチア環状ホスファチジン酸は、式（１）で示される化合物である。好ましくは、カルバリゾホスファチジン酸は、式（２）で示される化合物である。

[化2]



式（１）中、Rは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、－Ｏ－、－Ｓ－又は－ＣＨ_２－を示すが、X及びYが同時に－ＣＨ_２－になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。

[化3]



式（２）中、Rは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭

素数 2 ～ 30 の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数 2 ～ 30 の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。M は、水素原子又は対カチオンである。

[0012] 好ましくは、式 (1) において、X 及び Y の一方が $-CH_2-$ であり、X 及び Y の他方が $-O-$ である。

[0013] 本発明によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩を、認知症を有する患者に投与することを含む、認知症の改善・治療のための方法が提供される。

[0014] 本発明によればさらに、認知症治療剤の製造のための、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩の使用が提供される。

本発明によればさらに、認知症の改善・治療に使用するための、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩が提供される。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸を有効成分として含有することを特徴とする認知症治療剤を提供できる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 図 1 は、正常マウス、病態マウス、及び病態マウスに被験物質 (2ccPA、2cLPA) を 24 週間投与した後に、モリス水迷路試験を実施したそれぞれの結果を示す。

[図2] 図 2 は、モリス水迷路試験によって明確な効果を示した低用量 2ccPA および 2cLPA 投与の結果の折れ線グラフである。

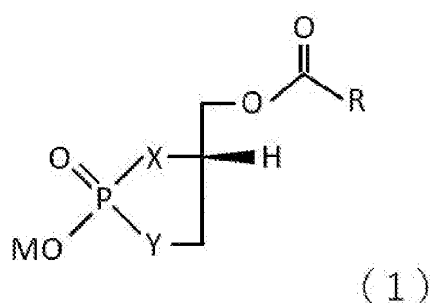
発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明について更に具体的に説明する。

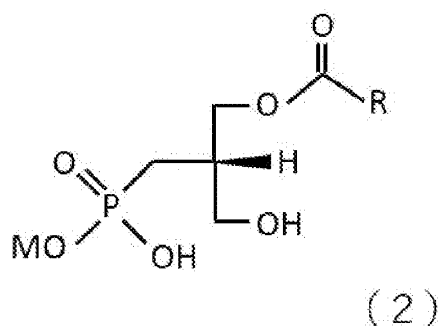
本発明は、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環

状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩を有効成分として含有する、アルツハイマー型認知症を中心とした認知症治療剤に関する。本発明の認知症治療剤は、認知症を改善・治療するために使用することができ、環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸、あるいはその塩を有効成分として含む。環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸としては本発明の効果を示すものであれば特に限定されないが、好ましくは、下記式（１）で示される環状ホスファチジン酸や下記式（２）で示されるカルバリゾホスファチジン酸を使用することができる。

[0018] [化4]



[0019] [化5]



[0020] 式（１）中、Rは、炭素数１～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数２～３０の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン

環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-S-$ 又は $-CH_2-$ を示すが、X及びYが同時に $-CH_2-$ になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。

式(2)中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。

[0021] 式(1)及び(2)において、置換基Rが示す炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基の具体例としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、エイコシル基などが挙げられる。

[0022] 置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基の具体例としては、例えば、アリル基、ブテニル基、オクテニル基、デセニル基、ドデカジエニル基、ヘキサデカトリエニル基などが挙げられ、より具体的には、8-デセニル基、8-ウンデセニル基、8-ドデセニル基、8-トリデセニル基、8-テトラデセニル基、8-ペンタデセニル基、8-ヘキサデセニル基、8-ヘプタデセニル基、8-オクタデセニル基、8-イコセニル基、8-ドコセニル基、ヘプタデカ-8，11-ジエニル基、ヘプタデカ-8，11，14-トリエニル基、ノナデカ-4，7，10，13-テトラエニル基、ノナデカ-4，7，10，13，16-ペンタエニル基、ヘニコサ-3，6，9，12，15，18-ヘキサエニル基などが挙げられる。

[0023] 置換基Rが示す炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基の具体例としては、例えば、8-デシニル基、8-ウンデシニル基、8-ドデシニル基、8-トリデシニル基、8-テトラデシニル基、8-ペンタデシニル基、8-ヘキサデシニル基、8-ヘプタデシニル基、8-オクタデシニル基、8-イコシニル基、8-ドコシニル基、ヘプタデカ-8，11-ジイニル

基などが挙げられる。

- [0024] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうるシクロアルカン環の具体例としては、例えば、シクロプロパン環、シクロブタン環、シクロペンタン環、シクロヘキサン環、シクロオクタン環などが挙げられる。シクロアルカン環は、1個以上のヘテロ原子を含んでいてもよく、そのような例としては、例えば、オキシラン環、オキセタン環、テトラヒドロフラン環、N-メチルプロリジン環などが挙げられる。
- [0025] 上記のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基に含有されうる芳香環の具体例としては、例えば、ベンゼン環、ナフタレン環、ピリジン環、フラン環、チオフェン環などが挙げられる。
- [0026] 従って、置換基Rがシクロアルカン環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、例えば、シクロプロピルメチル基、シクロヘキシルエチル基、8, 9-メタノペンタデシル基などが挙げられる。
- [0027] 置換基Rが芳香環によって置換されたアルキル基である場合の具体例としては、ベンジル基、フェネチル基、p-ペンチルフェニルオクチル基などが挙げられる。
- [0028] Rは、好ましくは、炭素数9～17の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数9～17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数9～17の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基である。Rは、さらに好ましくは、炭素数9、11、13、15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、又は炭素数9、11、13、15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。Rは、特に好ましくは、炭素数9、11、13、15又は17の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基である。
- [0029] 一般式(1)で示される化合物中のX及びYはそれぞれ独立に、-O-、-S-又は-CH₂-を示すが、X及びYが同時に-CH₂-になることはない。即ち、X及びYの組み合わせは以下の3通りである。
- (1) Xが-O-であり、Yが-O-である。
 - (2) Xが-CH₂-であり、Yが-O-である (2カルバcPA (2cccP

Aとも略記))。またはXが-S-であり、Yが-O-である。

(3) Xが-O-であり、Yが-CH₂-である(3カルバcPA (3ccPAとも略記))。またはXが-O-であり、Yが-S-である。

上記の中でも、Xが-CH₂-でありYが-O-である(2カルバcPA)が特に好ましい。

[0030] 式(1)及び(2)で示される環状ホスファチジン酸誘導体中のMは、水素原子又は対カチオンである。Mが対カチオンである場合の例としては、例えば、アルカリ金属原子、アルカリ土類金属原子、置換若しくは無置換アンモニウム基が挙げられる。アルカリ金属原子としては、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウムなどが挙げられ、アルカリ土類金属原子としては、例えば、マグネシウム、カルシウムなどが挙げられる。置換アンモニウム基としては、例えば、ブチルアンモニウム基、トリエチルアンモニウム基、テトラメチルアンモニウム基などが挙げられる。

[0031] 式(1)及び(2)の化合物はその置換基の種類に応じて、位置異性体、幾何異性体、互変異性体、又は光学異性体のような異性体が存在する場合があるが、全ての可能な異性体、並びに2種類以上の該異性体を任意の比率で含む混合物も本発明の範囲内のものである。

[0032] また、式(1)及び(2)の化合物は、水あるいは各種溶媒との付加物(水和物又は溶媒和物)の形で存在することもあるが、これらの付加物も本発明の範囲内のものである。さらに、式(1)の化合物及びその塩の任意の結晶形も本発明の範囲内のものである。

[0033] 好ましくは、式(1)で示される化合物は、1-オレオイル環状ホスファチジン酸、又は1-パルミトオレオイル環状ホスファチジン酸である。本発明で用いられる式(1)で示される化合物の具体例としては、オレオイル2カルバcPA(Δ 0le-2ccPA)、パルミトオレオイル2カルバcPA(Δ Pal-2ccPA)などを挙げることができる。また好ましくは、式(2)で示される化合物は、1-オレオイルカルバリゾホスファチジン酸、又は1-パルミトオレオイルカルバリゾホスファチジン酸である。本発明で用いられる式(2)で示

される化合物の具体例としては、オレオイル 2 カルバLPA (Δ Ole-2cLPA)、
パルミトオレオイル 2 カルバLPA (Δ Pal-2cLPA)などを挙げるができる
。

[0034] 式(1)で示される化合物のうちX及びYがーOーである化合物は、例えば、Kobayashi, S., 他: Tetrahedron Lett., 34, 4047-4050 (1993)、特開平 5-230088号公報、特開平 7-149772号公報、特開平 7-258278号公報、特開平 9-25235号公報に記載の方法等に準じて合成することができる。また、式(2)で示される化合物は、特開 2021-80227号公報に記載の方法に準じて合成することが出来る。

[0035] また、式(1)で示される化合物のうちX及びYがーOーである化合物は、特開 2001-178489号公報に記載の方法に準じてリゾ型リン脂質にホスホリパーゼDを作用させることによって合成することもできる。ここで用いるリゾ型リン脂質は、ホスホリパーゼDを作用しうるリゾ型リン脂質であれば特に限定されない。リゾ型リン脂質は多くの種類が知られており、脂肪酸種が異なるもの、エーテル又はビニルエーテル結合をもった分子種などが知られており、これらは市販品として入手可能である。ホスホリパーゼDとしては、キャベツや落花生などの高等植物由来のものやStreptomyces chromofuscus、Actinomadula sp.などの微生物由来のものが市販試薬として入手可能であるが、Actinomadula sp. No.362由来の酵素によって極めて選択的にcPAが合成される(特開平 11-367032号明細書)。リゾ型リン脂質とホスホリパーゼDとの反応は、酵素が活性を発現できる条件であれば特に限定されないが、例えば、塩化カルシウムを含有する酢酸緩衝液(pH 5~6程度)中で室温から加温下(好ましくは37℃程度)で1から5時間程度反応させることにより行う。生成したcPA誘導体は、常法に準じて、抽出、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー(TLC)などにより精製することができる。

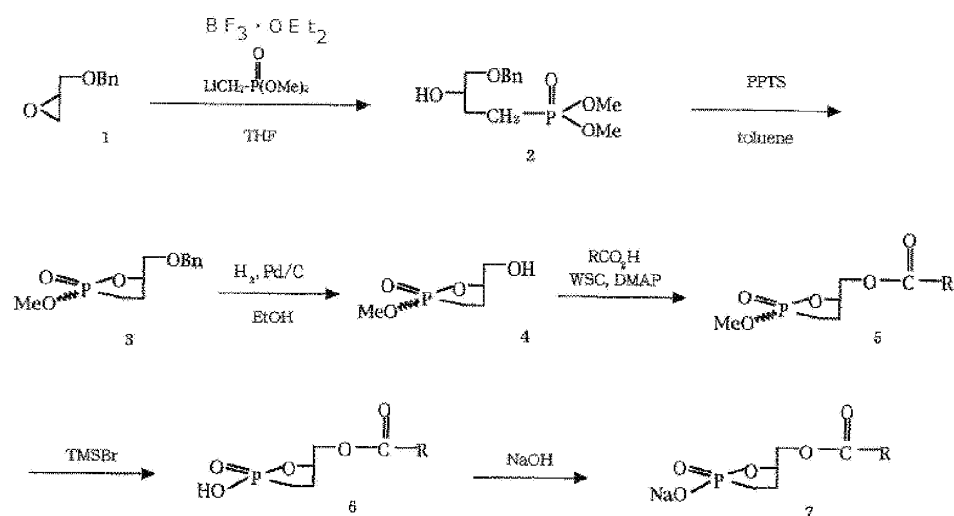
[0036] また、式(1)で示される化合物のうちX又はYがーSーである化合物は、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 21 (2011) 4180-4182、又はBioo

rganic & Medicinal Chemistry 20 (2012) 3196-3201の記載に準じて合成することができる。

[0037] また、式(1)で示される化合物のうちXが $-CH_2-$ であり、Yが $-O-$ である化合物は、特開2004-010582号公報又は国際公開WO03/104246号公報に記載の方法により合成することができる。

[0038] また、式(1)で示される化合物のうちXが $-O-$ であり、Yが $-CH_2-$ である化合物は、文献記載の方法 (Uchiyama A. et al., Biochimica et Biophysica Acta 1771 (2007) 103-112; 並びに「日本薬学会 第23回 反応と合成の進歩シンポジウム1997年11月17、18日(熊本市民会館) 環状ホスファチジン酸およびカルバ体誘導体の合成と生理作用、要旨集ページ101-104」) に準じて合成することができ、また国際公開WO2002/094286号公報に記載の方法により合成することができる。具体的な合成経路の一例を以下に示す。

[0039] [化6]



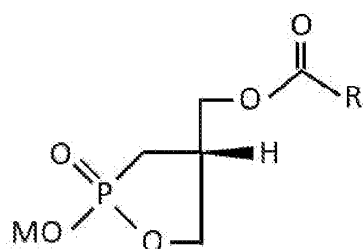
[0040] 上記においては、先ず、市販の(R)-ベンジルグリシジルエーテル(1)を $BF_3 \cdot Et_2O$ で活性化させ、メチルホスホン酸ジメチルエステルに $n-BuLi$ を作用させて得られるリチオ体を反応させることでアルコール(2)を得る。

得られたアルコールを、トルエン中で過剰のp-トルエンスルホン酸のピリ

ジニウム塩を用いて80℃で反応させることにより、環化体(3)を得る。この環化体を、水素雰囲気下で20% Pd(OH)₂-Cを用いて加水素分解し、脱ベンジル化を行う(4)。縮合剤として1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を用いて、脂肪酸と反応させてカップリング体(5)を得る。次に、求核剤としてプロモトリメチルシランを用いて、メチル基だけを位置選択的に除去し、環状ホスホン酸(6)を得る。これをエーテルを用いて分液ロートに移しこみ、少量の0.02Nの水酸化ナトリウム水溶液を滴下して、分液操作を行い、ナトリウム塩(7)として目的化合物を抽出、精製する。

[0041] 式(2)で示される化合物は、例えば、特開2021-80227号公報に記載の方法に準じて製造することができる。具体的には、下記構造：

[化7]



(式中、R及びMは、式(2)における定義と同義である)

を有するカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を、適当なバッファー（リン酸バッファーなど）に溶解した溶液を、人工胃液（例えば、塩化ナトリウム水溶液（2 g NaCl, 12 M HCl 7 mL / 1000 mL 水, pH 1.2））で希釈する。上記で得られた溶液をインキュベートすることにより、式(2)で示される化合物を製造することができる。

[0042] あるいは、式(2)で示される化合物は、autotaxin (ATX) を用いて製造することができる。ATXと、上記構造を有するカルバ環状ホスファチジン酸誘導体を適当な緩衝液（例えば、Tris緩衝液など）に所定の濃度になるように溶解する。得られた溶液を37℃でインキュベートして反応させることにより、式(1)で示される化合物を製造することができる。

[0043] 本発明において有効成分として用いる環状ホスファチジン酸、カルバ環状

ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩は、アルツハイマー型認知症を中心とする認知症の進行を抑制し、症状を回復させる作用を有することから認知症の改善又は治療剤として使用することができる。特に、本発明において有効成分として用いる環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩は、アルツハイマー型認知症を中心とする認知症において明らかな改善・治療効果を有することにより、きわめて有効な認知症治療剤として使用することができる。

[0044] 本発明の認知症改善・治療の投与対象となる疾患としては、アルツハイマー型認知症の他に、脳血管性認知症、前頭側頭型認知症等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の損傷治療剤は、これらの中でも特にアルツハイマー型認知症の治療薬として有用である。

[0045] 本発明の認知症治療剤は、1又は2以上の製剤学的に許容される製剤用添加物と有効成分である環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸、カルバリゾホスファチジン酸（好ましくは、式（1）又は式（2）で示される化合物）あるいはその塩とを含む医薬組成物の形態で提供することが好ましい。

[0046] 本発明の認知症治療剤は、種々の形態で投与することができるが、好適な投与形態としては、経口投与でも非経口投与（例えば、静脈内、筋肉内、皮下又は皮内等への注射、直腸内投与、経粘膜投与など）でもよい。

[0047] 経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、散剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤などを挙げることができ、非経口投与に適する医薬組成物としては、例えば、注射剤、点滴剤、坐剤、経皮吸収剤などを挙げることができるが、本発明の認知症治療剤の剤形はこれらに限定されることはない。さらに、公知の技術によって持続性製剤とすることもできる。例えば、ゼラチンを基剤としたハイドロゲル中に、有効成分である環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩を封入することによ

って、徐放性製剤とすることができる。

[0048] 本発明の認知症治療剤の製造に用いられる製剤用添加物の種類は特に限定されず、当業者が適宜選択可能である。例えば、賦形剤、崩壊剤又は崩壊補助剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、溶解剤又は溶解補助剤、分散剤、懸濁剤、乳化剤、緩衝剤、抗酸化剤、防腐剤、等張化剤、pH調節剤、溶解剤、安定化剤などを用いることができ、これらの目的で使用される個々の具体的成分は当業者に周知されている。

[0049] 経口投与用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物として、例えば、ブドウ糖、乳糖、D-マンニトール、デンプン、又は結晶セルロース等の賦形剤；カルボキシメチルセルロース、デンプン、又はカルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤又は崩壊補助剤；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、又はゼラチン等の結合剤；ステアリン酸マグネシウム又はタルク等の滑沢剤；ヒドロキシプロピルメチルセルロース、白糖、ポリエチレングリコール又は酸化チタン等のコーティング剤；ワセリン、流動パラフィン、ポリエチレングリコール、ゼラチン、カオリン、グリセリン、精製水、又はハードファット等の基剤を用いることができる。

[0050] 注射あるいは点滴用の製剤の調製に用いることができる製剤用添加物としては、注射用蒸留水、生理食塩水、プロピレングリコール、界面活性剤等の水性あるいは用時溶解型注射剤を構成する溶解剤又は溶解補助剤；ブドウ糖、塩化ナトリウム、D-マンニトール、グリセリン、等の等張化剤；無機酸、有機酸、無機塩基又は有機塩基等のpH調節剤等の製剤用添加物を用いることができる。

[0051] 本発明の認知症治療剤はヒトなどの哺乳動物に投与することができる。

本発明の損傷治療剤の投与量は患者の年齢、性別、体重、症状、及び投与経路などの条件に応じて適宜増減されるべきであるが、一般的には、成人一日あたりの有効成分の量として $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $100 \text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲であり、好ましくは $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $10 \text{mg}/\text{kg}$ 程度の範囲である。

上記投与量の認知症治療剤は一日一回に投与してもよいし、数回（例えば、2～4回程度）に分けて投与してもよい。

[0052] 以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

実施例

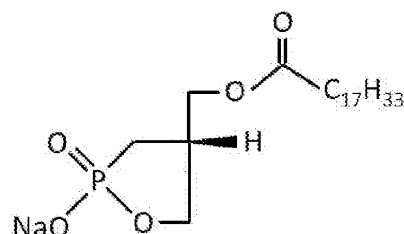
[0053] 実施例 1 :

(1) 被験化合物

実験で用いたカルバcPAは2ccPA (18:1)である。2ccPA (18:1)の構造は以下に示す。ここで $-C_{17}H_{33}$ は、 $-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$ (シス体)を示す。2ccPA (18:1)は、特開2004-010582号公報に記載の方法により合成した。

また、実験で用いたカルバリゾホスファチジン酸は2cLPA(18:1)である、2cLPA(18:1)の構造は以下に示す。ここで $-C_{17}H_{33}$ は、 $-(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$ (シス体)を示す。2cLPA (18:1)は、特開2004-010582号公報に記載の方法により合成した。

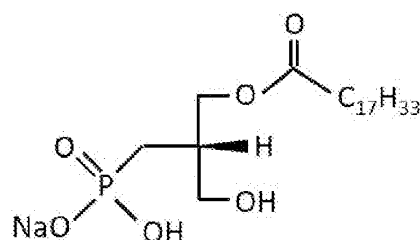
[0054] [化8]



(3) 2カルバ環状ホスファチジン酸 (18:1)
2ccPA (18:1)

[0055]

[化9]



(4) 2カルバリゾホスファチジン酸 (18:1)
2cLPA (18:1)

[0056] (2) マウス

(2 - 1) アルツハイマー型認知症モデルマウス (病態マウス)

モデルマウス作成の実績を持つ (株) 安評センターにて、Tomiyama T., Nagata T., Shimada H., Teraoka R., Fukushima A., Kanemitsu H., Takuma H., Kuwano R., Imagawa M., Ataka S., Wada Y., Yoshioka E., Nishizaki T., Watanabe Y., Mori H. A new amyloid β variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. Ann. Neurol. 63, 377-387 (2008) の方法に基づいて生産され、24週齢まで飼育されたAPP^{osk} (SPF) 雄性マウス68匹を、(株) 新薬リサーチセンターに入荷し、予備飼育まで馴化した。ただし、入荷日を0日として7日までの期間は検疫を行った。一般状態観察を毎日行い、体重を入荷1 (入荷翌日)、3及び7日に測定した。飼育環境は、一頭体ずつ、ポリサルファン製ケージに入れ、温度 $22 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ 、明暗は12時間周期とした条件下、動物飼育室内で飼育した。

[0057] 実験は、以下の法律、基準、及び指針を準用して行った。

・動物の愛護及び管理に関する法律

[法律第105号、昭和48年10月1日 (令和元年6月19日最終改正：令和元年法律第39号)]

・実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準

[環境省告示第88号、平成18年4月28日 (平成25年8月30日最終改正：環境省

告示第84号)]

・ 動物の殺処分方法に関する指針

[総理府告示第40号、平成7年7月4日（平成19年11月12日一部改正：環境省告示第105号）]

[0058] なお本試験は、試験実施施設である（株）新薬リサーチセンター内の動物実験委員会が規定する動物実験計画書（審議No. 220524A）の審議・承認を得た後に実施した。

[0059] （2－2）正常マウス

APPoskマウスを製造した（株）安評センターから、遺伝子改変を行わないWild type（SPF）の24週齢の雄性マウス16匹を（株）新薬リサーチセンターに搬送・入荷し、APPoskマウスと同様に、入荷日を0日として7日間検疫・馴化を行った。一般状態観察を毎日行い、体重を入荷1（入荷翌日）、3及び7日に測定した。

飼育環境や準用した法律、基準、指針はAPPoskマウスと同じ。

[0060] （2－3）動物の選択及び群分け

検疫・馴化に異常が認められなかった動物のみを使用し、入荷7日の体重を指標に以下の群構成表の様に群分けを行った。Wild typeは、入荷した16匹から体重が平均に近い10匹を選別して、正常群とした。APPoskは、入荷した68匹から層別連続無作為化法により、病態、病態+2ccPA(L)、病態+2ccPA(H)、病態+2cLPA(L)、病態+2cLPA(H)群に割り付けた。L：低用量（0.9mg/kg）、H：高用量（1.8mg/kg）

[0061] <群構成表>

[表1]

群		系統	投与量 (mg/kg)	動物数 (匹)	動物番号
A	正常	wild type	0*	10	001-010
B	病態	APPosk	0*	10	101-110
C	病態+2ccPA (L)		0.9	10	201-210
D	病態+2ccPA (H)		1.8	10	301-310
E	病態+2cLPA (L)		0.9	10	401-410
F	病態+2cLPA (H)		1.8	10	501-510

*: 媒体 (0.1%BSA 含有 PBS) を投与
なお、群分けから除外された動物については、イソフルラン麻酔下で開腹し、放血安楽死させた。

[0062] (2-5) 投与液の調製と投与

投与物質を分取し、媒体 (0.1% FA-free BSAを含むPBS) に混和した。

投与液を、26G注射針を装着した注射筒 (ディスプレイザブルシリンジ) に充填し、毎日1回、168日間 (24週間) 腹腔内投与を行った。なお、モリス水迷路実施日については、モリス水迷路実施後に投与した。

[0063] (3) 一般状態の観察および体重測定

(3-1) 一般状態の観察

一般状態の観察は毎日実施し、その状態を記録した。なお、本試験を通じて人道的エンドポイント該当動物は認められず、特に大きな異常を示した動物も認められなかった。ただし、動物番号403、405で、一時的に尿生殖部位の腫脹が観察されたが、いずれも数日以内に快復した。

なお、投与後97日目に動物番号101 (病態群) 1匹の死亡が確認された。前日まで元気であったこと、肉眼的解剖検査によって特記すべき異常は認められなかったことから、原因は不明の突然死と判断した。

[0064] (3-2) 体重測定

体重測定は電子天秤を使用し、1回/週の頻度で実施した。またその都度、時間を置いて、2回ずつ測定した。死亡した病態群1匹を除いた59匹のマウス

において、体重の大きな変化は認められなかった。2ccPA、2cLPA の24週間に亘る連日投与による体重減少が観察されなかったことから、両被験物質の安全性が確認された。なお、試験期間中、モリス水迷路試験で大きく外れた値を示した正常群2匹は結果判定から外した。

[0065] 表2は、試験動物の健康状態の指標として、1回/週の頻度で実施した体重測定の結果を示す。この結果から、両被験物質の安全性が示されている。

[0066] [表2]

群		系統	動物番号	体重変化 (平均値) 標準誤差
A	正常	wild type	001-010	30.5. —34.5 (33.0) 0.5
B	病態	APPosk	101-110	30.1—33.8 (31.5) 0.9
C	病態+2ccPA (L)		201-210	31.4—33.6 (32.3) 0.7
D	病態+2ccPA (H)		301-310	30.6—32.8 (32.1) 0.6
E	病態+2cLPA (L)		401-410	30.8—33.3 (32.0) 0.6
F	病態+2cLPA (H)		501-510	29.6—31.9 (30.2) 1.0

[0067] (4) モリス水迷路試験

マウスが12ヵ月齢（48週齢）に達した時点より、モリス水迷路試験を実施した。

水迷路（直径90 cm、高さ60 cm、水温約22℃）を白い無害の塗料（スキムミルク）で白濁させ、仮想の4象限（東西南北）に分けた。直径8 cmの円形のプラットフォームを水表面から深さ約1 cmに沈め、北の象限の中央付近に設置した。迷路外手掛かりとしては、水迷路の壁に黒い目印を設置した。

[0068] 水迷路内に設置したプラットフォームに到達するまでの時間（逃避潜時）を4日間に亘って測定した。その際、各動物に対して5回連続で試行を実施し、各試行の終了から開始までは、20秒前後の間隔を空けた。

各試行は、北の象限を除いた任意の象限よりマウスの顔を水迷路の外縁に向けた状態に入れて開始した。測定及び解析にはWebカメラ（Logicool HD We

bcam C615) 及びSMARTv3.0 (Panlab Harvard Apparatus) を用いた。測定開始から60秒以内にマウスがプラットフォームに到達し、かつ、プラットフォーム上で10秒間静止した際に測定を終了し、飼育ケージに戻した。また、マウスが60秒以内にプラットフォームに到達しなかった場合、もしくは到達したもののプラットフォーム上で10秒間静止しなかった場合は測定開始から70秒以内に測定を終了し、測定実施者がマウスをプラットフォームまで誘導し、プラットフォーム上で10秒間保った後に飼育ケージに戻した。

[0069] なお、SMARTv3.0での解析の設定上、マウスが60秒以内にプラットフォームに到達しなかった場合、もしくは60秒以内にプラットフォームに到達したもののプラットフォーム上で10秒間静止しなかった場合は、60秒以上の数値としてアウトプットされるが、全て60秒として数値を取り扱った。なお、正常群（A群）において、水迷路4日目の5回の逃避潜時の平均値が40秒を超えた個体2匹については、wild typeとして設定したものの、元々認知機能が低いと判断して、データから除外して平均値及び標準誤差を算出した。また病態群（B群）において、水迷路4日目の5回の逃避潜時の平均値が20秒以下の動物については、認知機能の低下が不十分であると判断し、データから除外して平均値及び標準誤差を算出する予定だったが、該当する個体は発生しなかった。

[0070] （5）モリス水迷路試験による記憶改善効果

本試験においては、前述のように、24週齢APPoskマウスに、2ccPA/2cLPAを168日間（24週間）腹腔投与し、モリス水迷路試験によって、2ccPA/2cLPAの記憶評価への効果を調べた。

[0071] 以下にモリス水迷路試験の結果を示す。

図1は、正常、病態、病態+2ccPA（L:低用量およびH:高用量）、病態+2cLPA（LおよびH）マウスの、モリス水迷路の逃避潜時（1日毎に各5回ずつ計測）を示す。図2は、低用量の2ccPA、2cLPAによる記憶改善作用を示す。

それぞれの測定値は、（4）に記載の通り、4日間に亘って、各動物に対して5回連続で試行した結果をまとめたものだが、2ccPA/2cLPAの投与によって

、モデルマウスにおける記憶の顕著な改善効果が確認された。特に、2ccPA低用量（0.9mg/kg）で、正常群にも劣らない記憶の維持作用が観察された。

[0072] 以上の結果から、2ccPA、2 cLPAともに、アルツハイマー型認知症モデルマウスの記憶低下を著しく改善することが示された。

[0073] （６）解剖

最終投与翌日に解剖を実施した。イソフルラン麻酔下にて開腹し、後大静脈より全採血を行った後、放血致死させた。

放血後、各群10匹中6匹（末尾1～6）はリン酸緩衝液（PBS）で全身灌流後、4%パラホルムアルデヒド（PFA）で再度灌流固定し、その後脳を摘出した。摘出した脳は同様の固定液を使用して浸透固定させた。残りの各群4匹（末尾7～10）については、PBSで全身を灌流後、脳を摘出し液体窒素を用いて凍結した。

その後の解析のために、得られた血液は、遠心分離して血清を分取し、-70℃以下で保存し、4%PFAで固定した脳は室温で、凍結した脳は-70℃以下で保存した。

[0074] （７）タウタンパク質およびリン酸化タウタンパク質の定量

固定マウス大脳皮質の連続切片（厚さ40μm）をクライオスタットによって作成し、切片を一次抗体と共に一晩インキュベートし、さらに二次抗体と1時間インキュベートした後、共焦点顕微鏡（Carl Zeiss）で取得した染色像をNIH ImageJで定量した。一次抗体には非リン酸化タウ抗体（Invitrogen）、リン酸化タウ(Ser396)抗体（Invitrogen）、リン酸化タウ(Ser404)抗体（Invitrogen）を用い、二次抗体にはビオチン化ヤギ抗マウスIgG抗体（Vector Lab.）およびビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体（Vector Lab.）を用いた。定量は、それぞれ5切片を用いて行った。

[0075]

[表3]

正常、病態、病態+2ccPA（低用量）、病態+2cLPA（低用量）マウスの海馬領域における、
タウタンパク質及びリン酸化タウタンパク質の定量

群	タウタンパク質領域/ 海馬領域(%) (平均値)	リン酸化タウ (Ser396) 領域/海馬領域(%) (平均値)	リン酸化タウ (Ser404) 領域/海馬領域(%) (平均値)
正常 (Non-Tg)	16.0-36.2 (24.2)	0.5-4.6 (2.2)	1.4-4.7 (3.1)
病態 (APPosk-Tg)	17.1-39.3 (24.9)	4.7-13.2 (9.2)	2.1-6.3 (3.9)
病態+2ccPA (L) (APPosk-Tg+2ccPA)	7.7-19.5 (17.4)	2.0-4.9 (2.3)	0.4-1.7 (0.5)
病態+2cLPA (L) (APPosk-Tg+2cLPA)	10.6-36.2 (19.0)	0.5-4.7 (2.4)	0.9-1.8 (1.2)

[0076] 以上の結果から、2ccPAと2cLPAがいずれも、認知症の発症に関与しているとされているタウタンパク質のリン酸化を、顕著に抑制することが示された。

[0077] (8) 2ccPAが脳血管関門を通過することの証明：マイクロダイアリシス法の適用

2ccPAが血液脳関門（BBB）を通過して脳内に移行することを確認するために、マイクロダイアリシス法において多くの実績を持つ株式会社安評センター・久留米モダリティ分析研究室および久留米大学医学部疾患モデル研究センターにて、実験を実施した。

遵守した動物実験関連規則は、以下の通り。

- ・「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年10月1日法律第105号，最終改正：令和元年6月19日法律第39号）
- ・「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年4月28日環境省告示第88号，最終改正：平成25年8月30日環境省告示第84号）

また本試験は、久留米大学の動物実験委員会により試験開始前に審査・承認されている（承認番号2023-189）

[0078] マウス脳の海馬に透析プローブ (FX-I-4-02、EICOM) を留置した33週齢の雄性C57BL/6J-Agedマウス (SPF、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社) に2ccPAを腹腔内投与した後、in vivoマイクロダイアリシス法によって、投与前1時間と投与後30分毎(0.5~5.0時間)の10時点における脳内マイクロダイアリシス灌流液を回収した。

海馬へのガイドカニューレ留置手術は、イソフルラン麻酔下にて、海馬の座標位置 (AP = -3.1 mm, ML = +2.7 mm, DV = -3.7 mm) にガイドカニューレおよびダミーカニューレを設置した。術後は鎮痛のためベトルファールを皮下投与した。カニューレ留置3~5日後に、イソフルラン吸入麻酔下で留置したカニューレを透析プローブに取り換えた後、前灌流 (灌流液: 0.15% BSA含有生理食塩液) を開始した。

[0079] 2ccPA投与は、イソフルラン麻酔下にて実施した。秤量した2ccPAに0.1% BSA含有D-PBS(-)を添加後、超音波処理にて分散させたものを投与液とした。

投与液は0.9 mg/kg/dayとなるように0.1% BSA含有D-PBS(-)で希釈した後、投与直前に1匹ずつ超音波処理して投与した。投与経路は、腹腔内投与とした。

マイクロダイアリシス灌流液の回収時点は、投与前1時間、投与後0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0時間の11時点とし、氷冷したシリコナイズチューブにそれぞれ回収した。

[0080] 各試験群の各5匹のマウスにおいて、海馬へのカニューレ留置手術、透析プローブへの取り換え、被験物質投与、マイクロダイアリシス灌流液の回収を実施し、回収液を氷冷した酸メタノール溶液 (pH 4) に添加・攪拌した後、速やかに液体窒素にて凍結して、冷凍 (設定: -80℃) 保管した。

[0081] (9) 2ccPAが血液脳関門 (BBB) を通過することの証明: マイクロダイアリシス回収液のLC/MSによる定量

2ccPAを投与したマウスからマイクロダイアリシス法により回収された灌流液中の2ccPAの濃度を、LC/MSを用いて測定した。条件は、以下の論文の通り。 Shimizu Y., Fukasawa K., Yamamoto S., Shibike Y., Tsukahara R., Is

hikawa M., Iwasa K.,Yoshikawa K., Gotoh M.,Murakami-Murofushi K. Eval
uation of the pharmacokinetics of 2-carba-cyclic phosphatidic acid by
liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry
Prostaglandins Other Lipid Mediat.150:106450. doi:10.1016(2020).

[0082] 検量線用標準溶液は、標準物質2ccPAにエタノールを加えて溶解した後、ブ
ランクマトリックスと混合して調製し、内部標準溶液（IStd）は、内部標準
物質（Ranitidine hydrochloride）に超純水を加えて溶解した後、超純水で
希釈して調製した（10 ng/mL）。測定検体（マイクロダイアリシス滲流液）
は、検体量に対して5倍量の酸メタノール溶液（pH 4）添加済みのものを用い
た。

測定試料（測定検体および検量線用標準溶液）は、各試料に内部標準溶液
を含む検体処理液を添加して除タンパクを行い、遠心後、上清をフィルタ
ー過した後、2ccPA濃度をQ Exactive Ultimate 3000システム（Thermo Scien
tific）を用いて測定し、以下の結果を得た。

[0083] [表4]

マイクロダイアリシス回収液中の 2ccPA 濃度

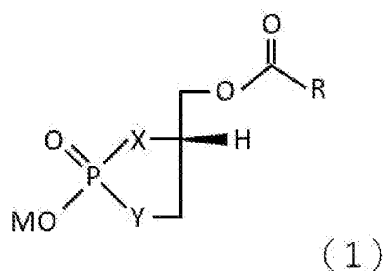
投与後 (時間)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0
2ccPA 濃度 (ng/mL)	0	1.90	2.22	2.81	2.24	1.64	1.80	2.32	2.12	2.12	1.22

[0084] この結果から、投与した2ccPAが、脳の毛細血管壁を覆っている内皮細胞の
バリアを通過して、脳組織に働いていることが示された。2ccPAは、脳に直接
働いて、ADをはじめとする脳神経系の多様な疾患の治療に於いて、有効に働
くことが期待される。

請求の範囲

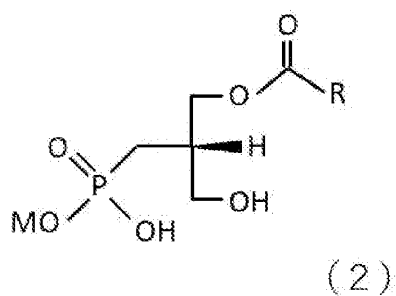
- [請求項1] 環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸、チア環状ホスファチジン酸又はカルバリゾホスファチジン酸あるいはその塩を含有する、認知症の改善又は治療薬。
- [請求項2] 認知症が、アルツハイマー型認知症である、請求項1に記載の認知症の改善又は治療薬。
- [請求項3] 環状ホスファチジン酸、カルバ環状ホスファチジン酸およびチア環状ホスファチジン酸又はその塩が、式(1)で示される化合物であり、カルバリゾホスファチジン酸又はその塩が、式(2)で示される化合物である、請求項1又は2に記載の認知症の改善又は治療薬。

[化1]



式(1)中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。X及びYはそれぞれ独立に、 $-O-$ 、 $-S-$ 又は $-CH_2-$ を示すが、X及びYが同時に $-CH_2-$ になることはない。Mは、水素原子又は対カチオンである。

[化2]



式(2)中、Rは、炭素数1～30の直鎖状若しくは分岐状アルキル基、炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルケニル基、又は炭素数2～30の直鎖状若しくは分岐状アルキニル基であり、これらの基はシクロアルカン環又は芳香環を含んでいてもよい。Mは、水素原子又は対カチオンである。

[請求項4]

式(1)において、X及びYの一方が $-CH_2-$ であり、X及びYの他方が $-O-$ である、請求項3に記載の認知症の改善又は治療薬。