

明 細 書

発明の名称：メラノコルチン1受容体アゴニストの新規用途

技術分野

[0001] 本発明は、1－{2－[(3S, 4R)－1－{[(3R, 4R)－1－シクロペンチル－3－フルオロ－4－(4－メトキシフェニル)ピロリジン－3－イル]カルボニル}－4－(メトキシメチル)ピロリジン－3－イル]－5－(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン－4－カルボン酸（以下、化合物Aと呼ぶ）もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶などのメラノコルチン1受容体アゴニストを有効成分とする間質性肺疾患、並びに、全身性強皮症に伴う、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼから選択される疾患や症状の治療または予防のための医薬に関する。

背景技術

[0002] 全身性強皮症は、免疫や炎症の制御障害、微小血管障害、多臓器の線維化という主要な病態を特徴とする自己免疫疾患である。全身性強皮症は自己免疫リウマチ性疾患の中で最も死因別死亡率が高く、アンメットメディカルニーズの高い疾患であると言える。全身性強皮症に関連する間質性肺疾患の治療薬として、これまでにニンテダニブ（商品名オフェブ）とトシリズマブ（商品名アクテムラ）が知られているが、さらに有効性と安全性に優れた薬剤が望まれている。一方、全身性強皮症そのものに対する承認薬はなく、間質性肺疾患以外の全身性強皮症関連症状に対しても治療薬の必要性が指摘されている。

[0003] メラノコルチン受容体（MCR）ファミリーは、Gタンパク質共役型受容体のクラスAファミリーに属し、組織分布や機能の異なる5つのメンバー（MC1R、MC2R、MC3R、MC4R、MC5R）で構成されている。MC1Rは、メラノサイト、単球、内皮細胞、線維芽細胞、ケラチノサイトなど様々な細胞種に発現していることが報告されている。内因性リガンドである α -メラノサイト刺激ホルモン（

α -MSH) によりMC1Rが活性化されると、メラノサイトでのメラニン生成が誘導され、皮膚や髪の色素沈着が起こることが知られている。また、MC1Rの活性化は、幅広い抗炎症作用を持つことが知られている。全身性強皮症との関係では、最も広く用いられている全身性強皮症動物モデルであるブレオマイシン (BLM) 誘発皮膚線維化モデルにおいて、 α -MSHが皮膚線維化を抑制することが報告されており、MC1Rシグナル欠損マウスではBLM誘発皮膚線維化が増強されることが報告されている。これらの証拠から、MC1Rアゴニズムは、全身性強皮症の治療に有効であることが示唆されるが、その作用メカニズムの詳細は未知である。また、全身性強皮症患者におけるMC1Rの発現レベルおよび分布に関する情報は十分に理解されておらず、全身性強皮症およびその関連疾患における関与は不明である。

[0004] 一方、特許文献1では、化合物Aなどのピロリジン化合物もしくはその医薬的に許容し得る塩、和物または共結晶が、優れたMCR、特にMC1Rの活性化作用を有することが開示されている。また、特許文献2では、化合物Aとリン酸の共結晶が優れたMCR、特にMC1Rの活性化作用を有することが開示されている。そして、特許文献1および2では、それぞれ、化合物Aまたは化合物Aとリン酸の共結晶がMCR、特にMC1Rの活性化が関与する各種疾患または症状の予防または治療に有用であることが開示されており、対象疾患として全身性強皮症も記載されている。しかしながら、間質性肺疾患や、全身性強皮症に伴う、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症または腎クリーゼなどの疾患や症状に対する効果は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：W02015/182723

特許文献2：W02020/138481

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、間質性肺疾患や、全身性強皮症に伴う、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼから選択される疾患や症状の治療および／または予防のための医薬を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、全身性強皮症モデル動物においてMC1Rアゴニストである化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶（以下、化合物A等と呼ぶ）を投与することにより、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15 (Growth and differentiation factor-15)、ET-1 (Endothelin-1)、IL-6、CCL2 (Chemokine (C-C motif) ligand 2)（別名MCP-1: Monocyte chemoattractant Protein 1）、TNFR (Tumor necrosis factor receptor) I、TNFR II、SP-D (Surfactant protein D)、S100A9 (S100 Calcium Binding Protein A9)、Adiponectin、MMP (Matrix metalloproteinase) -2、MMP-3、TIMP-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinases-1)、Collagenおよび α -SMA (alpha Smooth muscle actin: Acta2遺伝子によってコードされる)などの病態マーカーの発現量を低下させることができることを見出した。これにより、化合物AなどのMC1Rアゴニストが間質性肺疾患や、全身性強皮症に伴う、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼから選択される疾患や症状の治療や予防に有効であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0008] 本発明の要旨は以下の通りである。

[1] 1- {2- [(3S, 4R) -1- { [(3R, 4R) -1-シクロペンチル-3-フルオロ-4- (4-メトキシフェニル) ピロリジン-3-イル] カルボニル} -4- (メトキシメチル) ピロリジン-3-イル] -5- (トリフルオロメチル) フェニル} ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を有効成分とする、対象における間

質性肺疾患（ILD）を治療または予防するための医薬。

〔1－1〕 間質性肺疾患の治療または予防における使用のための、1－{2－〔（3 S，4 R）－1－{〔（3 R，4 R）－1－シクロペンチル－3－フルオロ－4－（4－メトキシフェニル）ピロリジン－3－イル〕カルボニル}－4－（メトキシメチル）ピロリジン－3－イル}－5－（トリフルオロメチル）フェニル} ピペリジン－4－カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶。

〔1－2〕 間質性肺疾患の治療または予防のための医薬の製造における、1－{2－〔（3 S，4 R）－1－{〔（3 R，4 R）－1－シクロペンチル－3－フルオロ－4－（4－メトキシフェニル）ピロリジン－3－イル〕カルボニル}－4－（メトキシメチル）ピロリジン－3－イル}－5－（トリフルオロメチル）フェニル} ピペリジン－4－カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、の使用。

〔1－3〕 有効量の1－{2－〔（3 S，4 R）－1－{〔（3 R，4 R）－1－シクロペンチル－3－フルオロ－4－（4－メトキシフェニル）ピロリジン－3－イル〕カルボニル}－4－（メトキシメチル）ピロリジン－3－イル}－5－（トリフルオロメチル）フェニル} ピペリジン－4－カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を対象に投与する工程を含む、対象における間質性肺疾患を治療または予防する方法。

〔2〕 間質性肺疾患が、特発性間質性肺炎または膠原病（CTD）に伴う間質性肺疾患である、〔1〕に記載の医薬、〔1－1〕に記載の化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、〔1－2〕に記載の使用、または〔1－3〕に記載の方法。

〔3〕 間質性肺疾患が、全身性強皮症に伴う間質性肺疾患である、〔1〕に記載の医薬、〔1－1〕に記載の化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、〔1－2〕に記載の使用、または〔1－3〕に記載の方法。

〔4〕 全身性強皮症（SSc）がびまん皮膚硬化型全身性強皮症（dcSSc）であ

る、[3]に記載の医薬、化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、使用、または方法。

[5] 対象が、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量が健常人よりも増加した患者である、[1]～[4]のいずれかに記載の医薬、化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、使用、または方法。

[6] 1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を有効成分とする、対象における全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を治療または予防するための医薬であって、該疾患または症状が皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである、医薬。

[6-1] 全身性強皮症に伴う各種疾患または症状であって、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである疾患または症状の治療または予防における使用のための、1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶。

[6-2] 全身性強皮症に伴う各種疾患または症状であって、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである疾患または症状の治

療または予防のための医薬の製造における、1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、の使用。

[6-3] 有効量の1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を対象に投与する工程を含む、対象における全身性強皮症に伴う各種疾患または症状であって、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである疾患または症状を治療または予防する方法。

[7] 対象がびまん皮膚硬化型全身性強皮症患者である、[6]に記載の医薬、[6-1]に記載の化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、[6-2]に記載の使用、または[6-3]に記載の方法。

[8] 対象が、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量が健常人よりも増加した患者である、[6]または[7]に記載の医薬、化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、使用、または方法。

[9] 1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくは

その医薬的に許容しうる塩または共結晶を有効成分とする、対象におけるP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を低下させるための医薬。

[9-1] P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を低下させるために使用される、1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶。

[9-2] P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を低下させるための医薬の製造における、1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶の使用。

[9-3] 有効量の1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を対象に投与する工程

を含む、対象におけるP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を低下させる方法。

[10] 対象が間質性肺疾患を呈する対象である、[9]に記載の医薬、[9-1]に記載の化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、[9-2]に記載の使用、または[9-3]に記載の方法。

[11] 間質性肺疾患が特発性間質性肺炎または膠原病に伴う間質性肺疾患である、[10]に記載の医薬、化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、使用、または方法。

[12] 間質性肺疾患が、全身性強皮症に伴う間質性肺疾患である、[10]に記載の医薬、化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、使用、または方法。

[13] 対象が全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を呈する対象であって、該疾患または症状が皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである、[9]に記載の医薬、化合物Aもしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶、使用、または方法。

[14] α -MSHまたはそのアナログなどのMC1Rアゴニストを有効成分とする、全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を治療または予防するための医薬であって、該疾患または症状がレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状である、医薬。

[14-1] 全身性強皮症に伴う各種疾患または症状であって、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状の治療又は予防における使用のための、 α -MSHまたはそのアナログなどのMC1Rアゴニスト。

〔14-2〕全身性強皮症に伴う各種疾患または症状であって、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状の治療又は予防のための医薬の製造における、 α -MSHまたはそのアナログなどのMC1Rアゴニストの使用。

〔14-3〕有効量の α -MSHまたはそのアナログなどのMC1Rアゴニストを対象に投与する工程を含む、全身性強皮症に伴う各種疾患または症状であって、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状を治療又は予防するための方法。

〔15〕全身性強皮症患者に対するMC1Rアゴニストの治療有効性を判定する方法であって、全身性強皮症患者由来の試料中のP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を測定する工程を含む方法。

〔16〕全身性強皮症患者がレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状の少なくとも1種類を呈する、〔15〕に記載の方法。

〔17〕MC1Rアゴニストが1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶である、〔15〕または〔16〕に記載の方法。

〔18〕全身性強皮症患者に対するMC1Rアゴニストの投与の可否を判定する方法であって、全身性強皮症患者由来の試料中のP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-

D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を測定する工程を含む方法。

[19] 全身性強皮症患者がレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状の少なくとも1種類を呈する、[18]に記載の方法。

[20] MCR1アゴニストが1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル}ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶である、[18]または[19]に記載の方法。

発明の効果

[0009] 本発明の医薬によれば、間質性肺疾患、例えば、特発性間質性肺炎または膠原病に伴う間質性肺疾患や全身性強皮症に伴う間質性肺疾患を効果的に治療または予防することができる。また、全身性強皮症患者において生じる皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症または腎クリーゼを効果的に治療または予防することができる。特に化合物Aは低分子化合物であるため、安価に製造でき、安定性が高く、また、服用しやすい医薬が提供できる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ブレオマイシン (BLM) 誘発全身性強皮症 (SSc) モデルにおける皮膚線維化および肺炎症に対する化合物Aの効果：予防評価。0日目～25日目において、マウスの背部皮膚の同一の領域にBLMを連日注射した。29日間 (0日目～28日目) 連続で、1日1回、マウスに化合物Aまたは溶媒を経口投与した。各試料を29日目に採取した。A：実験スケジュール。B：実験期間中のマウスの体重推移。C：皮膚のコラーゲン含量。D：左肺の湿重量。E：血清中のサーファクタントタンパク質-D (SP-D) 濃度。FおよびG：肺におけるケモカインCcl2

(別名Mcp-1) およびインターロイキン-6 (Il-6) mRNAの発現 (ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1 (Hprt) に対する相対値として算出)。H: 血清中のエンドセリン1 (ET-1) 濃度。B~H: それぞれのバーは平均±SEMを表す (全群ともn=10; ただし、0.03 mg/kgの化合物A処理群 (n=9) を除く)。## $p<0.01$ 、BLM vs. PBS (Studentのt検定を使用); ** $p<0.005$ 、BLM vs. 化合物A (Williamsの検定を使用)。

[図2]BLM誘発SScモデルにおける皮膚線維化に対する化合物Aの効果: 治療評価。マウスの背部皮膚の同一の領域にBLMを隔日で6週間注射した。実験期間の最後の3週間、1日1回、前記マウスに化合物A、イマチニブ、または溶媒を経口投与した。43日目に皮膚試料を取得し、パラフィン包埋した。A: 実験スケジュール。B: HE染色した皮膚標本を顕微鏡下で測定した皮膚の厚さ。C: α 平滑筋アクチン (α SMA、Acta2遺伝子によってコードされる) 染色を行った皮膚標本を顕微鏡下で観察することで算定した皮膚の特定の領域内の α SMA陽性筋線維芽細胞の数。D: 各群の背部皮膚をマッソントリクローム染色した際の代表画像 (写真)。BおよびC: それぞれのバーは平均±SEM (n=8) を表す。# $p<0.05$ 、## $p<0.01$ 、第3群vs第1群および第3群vs第6群、(Wilcoxon検定 (両側) を使用)。* $p<0.025$ 、** $p<0.005$ 、第3群vs第4群および第5群 (S hirley-Williams検定 (片側) を使用)。

[図3A]化合物A等を投与されたBLM誘発SScモデル動物の肺組織を用いた、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。0.3mg/kgの化合物Aを投与されたBLM誘発SScモデル (予防モデル) 由来の肺試料を用いてDNAマイクロアレイ解析を行った。バイオインフォマティクス分析はIPAソフトウェアを用いて行い、2つのデータセットで2種の計算 (「Canonical pathways」および「Diseases or functions」) を行った。下流効果分析 (downstream effect analysis) を用いてアクティベーションz-スコア (activation z-score) を算出した。この図はPBS_溶媒 vs. BLM_溶媒 vs. BLM_化合物A群における遺伝子発現プロファイルの主成分分析を示す。

[図3B]化合物A等を投与されたBLM誘発SScモデル動物の肺組織を用いた、マ

マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。この図はBLM注射および化合物A投与により変化した細胞種のカテゴリーを示す。

[図3C]化合物A等を投与されたBLM誘発SScモデル動物の肺組織を用いた、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。この図はBLMおよび化合物A投与によって変化した、SScの病態と関連するカテゴリーを示す。

[図3D]化合物A等を投与されたBLM誘発SScモデル動物の肺組織を用いた、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。この図はBLMおよび化合物A投与によって変化した、SScの病態と関連するシグナル伝達経路を示す。

[図3E]化合物A等を投与されたBLM誘発SScモデル動物の肺組織を用いた、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。この図はIL-6シグナリングに關与する変動遺伝子を示す。

[図3F]化合物A等を投与されたBLM誘発SScモデル動物の肺組織を用いた、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリング。この図はIL-6シグナリングのパスウェイ・マップを示す。PBS vs. BLM群（左）、およびBLM vs. 化合物A群（右）における変動。

[図4]化合物Aを投与されたBLM誘発SScモデル動物における血清タンパク質プロファイリング。BLM誘発SScモデル（治療モデル）において、10 mg/kgの化合物Aおよび150 mg/kgのイマチニブを投与されたマウスの血清試料を用いて血清タンパク質プロファイリングを行った。Luminexアッセイを使用し、110種のタンパク質を調べた。グラフは、化合物A処理によって有意に抑制された11種のタンパク質を示す。グラフは、個々の値のプロットドットおよび平均±SEM (n=8) として表されている。* p<0.05、** p<0.01、Studentのt検定による（vs. BLM_溶媒群）。

[図5]ヒト線維芽細胞活性化に対する化合物Aの効果。健常またはSSc患者由来の皮膚線維芽細胞をコンフルエントになるまで増殖させ、1%ウシ胎仔血清を含む培地中で24時間飢餓状態に置いた。その後、細胞を化合物Aまたは α -MSHの存在下でTGF- β (10 ng/mL) によって24時間刺激した。A：健常人皮膚線維芽細胞におけるACTA2および COL1A1のmRNA発現をリアルタイムPCRによ

て測定し、GAPDH発現量で標準化した。B：SSc患者皮膚線維芽細胞におけるACTA2およびCOL1A1のmRNA発現をリアルタイムPCRによって測定し、GAPDH発現量で標準化した。それぞれのバーは3ウェルの測定値の平均±SEMを表す。表示した結果は、類似した結果が得られた2～3回の独立した実験の代表である。

[図6]SSc患者由来の皮膚生検試料におけるMC1Rの免疫組織化学的染色による解析（写真）。dcSSc（びまん皮膚硬化型全身性強皮症）患者の皮膚生検試料の免疫組織化学染色の代表的な画像。A：抗MC1R抗体を用いた単染色。DAB基質によって可視化し、ヘマトキシリンによって対比染色したもの。左：低倍率（×40）。右：高倍率（×100）。黒色矢印：線維芽細胞／単核球。灰色矢印：内皮細胞。B：抗MC1R抗体および細胞特異的マーカーによる二重免疫蛍光染色。MC1Rと各細胞マーカーとをマージした画像を示す。CD68：単球／マクロファージ；プロリル-4-ヒドロキシラーゼβ（P4Hβ）：線維芽細胞；CD31：内皮細胞；CD66b：好中球。円：共存領域。

[図7]全身性強皮症における化合物Aの作用のメカニズムの概略図。

発明を実施するための形態

[0011] <化合物A等を有効成分とする医薬>

本発明の医薬の第一の態様は、化合物A等を有効成分とする、対象における間質性肺疾患を治療または予防するための医薬に関する。

本発明の医薬の第二の態様は、対象における、全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を治療または予防するための医薬であって、該疾患または症状が皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症または腎クリーゼである、医薬に関する。

[0012] なお、本発明において、「予防」とは病気や疾患や症状を発症していない個体に対して本発明の医薬を投与し、発症を防ぐ行為を意味する。また、「治療」とは既に病気や疾患や症状を発症した個体に対して本発明の医薬を投与し、症状を改善するおよび／または取り除く行為を意味する。従って、既に病気や疾患や症状を発症した個体に対し、症状などの悪化防止や発作防止や再発防止のために投与する行為は「治療」の一態様である。

[0013] <有効成分>

本発明の医薬の有効成分である、化合物A等については特許文献1に記載されており、特許文献1に記載の方法で製造することができる。

[0014] 化合物A等は、遊離の形でも、それらの医薬的に許容し得る塩または共結晶の形でも医薬用途に供することができる。

ここで、化合物A等は、分子内塩や付加物、さらにそれらの溶媒和物或いは水和物、結晶多形等いずれも含むものである。

ここで、医薬的に許容し得る塩、共結晶、分子内塩、付加物等としては、例えば、塩酸、硫酸、リン酸または臭化水素酸などの無機酸、酢酸、フマル酸、シュウ酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トシル酸またはマレイン酸などの有機酸等を含むものが挙げられるが、化合物Aとリン酸の共結晶を用いることがより好ましい。

[0015] <間質性肺疾患>

本発明の第一の態様に係る医薬の対象疾患は間質性肺疾患である。

間質性肺疾患には、間質性肺炎が挙げられ、間質性肺炎としては、特発性間質性肺炎が挙げられ、特発性肺線維症を伴う特発性間質性肺炎が挙げられる。

また、間質性肺疾患には、膠原病に伴う間質性肺疾患や全身性強皮症に伴う間質性肺疾患も挙げられる。

[0016] 上記のような間質性肺疾患は、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの増加を伴う間質性肺疾患であることが好ましい。これらのマーカーは、健常人と比較してその発現量が増加（例えば1.5倍以上、1.8倍以上または2倍以上増加）していることが好ましい。

[0017] また、上記のような間質性肺疾患は、全身性強皮症患者において生じる間質性肺疾患であることができる。ここで、全身性強皮症には、限局皮膚硬化型全身性強皮症やびまん皮膚硬化型全身性強皮症が含まれる。

[0018] <全身性強皮症に伴う疾患や症状>

本発明の第二の態様に係る医薬の対象となる疾患及び症状は、全身性強皮症に伴う、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼから選択される疾患や症状である。

ここで、屈曲拘縮は全身性強皮症における皮膚線維化によって生じる症状であり、皮膚線維化の抑制により改善することができる。胃食道逆流症や嚥下障害は全身性強皮症における食道線維化によって生じる症状であり、食道線維化の抑制により改善することができる。レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼは全身性強皮症における血管機能障害によって生じる症状であり、血管障害の抑制により改善することができる。肺高血圧症としては、特に制限されないが、例えば、肺動脈性肺高血圧症が挙げられる。

なお、全身性強皮症には、限局皮膚硬化型全身性強皮症やびまん皮膚硬化型全身性強皮症が含まれる。

[0019] 上記のような全身性強皮症に伴う疾患や症状は、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの増加を伴うことが好ましい。これらのマーカーは、健常人と比較してその発現量が増加（例えば1.5倍以上、1.8倍以上または2倍以上増加）していることが好ましい。

[0020] <疾患マーカーを低下させるための医薬>

化合物A等を有効成分とする医薬の他の態様は、対象における、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つの発現量を低下させるための医薬に関する。

すなわち、化合物A等は、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なく

とも1つのマーカーの発現量を低下させることによって治療または予防しうる疾患や症状の治療薬または予防薬として使用できる。

ここで、低下とは、化合物A等の投与前より有意に低下すればよいが、好ましくは、投与後の発現量と正常値の差が、投与前の発現量と正常値の差の50%以下、40%以下または20%以下になるレベルである。これらの発現量が検出限界以下に低下してもよい。

このような疾患や症状としては、これらの少なくとも1つのマーカーの発現量が健常人と比較して増加しており、低下させることで治療または予防しうる疾患や症状であれば特に限定はされない。

[0021] P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAは炎症性疾患や線維化や血管機能障害のマーカーであり、これらの少なくとも1つの発現量を低下させることによって治療または予防しうる疾患や症状としては炎症性疾患や線維化や血管機能障害およびこれらによって引き起こされる症状が挙げられ、具体例としては上述したような間質性肺疾患（特発性間質性肺炎または膠原病に伴う間質性肺疾患を含む）や皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼなどの疾患や症状が挙げられ、より好ましくは、全身性強皮症に伴って生じる、間質性肺疾患や皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症及び腎クリーゼが挙げられるが、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAの少なくとも1つの発現が健常人と比較して増加する疾患であって、この発現を低下、すなわち、正常化させることにより治療または予防しうる疾患である限り、上記の疾患や症状には限定されない。

[0022] 発現量はmRNAの発現でもタンパク質の発現でもよい。

mRNAの発現量は、例えば、RT-PCRによって定量することができる。

タンパク質の発現量は、例えば、組織中の発現量であれば、抗体を用いた染色等により特定することができ、血液等の体液中の発現量であれば、ELISA等により測定することができる。

P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1の場合は好ましくはタンパク質の発現であり、より好ましくは血中でのタンパク質の発現である。

IL-6とCCL2 (MCP-1) の場合はmRNAの発現でもよく、より好ましくは組織でのmRNAの発現でもよい。

Collagenおよび α -SMAの場合は好ましくはタンパク質の発現であり、より好ましくは皮膚組織でのタンパク質の発現である。Collagenは好ましくはCollagen1A1 (COL1A1) である。

[0023] <化合物A等を含む医薬の投与形態等>

化合物A等はそのまま患者に投与してもよいが、好ましくは、化合物A等と医薬的および製剤学的に許容しうる添加物を混合し、当業者に周知な形態の製剤として提供されうる。

[0024] 医薬的および製剤学的に許容しうる添加物としては、医薬の製造に通常用いられる適当な賦形剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、コーティング剤、色素、希釈剤、基剤、および等張化剤等を用いることができる。

[0025] 化合物A等は、上述の添加物とともに適当な投与形態（粉末剤、注射剤、錠剤、カプセル剤または局所外用剤など）に調製した後、その投与形態に応じた適当な投与方法（例えば静脈内投与、経口投与、経皮投与または局所投与など）によって、患者（ヒトまたは哺乳動物）に投与することができる。この中では、経口投与が好ましい。

[0026] 化合物A等を含む医薬の投与量は、低毒性で安全に使用することができ、間質性肺疾患、または前記の全身性強皮症に伴う疾患や症状に対して治療効果または予防効果を発揮できる量であり、投与対象の疾患の種類、程度、症状、年齢、性別、体重、投与経路等によって適宜決定できるが、化合物A等

の量として、例えば、非経口的には約0.0001～1000mg/人/日、好ましくは約0.001～1000mg/人/日、特に好ましくは0.01～500mg/人/日投与され、また経口的には約0.0001～1000mg/人/日、好ましくは0.01～500mg/人/日投与されることが望ましい。特に好ましくは100mg/人/日～300mg/人/日であり、より具体的には100mg/人/日、200mg/人/日、300mg/人/日などが挙げられる。

[0027] <MC1Rアゴニストを有効成分とする医薬>

本発明の他の態様は、MC1Rアゴニストを有効成分とする、対象におけるレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状を治療または予防するための医薬に関する。

すなわち、本発明では、MC1Rアゴニストがレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害に対して治療および／または予防効果を発揮することが初めて見出されたため、MC1Rアゴニストのこれらの疾患に対する新規医薬用途が提供される。

ここにおいて、間質性肺疾患としては、例えば特発性間質性肺炎、膠原病に伴う間質性肺疾患などが挙げられ、特発性間質性肺炎としては特発性肺線維症が挙げられる。また、膠原病に伴う間質性肺疾患としては全身性強皮症に伴う間質性肺疾患が挙げられる。また、肺高血圧症としては、肺動脈性肺高血圧症が挙げられる。

[0028] ここで、MC1Rアゴニストとしては、化合物A等に限られず、MC1Rに対してアゴニスト活性を発揮する化合物であれば使用可能であり、低分子化合物に限らない。MC1Rアゴニストは、MC1Rへの結合およびMC1R発現細胞におけるcAMPの濃度上昇を指標にしたスクリーニングによって同定または取得することができる。

[0029] 具体的には、化合物A以外のMC1Rアゴニストとしては、MC1Rに作動性

の効果を有する化合物であれば何でもよく、例えば、MC1Rの内因性リガンドである α -MSH (α -メラノサイト刺激ホルモン) やそのアナログ (例えば、afamelanotideなど) が挙げられる。

[0030] MC1Rアゴニストを含む医薬の剤形、投与量等は、化合物の種類や疾患の種類、程度、症状、年齢、性別、体重、投与経路等によって適宜決定できる。

[0031] <治療効果判定方法>

本発明の他の態様にかかる、全身性強皮症患者に対するMC1Rアゴニスト治療効果判定方法は、全身性強皮症患者由来の試料中のP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を測定する工程を含む。

[0032] 本発明においては、MC1Rアゴニストである化合物A等が、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を低下させ、全身性強皮症およびそれに伴うレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害などの疾患や症状に対して治療または予防効果を発揮することが示された。

したがって、全身性強皮症患者に対してMC1Rアゴニストを投与し、一定期間 (例えば、約2週間~52週間、好ましくは12週~52週) 経過後に、これらのうち少なくとも1つのマーカーの発現量が低下した場合に、当該MC1Rアゴニストが全身性強皮症の治療に有効であると判定することができる。

[0033] マーカー発現量の測定は、患者から単離された皮膚組織や血液などの生体試料を用いて行うことができる。

[0034] 低下は投与前と比較して有意に低下しているレベルであればよいが、例えば、投与後の発現量と正常値の差が投与前の発現量と正常値の差の50%以下になるレベルである。

[0035] MC1Rアゴニストが全身性強皮症の治療に有効であると判定するための方法

としては、他にも、複合評価項目であるACR-CRISSなどが挙げられる。より具体的には、MRSSなどの皮膚の硬化を判断する指標、FVCなどの肺機能を判断する指標、Patient Global Assessment、Physician Global AssessmentまたはH AQ-DIなどの患者の症状改善に関する、患者本人や医療従事者の主観により評価する指標などが挙げられる。これらの指標が総合して投与前またはプラセボ投与群と比較して有意に改善傾向を示すことで、当該MC1Rアゴニストが全身性強皮症の治療に有効であると判定することができる。

[0036] 治療効果を有すると判定した場合には、MC1Rアゴニストによる治療の継続を行うことができ、MC1Rアゴニストを再投与することができる。一方、前記マーカーの量が低下しない場合は、MC1Rアゴニストの治療効果が十分でないと判断し、MC1Rアゴニストによる治療を停止し、他の治療法を選択することができる。または、治療効果を発揮させるべく、投与量を増減することもできる。

[0037] <MC1Rアゴニストの投与可否の判定方法>

本発明の他の態様にかかる全身性強皮症患者に対するMC1Rアゴニスト投与可否の判定方法は、全身性強皮症患者由来の試料中のP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの量を測定する工程を含む。

[0038] 本発明においては、化合物AなどのMC1Rアゴニストは、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量が健常人と比較して有意に増加している全身性強皮症患者に対し、これらマーカーの発現量を低下させることから、全身性強皮症およびそれに伴うレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害などの疾患に対して治療または予防効果を発揮することが示唆された。

[0039] したがって、全身性強皮症患者から単離された血液や皮膚組織などの生体試料において、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を測定し、これらのマーカーの発現量が健常人と比べて増加している場合に、MC1Rアゴニストを投与すると判定することができる。これらのマーカーのいくつかについて、健常人と比べて増加していると推測される発現量（血中タンパク質量）を以下に例示する。

- ・ P-selectin : 約100 ng/mL
- ・ OPG : 約110 pg/mL
- ・ GDF-15 : 1000 pg/mL
- ・ ET-1 : 3 pg/mL
- ・ S100A9 : 100 ng/mL
- ・ SP-D : cutoff値110 ng/mL以上
- ・ IL-6 : 約15 pg/mL
- ・ P-selectin : 約100 ng/mL

[0040] 増加レベルは、健常人と比較して有意に増加しているレベルでよいが、例えば、健常人の2倍以上である。

実施例

[0041] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明の態様は以下には限定されない。

[0042] 材料および方法

被検物質

化合物A（特許文献1に従って合成）を、in vitroアッセイ用にジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解、またはin vivo実験用に0.5%メチルセルロース溶液に懸濁した。なお、本実施例では、化合物Aとしては1- {2- [(3S, 4R) - 1- { [(3R, 4R) - 1-シクロペンチル-3-フルオロ-4- (4-メトキシフェニル) ピロリジン-3-イル] カルボニル} - 4

ー（メトキシメチル）ピロリジン－３－イル］－５－（トリフルオロメチル）フェニル} ピペリジン－４－カルボン酸とリン酸の共結晶を使用した、単に化合物Aと表記する（図面の簡単な説明でも同様）。

[0043] BLM誘発SScマウスモデル：予防評価

10週齢のメスのC3H/HeNCrJCrJマウス（日本チャールス・リバー株式会社）を使用し、全ての動物実験を田辺三菱製薬社の動物実験ガイドラインに従って行った。前記マウスの背中を剃毛し、背中の中腹部に油性赤インクでマークした。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）またはBLM（日本化薬）（個体あたり0.15mg/0.1mL）を、マークした部位に、0日目～25日目に1日1回皮下注射した。0日目から評価終了の前日（28日目）まで29日間連続で、0.1mL/10g体重の化合物A溶液を、1日1回（BLM注射の約2時間前）経口投与した。29日目、マウスをイソフルラン吸入麻酔により安楽死させ、全血および背部皮膚試料を採取した。左肺を切除して秤量した後、RNAlater溶液（Qiagen）中に浸漬した。採取した血液から血清を分離した。皮膚の注射部位を切り出して秤量（湿重量）し、0.3 mg/mLのペプシンを含んだ0.5 mol/L酢酸溶液中に浸漬することによってコラーゲンを可溶化した。可溶化した試料中のコラーゲン含量をQuickZyme Soluble Collagen Assay kit（QuickZyme Biosciences）を用いて調べ、吸光度をマイクロプレートリーダー（VERSAmax, Molecular Devices, LLC）によって測定した。サーファクタントタンパク質-D（SP-D）の血清中濃度をRat/Mouse SP-D kit YAMASA EIA（ヤマサ醤油株式会社）を用いてアッセイし、吸光度をマイクロプレートリーダー（VERSAmax, Molecular Devices, LLC）によって測定した。RNeasy 96 Universal Tissue Kit（Qiagen）を使用説明書に従って使用し、肺の全RNAを単離した。One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit（タカラバイオ社）およびABI PRISM 7900HT Real Time PCR System（Applied Biosystems）を使用してリアルタイムPCRを行った。Takara perfect real time primer pairs（タカラバイオ社）を用いて、ケモカインCcl2（別名：単球走化性タンパク質-1（Mcp-1, MA066003）、インターロイキン-6（IL-6, MA039013）、およびヒポキサンチンホスホリボシルトラ

ンスフェラーゼ (Hprt, MA031262) の遺伝子発現を分析した。定量は、Hprt をハウスキーピング遺伝子として用いた比較CT (cycle threshold) 法によって行った。エンドセリン1 (ET-1) の血清中濃度をQuantikine Endothelin-1 (R&D systems) を用いてアッセイし、吸光度をマイクロプレートリーダー (VERSAmax, Molecular Devices, LLC) によって測定した。

[0044] BLM誘発SScマウスモデル：治療評価

6～7週齢のメスのC57BL/6マウス (チューリッヒ大学Laboratory Animal Service Center) を使用し、全ての動物実験を、実験動物の管理と使用に関する欧州共同体審議会指令 (European Community Council Directive for Care and Use of Laboratory Animals) およびスイス法に従って行った。BLM (Baxter AG) を生理食塩水に溶かし、1日おきに上背部の決まった領域に6週間 (1日目～42日目) 皮下投与 (個体あたり0.1 mg/0.1 mL) した。実験期間の最後の3週間 (22日目～42日目) は、マウスに化合物A、イマチニブ (Selleckchem)、または溶媒を1日1回経口投与した。43日目にマウスをCO₂吸入によって安楽死させ、背部皮膚および血清試料を採取した。

マウス皮膚試料を4%ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色のため、マウス皮膚の切片を使用した。脱パラフィン後、マイヤーヘマトキシリン溶液 (J.T. Baker/Stehelin) で10分間処理した。エオジン (Chroma/Reactolab) 染色を1分間行った。永久封入のため、切片を脱水および乾燥し、その後、Pertex (Histolab) を用いて封入した。HE染色した皮膚試料の厚みを顕微鏡と画像解析プログラム (Zeiss Imager Z1, Carl Zeiss AG) によって測定し、皮膚の厚みを決定した。皮膚の厚みは、HE染色したマウス皮膚試料片をそれぞれ100倍の倍率で撮影した重複しない像からランダムに3レコード選択して測定した (全部で試料あたり6画像、18測定)。分析は、独立の2名の検査員によって盲検的に行った。皮膚の厚みの各数値は36の測定値の平均として算出した。

α 平滑筋アクチン (α SMA) 染色を皮膚切片に対して行った。脱パラフィンおよび再水和後、10%ヤギ血清 (Vector Laboratories) を用いて非特異的抗

体結合を防止した。試料を一次抗体（1:750、モノクローナルマウス抗 α SMA、クローン1A4、Sigma-Aldrich）とともに1時間室温でインキュベートし、次いでアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗マウス二次抗体（Dako）とともに30分間室温でインキュベートした。Vector Red（Vector Laboratories）を使用して染色を行った。核の対比染色を、マイヤーヘマトキシリン（J.T. Baker）を用いて行った。永久封入のため、切片を脱水および乾燥し、その後、Pertex（Histolab）を用いて封入した。皮膚内の α SMA陽性筋線維芽細胞数を、顕微鏡と画像解析プログラム（Zeiss Imager Z1）を使用して手作業で測定した。マウス皮膚内の α SMA陽性筋線維芽細胞の計数を6枚のスライドに対して行い、その際、400倍の倍率で、マウス皮膚の、ランダムに選択された重複しない6つ領域（ $172.5 \times 218 \mu\text{m}$, $37,605 \mu\text{m}^2$ ）を各スライドに対して記録した。分析は、独立の2名の検査員によって盲検的に行った。 $37,605 \mu\text{m}^2$ の領域中の α SMA陽性筋線維芽細胞数は、12の計数値の平均として算出した。

皮膚切片のマッソントリクローム染色を行った。脱パラフィン後、切片を、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン溶液に3分間、ポンソー・フクシン・アゾフロキシシン（Ponceau-fuchsin-azophloxin）混合液に6分間、さらに、2%Orange G中の3%リンモリブデン酸に3分間、またはコラーゲンが脱色されるまで曝露した。永久封入のため、切片を脱水および乾燥し、その後、Pertex（Histolab）を用いて封入した。マッソントリクローム染色した切片の観察を、顕微鏡と画像解析プログラム（Zeiss Imager Z1）を使用して100倍の倍率で行った。

[0045] マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析

1) Agilent Expression Arrayを用いた遺伝子発現プロファイリング：

BLM誘発SScモデル（予防評価）から得られた、PBS_溶媒（非発症コントロール群）、BLM_溶媒（発症コントロール群）、およびBLM_化合物A（0.3 mg/kg）のマウス肺組織試料の全RNAを用いて分析を行った。前記RNA試料の純度、濃度、および品質を、NanoDrop 2000（Thermo Fisher Scientific）およびAgilent 2100 bioanalyser（Agilent Technologies）を用いて確認した。そ

の後、Low Input Quick Amp Labeling Kit, one-color (Agilent Technologies) を用いてRNAをCy3標識した。標識されたcRNA試料を断片化し、Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies) を用いてAgilent SurePrint G3 Mouse GE v2 8×60K Microarray (Agilent Technologies) とハイブリダイズした。ハイブリダイゼーション後、前記マイクロアレイをGene Expression Wash Buffers Pack (Agilent Technologies) で洗浄し、スキャナーを用いて画像化し、シグナルを検出した。シグナル強度をAgilent Feature Extraction software 12.0を用いて評価した。

[0046] 2) バイオインフォマティクス分析：

本研究のバイオインフォマティクス分析は、GeneSpring GX 14.9.1、IPA 2019 autumn、およびMicrosoft Excel 2010を用いて行った。PBS_溶媒群と比較してBLM_溶媒群で2倍以上の変動があり、モデレーテッド (moderated) t検定で p 値 <0.05 を満たした遺伝子を「発現変動遺伝子 (differentially expressed genes ; DEGs)」と定義した。DEGsのうち、逆向きに1.5倍以上の変動があり、BLM_溶媒群と比較した際にモデレーテッド (moderated) t検定で p 値 <0.05 を満たした化合物A処理群の遺伝子を、「化合物A処理によるDEGs」と定義した。DEGsをIPAに入力し、「Canonical pathways」および「Diseases or functions」の2種の計算を行った。本報告では、「Canonical pathways」を「経路 (pathways)」と記載し、「Diseases or functions」を「カテゴリー (category)」と記載する。前者は一連の遺伝子相互作用のためのリストを含み、後者は疾患および生物学的機能と関連したリストである。これらのデータセットはIPAソフトウェアに登録されている。まず、Fisherの正確検定を用いて、遺伝子の2つのセット間の重複の確率を算出した。その後、下流効果分析 (downstream effect analysis) (DSEA) を用いてアクティベーションzスコア (activation z-score) を算出した。DSEAは、遺伝子と機能の間で予測される因果関係をもとに発現パターンの変化の方向 (活性化または阻害) を予測するための技術である。DSEA分析の結果に基づき、SScの発症に関与する可能性がある細胞種 (マクロファージ、好中球、単核白血球、Tリンパ球、

Bリンパ球、平滑筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、および線維芽細胞）を抽出した。次いで、SScの発症に関与する、炎症・免疫異常、血管機能障害、および線維化などの、生物学的機能および分子シグナル伝達経路に関する情報を抽出した。

[0047] 血清タンパク質プロファイリング

BLM誘発SScモデル（治療評価）のマウスから血清試料を得た。生理食塩水_溶媒（非発症コントロール群）、BLM_溶媒（発症コントロール群）、BLM_化合物A（10 mg/kg）、およびBLM_イマチニブ（150 mg/kg）の各群からの試料を用いて分析を行った。Luminexアッセイ（R&D systems）を用いて110種のタンパク質を調べた（付表s1）。次の基準のいずれかを満たすタンパク質を分析した：i) 全ての試料が定量的な範囲内で適切に測定された；ii) 一部試料が定量範囲外であったが、1つ以上の群において半数例以上の試料が定量された。

[0048] 皮膚生検試料と線維芽細胞単離（線維芽細胞アッセイ）

dcSSc患者の皮膚病変部位から、全層皮膚生検試料を得た。前記患者は、Leeds Institute of Rheumatic and Musculoskeletal Medicine（英国）内の全身性強皮症クリニックから募集した。健常ドナーから対照皮膚試料を得た。全てのdcSSc患者および健常ドナーからは、ノースイースト研究倫理委員会（North-East Research Ethic committee）によって承認された、stratification for risk of progression in scleroderma；STRIKE SSC）を介して、書面によるインフォームドコンセントを得た。SSc患者は、SScに対する2013 ACR/EULAR 分類基準を満たし、LeRoy and Medsger基準に従ってdcSScを有するものと分類された。

健常ドナーおよびSSc患者の皮膚生検試料から皮膚線維芽細胞を単離した。この皮膚生検試料をメスでミンスし、プラスチック製培養皿に入れ、4.5 g/Lのグルコース（Thermo Fisher Scientific）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）に20%ウシ胎仔血清（FCS, Thermo Fisher Scientific）、1%ペニシリンおよびストレプトマイシン（Merck）、および1 μ g/mlのアンフォテ

リシン (Thermo Fisher Scientific) を加えたもので覆い、37℃にて5% CO₂の湿潤雰囲気中で培養した。アンフォテリシン無しの増殖培地を3日後に追加した。7日後、培地を10%FCSを含む培地と入れ替え、その後、2～3日ごとの補充を行った。細胞の増殖を視認後、前記線維芽細胞を継代した。簡単に述べると、0.1% EDTAを含むPBS中で細胞を5分間インキュベートし、次いで、トリプシン-EDTA溶液 (Merck) で細胞を剥離し、10% FCSならびに1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えたDMEM (1 g/Lグルコース) 中で、70～80%コンフルエントになるまで培養した。次の継代後、初代細胞をヒトテロメラーゼ逆転写酵素を用いてレトロウイルス媒介で不死化した。

[0049] 線維芽細胞の処理

6穴培養プレートにおいて、10% FCSを加えたDMEM中で細胞をコンフルエントになるまで増殖させ、DMEM 1% FCS中で24時間血清飢餓培養し、その後、形質転換増殖因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, 10 ng/mL) (Sigma-Aldrich) の存在下または不在下で24時間インキュベートした。

TGF- $\beta 1$ 刺激の際、化合物Aまたは α -MSHを培地に加えた。細胞に対してDMSOが誘導する効果を標準化するために、DMSO (0.1%) を全ての化合物A不含ウェルに加えた。

[0050] RNA単離およびリアルタイムPCR分析 (線維芽細胞アッセイ)

Zymo quick RNA mini prep kit (Zymo Research Corporation) を使用説明書に従って使用し、全RNAを抽出した。第1鎖cDNAを、High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて合成した。SYBR Green RT-PCR Mastermix Kit (Thermo Fisher Scientific) およびABI PRISM 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、定量RT-PCRをトリプリケイトで行った。定量は、GAPDHをハウスキーピング遺伝子として用いた比較CT (cycle threshold) 法によって行った。qPCR分析で用いたプライマー配列は次のとおりである: GAPDH forward 5' -ACC CAC TCC TCC ACC ACC TTT GA-3' (配列番号1), reverse 5' -CTG TTG CTG TAG CC A AAT TCG T-3' (配列番号2); ACTA2 forward 5' -TGT ATG TGG CTA TCC

AGG CG-3' (配列番号3), reverse 5' -AGA GTC CAG CAC GAT GCC AG-3' (配列番号4); およびCOL1A1 forward 5' -GCT CCG ACC CTG CCG ATG TG -3' (配列番号5), reverse 5' -CAT CAG GCG CAG GAA GGT CAG C-3' (配列番号6)。

[0051] 皮膚生検試料 (MC1Rの免疫組織化学的分析)

dcSSc患者 (n=50) または限局皮膚硬化型SScに罹患した患者 (lcSSc, n=10) の皮膚病変部位から、全層皮膚生検試料を得た。これら患者は、University of Erlangen-Nuremberg (ドイツ) から募集した。健常ドナーから対照皮膚試料 (n=30) を得た。全てのdcSSc患者および健常ドナーからは、研究機関の倫理委員会によって承認された書面によるインフォームドコンセントを得た。SSc患者は、SScに対する2013 ACR/EULAR分類基準を満たし、LeRoy and Medsger基準[23]に従ってdcSScを有するものと分類された。

[0052] MC1Rの免疫組織化学的分析

パラフィン包埋切片の免疫組織化学的分析を行った。

1) 単染色

皮膚生検試料中のMC1Rのタンパク質発現を、抗MC1Rモノクローナル抗体 (1:50, clone EPR6530; Abcam) とのインキュベーションによって検出した。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ二次抗体 (Dako) を二次抗体として使用した。アイソタイプが一致した抗体を対照として用いた。染色を、3,3'-ジアミノベンジジン (Sigma-Aldrich) およびペルオキシダーゼ基質溶液 (Sigma-Aldrich) で可視化した。核の対比染色を、マイヤーヘマトキシリン (J.T. Baker) を用いて行った。永久封入のため、切片を脱水および乾燥し、その後、Pertex (Histolab) を用いて封入した。各染色細胞型と組織エレメントの識別後に、染色強度に基づいてスコアを割り当てることにより、定性的評価を行った (陽性細胞の数はスコアリングの際に考慮しなかった)。評価に使用した染色強度スケールは次の通りである: 染色されなかった場合は0点とし、わずかに染色された場合は0.5点とし、薄く染色された場合は1点とし、中程度に染色された場合は2点とし、濃く染色された場合は3点とした。

[0053] 2) 二重染色

皮膚においてMC1R陽性であった細胞種を識別するため、目的の細胞種に対する二重染色を行った。抗MC1Rモノクローナル抗体を上記と同様に反応させた。Alexa Fluor 488標識ロバ抗ウサギ二次抗体 (Life Technologies) を二次抗体として用いた。次に、下記の細胞特異的マーカーに対する抗体を用いて二重染色を行った：線維芽細胞に対する抗プロリル-4-ヒドロキシラーゼ β 抗体 (1:50, Acris Antibodies)、単球・マクロファージに対する抗CD68抗体 (1:200, Biolegend)、好中球に対する抗CD66b抗体 (1:250, Biolegend)、および内皮細胞に対する抗CD31抗体 (1:50, R&D Systems)。Alexa Fluor 594 (Invitrogen) で標識した抗体を二次抗体として用いた。核の対比染色のため、4',6'-ジアミノ-2-フェニルインドール (Sigma-Aldrich) を用いた。免疫蛍光染色した組織切片を、Nikon Eclipse 80i顕微鏡 (Nikon) を用いて分析した。

[0054] 統計解析

全ての定量的な薬理学的データは、平均±標準誤差 (SEM) として表した。各研究における群間の統計的な差異を以下のように評価した。全ての解析はSASシステムを用いて行い、検定は両側で <0.05 の有意水準、または片側で <0.025 の有意水準にて行った。

[0055] 1) BLM誘発SScマウスモデル：予防評価

PBS_溶媒 (非発症コントロール群) およびBLM_溶媒 (発症コントロール群) の群間の差異を、Studentのt検定で分析した。また、BLM_溶媒および化合物A処理の群間の差異を、Williamsの検定で分析した。反復測定分散分析 (グループ効果 (group effect) および相互作用効果 (interaction effect) ; 群×時点) によれば、29日間の実験過程で、上述の群において体重に有意差があった ($P<0.01$)。そのため、各時点の体重の差異を、PBS_溶媒およびBLM_溶媒の群間でStudentのt検定により分析した。また、BLM_溶媒および化合物A処理の群間の差異をWilliamsの検定により分析した。

[0056] 2) BLM誘発SScマウスモデル：治療評価

生理食塩水_溶媒（非発症コントロール群）およびBLM_溶媒（発症コントロール群）の群間、ならびに、BLM_溶媒およびイマチニブ処理の群間の差異を、Wilcoxon検定（両側）を用いて分析した。また、BLM_溶媒および化合物A処理の群間の差異を、Shirley-Williams多重比較検定（片側）を用いて分析した。

3) 血清タンパク質プロファイリングの分析

生理食塩水_溶媒およびBLM_溶媒の群間、BLM_溶媒および化合物A処理の群間、ならびに、BLM_溶媒およびイマチニブ処理の群間の差異を、Studentのt検定で分析した。

[0057] 結果

BLM誘発皮膚線維化および肺炎症に対する化合物Aの効果：予防評価

BLM誘発SScモデル（予防評価）を用いて、皮膚線維化および肺炎症に対する化合物Aの効果の評価した。我々は高用量BLMの連日皮下注射が皮膚線維化だけでなく肺炎症も誘発することを見出し、両者のエンドポイントの同時評価のための実験条件を次のように最適化した：0日目～25日目においてBLM（0.15 mg/個体）を1日1回皮下注射した；0日目～28日目において化合物Aを1日1回経口投与した；そしてその後、エンドポイントを29日目に測定した（図1A）。BLMの皮下注射は0日目～29日目においてマウスの体重を減少させたが、これは ≥ 0.3 mg/kgの化合物Aによって有意に改善された（図1B）。BLMの皮下注射は皮膚線維化の進行を意味する皮膚のコラーゲン含量を有意に増加させた。（図1C）。同様に、BLM注射は、肺炎症の進行を意味するSP-D（II型肺胞上皮細胞が分泌する肺傷害マーカー）の血清濃度、左肺の湿重量、肺におけるケモカインCcl2/Mcp-1およびIL-6 mRNAの発現、ならびにET-1の血清中濃度を有意に増加させた。（図1D～H）。これらの増加は ≥ 0.3 mg/kgの化合物Aによって有意に阻害された（図1C～H）。以上の結果は、化合物Aの予防投与によって、皮膚線維化および肺炎症の両者の進行が同一用量範囲で用量依存的に阻害されたことを示す。

[0058] BLM誘発皮膚線維化に対する化合物Aの効果：治療評価

BLM誘発SScモデル（治療評価）を用いて、化合物Aの治療効果を評価した。予防評価のための上述のBLMモデルと比較して低用量のBLMを1日おきに注射することによって、緩い条件で6週間にわたり徐々に皮膚線維化を誘導した。BLM（0.1 mg/個体）を6週間にわたり1日おきに皮下注射し、実験期間の後半の3週間はマウスに化合物A、イマチニブ、または溶媒を1日1回経口投与した。第2群にはBLMを3週間注射した後に3週間生理食塩水を注射し、薬剤投与開始時の線維化状態を反映した群として設定した（図2A）。BLMの6週間の皮下注射によって、皮膚の厚み（図2B）、および真皮における α SMA陽性筋線維芽細胞数（図2C）が有意に増加した。マッソントリクローム染色により、BLM注射後の真皮内の高密度のコラーゲン繊維の蓄積と真皮白色脂肪組織の減少とが観察された（図2D）。6週間のBLM注射では、3週間のBLM注射後に生理食塩水の注射をさらに3週間行う場合と比較して、皮膚線維化の重症度が増加する傾向であった。BLMによって誘発された皮膚の厚みおよび α SMA陽性筋線維芽細胞の増加は、3および10 mg/kgの化合物Aによって有意に阻害された（図2BおよびC）。化合物Aは、BLMに誘発された真皮白色脂肪組織の減少を阻害した（図2D）。同様に、陽性対照として用いたチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブも150 mg/kgでこれらのパラメータを改善した。化合物A処理群におけるこれらのパラメータの値は、3週間のBLM処理と3週間の生理食塩水処理とを行った第2群とほぼ同一であった。このことは、化合物Aが実験期間の後半の3週間で起こる線維化の進行をほぼ完全に阻害したことを示す（図2B～D）。これらの結果は、化合物Aが、既に皮膚線維化が部分的に誘発された後に薬物療法を行った場合であっても、その線維化の進行を抑制することを証明した。

[0059] マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析による、化合物Aの作用メカニズムの解析

化合物Aの作用メカニズムを調べるため、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。マウス肺組織試料のDNAマイクロアレイ分析のためのデータを、前記BLM誘発SScモデル（予防評価）から得た。前記疾患モデルにおけ

るDEGsの数は3337であり、化合物A処理によるDEGsの数は1477であった。主成分分析では、PBS_溶媒、BLM_溶媒、および化合物A処理群が明確に異なるクラスターに分離することが示された（図3A）。

IPAソフトウェアを用いた分析の結果を以下に記す。SScの病態に関連した細胞種に着目した分析で、BLM_溶媒または化合物A等処理群でのzスコアの絶対値が ≥ 2 であったカテゴリーを図3Bに列挙する。マクロファージ、単核白血球（単球）、および好中球と関連した多数のカテゴリーが抽出され、次いで内皮細胞関連カテゴリーが抽出された。従って、これらの細胞が、BLM誘発SScモデルにおける化合物Aの主要な標的細胞であることが示唆される。Tリンパ球および内皮細胞関連カテゴリーはBLMによっては変化しなかったが、化合物Aによって抑制された。Bリンパ球および線維芽細胞関連カテゴリーで前記抽出基準を満たしたものは無かった。生物学的機能に着目した分析においては、炎症反応（炎症と関連）、抗原提示細胞の活性化（免疫異常と関連）、血管新生、アテローム性動脈硬化、脈管形成、および血管閉塞（血管機能障害と関連）のカテゴリーがBLMによって活性化され、化合物Aによって抑制された（図3C）。分子シグナル伝達経路に着目した分析においては、triggering receptor expressed on myeloid cells-1; TREM1、IL-6、オンコスタチンM（炎症と関連）、およびペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（PPAR）（線維化と関連）の経路が全て化合物Aの影響を受けていた（図3D）。

IL-6シグナリングについて、IL-6シグナル伝達経路を構成する各遺伝子の遺伝子発現の変化を図3Eに示し、パスウェイ・マップ（図3F）上に可視化した。化合物Aは、IL-6経路の上流の関連遺伝子（IL-6の発現に関与）であるか下流（IL-6に対して応答する遺伝子）であるかに関わらず、BLMによって誘発された遺伝子発現の変動を逆方向に変化させた（図3EおよびF）。IL-6情報伝達経路の構成遺伝子の中でも、IL-6遺伝子自身の発現がBLMによって著しく上方制御され、化合物Aによって最も下方制御されていた（図3EおよびF）。

[0060] 血清タンパク質プロファイリングによる、化合物Aのバイオマーカー解析

化合物Aの血清バイオマーカーを探索するため、BLM誘発SScモデル（治療

評価) から得た血清試料を用いて血清タンパク質プロファイリングを行った。全部で110種の血清タンパク質プロファイルをLuminexアッセイによって調べた(測定した因子を補足資料、表s1に列挙する)。測定した110種のタンパク質のうち、67種が材料と方法に記載した分析基準を満たしていた。アディポネクチン、シスタチンC、増殖分化因子-15 (GDF-15)、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) -2、MMP-3、オステオプロテゲリン、P-セ렉チン、S100A9、腫瘍壊死因子受容体I (TNFRI)、TNFRII、および組織性メタロプロテイナーゼ阻害因子-1 (TIMP-1) の濃度がBLMによって有意に上昇し、化合物Aはこれらの上昇を有意に抑制した(図4)。

[0061] ヒト線維芽細胞活性化に対する化合物Aの効果

次に、皮膚線維芽細胞に対する化合物Aの抗線維化効果を調べるため、TGF- β 刺激によって誘導されたACTA2、およびCOL1A1 mRNA発現に対する、化合物Aの効果の評価した。健常ドナー由来皮膚線維芽細胞を24時間の血清飢餓培養後にTGF- β 含有培地中で24時間の培養を行ったところ、ACTA2およびCOL1A1のmRNA発現の著しい増加が見られた。化合物Aは、TGF β で誘導されたACTA2 mRNAの増加を濃度依存的に阻害したが、COL1A1のmRNA発現には効果がなかった(図5A)。ただし、タンパク質レベルでは阻害作用を示すことが推測される。同様な傾向が、MC1Rの内因性リガンドである α -MSHを用いた処理でも観察された。さらに、SSc患者に由来する皮膚線維芽細胞に対する、化合物Aおよび α -MSHの効果の評価を行った。化合物Aおよび α -MSHは、SSc患者由来の線維芽細胞および健常ドナー由来の線維芽細胞の両者において、TGF- β に誘導された α SMAのmRNA発現の増加を1000 nmol/Lの濃度で抑制した(図5B)。これらの結果は、化合物Aが、TGF- β によって誘導された線維芽細胞活性化を抑制することによる抗線維化効果を有することを示唆している。

[0062] ヒト皮膚のMC1Rの免疫染色による、化合物Aの標的分子の発現解析

健常ドナーおよびSSc患者の皮膚生検試料におけるMC1Rの存在を調べるため、免疫組織化学的解析を行った。ドナーの特徴を表1に示す。単染色においては、MC1R免疫反応性が、主にdcSSc患者皮膚の線維芽細胞/単核球、血管、お

よび表皮に観察された（図6）。定性的評価のため、MC1Rの免疫反応性を下記の4つのカテゴリーで別々にスコア化した：全領域、血管、表皮、および線維芽細胞／単核球（線維芽細胞と単核球は単染色では区別できないため、区別せずに分析した）。MC1R陽性は、健常ドナー30名のうち24名、dcSSc患者50名のうち40名、およびlcSSc患者10名のうち9名で観察された。染色強度のMC1Rスコアは、健常、dcSSc、およびlcSSc患者の間で、4つの全てのカテゴリーにおいて類似していた（表2）。さらに、MC1Rスコアと改変ロドナン皮膚スコア（modified Rodnan skin score ; mRSS）との間には、いずれの組織カテゴリーにおいても明確な相関性がみられなかった。これらの結果は、MC1Rの発現が、疾患活動性に関わりなく、SSc患者に高頻度で見られたことを示す。

dcSSc患者におけるMC1R陽性細胞の細胞種を決定するため、MC1Rを細胞特異的のマーカールと共染色する二重染色プロトコルを用いた。MC1R陽性細胞は主に単核・マクロファージであり、また、線維芽細胞、内皮細胞、および好中球で比較的弱い染色が見られた（図6B）。

[0063] [表1]

表 1. 皮膚免疫組織化学分析における SS c 患者の臨床的特徴

臨床情報	健常	dcSSc	lcSSc
総数	30	50	10
性別（女性：男性）	21:9（70%：30%）	35:15（70%：30%）	8:2（80%：20%）
人種	白人（100%）	白人（100%）	白人（100%）
年齢（歳）*	46.7 ± 13.3	45.5 ± 11.9	61.2 ± 9.4
mRSS*	－	19.1 ± 4.4	8.1 ± 1.9
罹病期間（年）*	－	3.2 ± 2.2	7.7 ± 3.8
DMARD 療法	－	12（24%）	1（10%）
CRP 上昇	－	18（36%）	0（0%）
抗 Scl-70	－	15（30%）	0（0%）

他に断りがない限り、数値は絶対数（%）として表記されている。

* 平均±SEM として表記された数値。

略号：dcSSc = びまん型全身性強皮症（diffuse cutaneous systemic sclerosis）；lcSSc = 限局型全身性強皮症（limited cutaneous systemic sclerosis）；mRSS = 改変ロドナン皮膚スコア（modified Rodnan skin score）；DMARD = 疾患修飾性抗リウマチ薬（disease-modifying anti-rheumatic drug）；CRP = C 反応性タンパク質（C-reactive protein）；抗 Scl-70 = 抗トポイソメラーゼ I 抗体（anti-topoisomerase I antibodies）

[0064] [表2]

表 2. 皮膚切片のメラノコルチン-1 受容体 (MC1R) 免疫染色のスコア

IHC (MC1R 染色) 評価	健常	dcSSc	lcSSc
総スコア	0.83 ± 0.13	0.94 ± 0.11	0.65 ± 0.17
脈管スコア	0.70 ± 0.13	0.68 ± 0.08	0.75 ± 0.15
線維芽細胞/単核球スコア	0.70 ± 0.12	0.89 ± 0.10	0.65 ± 0.17
表皮スコア	0.85 ± 0.17	0.83 ± 0.15	0.60 ± 0.19
MC1R 発現の陽性率*	24/30 (80%)	40/50 (80%)	9/10 (90%)

スコアは平均±SEMとして表記されている。(染色なし, 0; わずかに染色, 0.5; 薄く染色, 1; 中程度に染色, 2; 濃く染色, 3)

*数値は絶対数 (%) として表記されている。MC1R 陽性は総スコアが 0.5 以上 (わずかに染色) として定義した。

請求の範囲

- [請求項1] 1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル} ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を有効成分とする、対象における間質性肺疾患を治療または予防するための医薬。
- [請求項2] 間質性肺疾患が、特発性間質性肺炎または膠原病に伴う間質性肺疾患である、請求項1に記載の医薬。
- [請求項3] 間質性肺疾患が、全身性強皮症に伴う間質性肺疾患である、請求項1に記載の医薬。
- [請求項4] 全身性強皮症がびまん皮膚硬化型全身性強皮症である、請求項3に記載の医薬。
- [請求項5] 対象が、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量が健常人よりも増加した患者である、請求項1~4のいずれか一項に記載の医薬。
- [請求項6] 1- {2- [(3S, 4R)-1- {[(3R, 4R)-1-シクロペンチル-3-フルオロ-4-(4-メトキシフェニル)ピロリジン-3-イル]カルボニル}-4-(メトキシメチル)ピロリジン-3-イル]-5-(トリフルオロメチル)フェニル} ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を有効成分とする、対象における全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を治療または予防するための医薬であって、該疾患または症状が皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである、

- 医薬。
- [請求項7] 対象がびまん皮膚硬化型全身性強皮症患者である、請求項6に記載の医薬。
- [請求項8] 対象が、P-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量が健常人よりも増加した患者である、請求項6または7に記載の医薬。
- [請求項9] 1 - {2 - [(3S, 4R) - 1 - {[(3R, 4R) - 1 - シクロペンチル - 3 - フルオロ - 4 - (4 - メトキシフェニル) ピロリジン - 3 - イル] カルボニル} - 4 - (メトキシメチル) ピロリジン - 3 - イル] - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル} ピペリジン - 4 - カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶を有効成分とする、対象におけるP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を低下させるための医薬。
- [請求項10] 対象が間質性肺疾患を呈する対象である、請求項9に記載の医薬。
- [請求項11] 間質性肺疾患が特発性間質性肺炎または膠原病に伴う間質性肺疾患である、請求項10に記載の医薬。
- [請求項12] 間質性肺疾患が、全身性強皮症に伴う間質性肺疾患である、請求項10に記載の医薬。
- [請求項13] 対象が全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を呈する対象であって、該疾患または症状が皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症、嚥下障害、レイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症および腎クリーゼから選択される少なくとも1つである、請求項9に記載の医薬。
- [請求項14] α -MSHまたはそのアナログなどのMC1Rアゴニストを有効成分とする、

全身性強皮症に伴う各種疾患または症状を治療または予防するための医薬であって、該疾患または症状がレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状である、医薬。

- [請求項15] 全身性強皮症患者に対するMC1Rアゴニストの治療有効性を判定する方法であって、全身性強皮症患者由来の試料中のP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を測定する工程を含む方法。
- [請求項16] 全身性強皮症患者がレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリーゼ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状の少なくとも1種類を呈する、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] MC1Rアゴニストが1- {2- [(3S, 4R) -1- { [(3R, 4R) -1-シクロペンチル-3-フルオロ-4- (4-メトキシフェニル) ピロリジン-3-イル] カルボニル} -4- (メトキシメチル) ピロリジン-3-イル] -5- (トリフルオロメチル) フェニル} ピペリジン-4-カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶である、請求項15または16に記載の方法。
- [請求項18] 全身性強皮症患者に対するMC1Rアゴニストの投与の可否を判定する方法であって、全身性強皮症患者由来の試料中のP-selectin、Osteoprotegerin、Cystatin C、GDF-15、ET-1、IL-6、CCL2 (MCP-1)、TNFRI、TNFRII、SP-D、S100A9、Adiponectin、MMP-2、MMP-3、TIMP-1、Collagenおよび α -SMAから選択される少なくとも1つのマーカーの発現量を測定する工程を含む方法。
- [請求項19] 全身性強皮症患者がレイノー現象、指尖潰瘍、肺高血圧症、腎クリー

ぜ、間質性肺疾患、皮膚線維症、屈曲拘縮、胃食道逆流症および嚥下障害からなる群より選ばれる疾患または症状の少なくとも１種類を呈する、請求項１８に記載の方法。

[請求項20] MCR1アゴニストが 1 - { 2 - [(3 S, 4 R) - 1 - { [(3 R, 4 R) - 1 - シクロペンチル - 3 - フルオロ - 4 - (4 - メトキシフェニル) ピロリジン - 3 - イル] カルボニル } - 4 - (メトキシメチル) ピロリジン - 3 - イル] - 5 - (トリフルオロメチル) フェニル } ピペリジン - 4 - カルボン酸もしくはその医薬的に許容しうる塩または共結晶である、請求項１８または１９に記載の方法。