

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-34564

(P2014-34564A)

(43) 公開日 平成26年2月24日(2014.2.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/353 (2006.01)	A 6 1 K 31/353	4 B 0 1 8
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	4 C 0 6 2
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	4 C 0 6 3
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	4 C 0 8 8
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

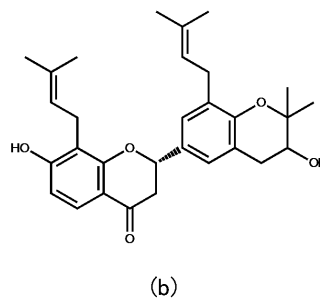
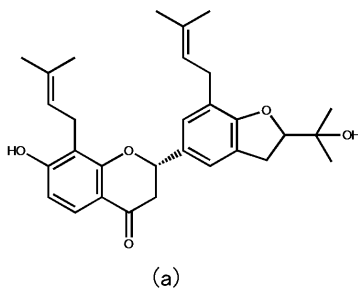
(21) 出願番号	特願2012-177803 (P2012-177803)	(71) 出願人	500175325 学校法人愛知学院 愛知県名古屋市千種区楠元町1丁目100番地
(22) 出願日	平成24年8月10日 (2012.8.10)	(74) 代理人	100118706 弁理士 青山 陽
		(72) 発明者	井上 誠 愛知県名古屋市千種区楠元町1丁目100番地 学校法人愛知学院内
		(72) 発明者	田邊 宏樹 愛知県名古屋市千種区楠元町1丁目100番地 学校法人愛知学院内
		(72) 発明者	石田 幸大 愛知県名古屋市千種区楠元町1丁目100番地 学校法人愛知学院内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 R X Rアゴニスト剤、R X Rアゴニスト剤を含有する食品及び外用剤、並びにR X Rアゴニスト剤を製造するためのサンズコン又はその抽出物の使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】天然物由来であってマグノロールやホーノキオールよりも活性の高いRXRアゴニスト剤の提供。

【解決手段】サンズコンのMeOH抽出物より単離された、下記化学構造式(a)及び/又は(b)で示されるフラバノン誘導体を含有するRXRアゴニスト剤で、RXRアゴニスト活性試験を行ったところ、従来の天然物系における最強のRXRアゴニストであるマグノロールやホーノキオールよりも高い活性を有するRXRアゴニスト剤。



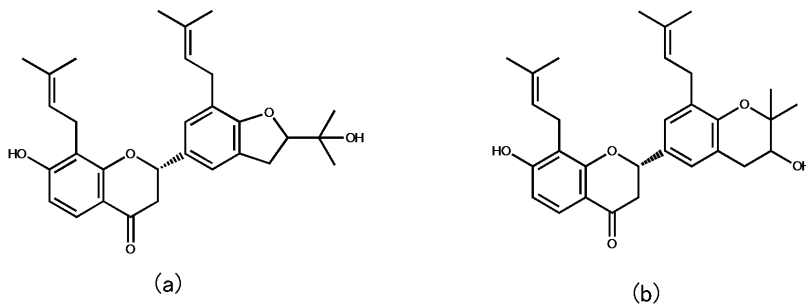
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記化学構造式 (a) 及び / 又は (b) で示されるフラバノン誘導体を含むRXRアゴニスト剤。

【化 1】



10

【請求項 2】

サンズコン又はその抽出物を含むことを特徴とする請求項 1 記載のRXRアゴニスト剤。

【請求項 3】

前記抽出物がアルコール抽出物又は含水アルコール抽出物であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のRXRアゴニスト剤。

20

【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかのRXRアゴニスト剤を含む食品。

【請求項 5】

請求項 1 乃至 3 のいずれかのRXRアゴニスト剤を含む外用剤。

【請求項 6】

RXRアゴニスト剤を製造するためのサンズコン又はその抽出物の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

本発明は、RXRアゴニスト剤、RXRアゴニスト剤を含む食品及び外用剤、並びにRXRアゴニスト剤を製造するためのサンズコン又はその抽出物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

核内受容体は、細胞核内でのDNA転写を調節する受容体であり、その一種にレチノイドX受容体（以下「RXR」という）がある。RXRは他の核内受容体とは異なった特徴を持っており、RXRはRARを始め、PPARs、LXR、VDR、TR等とヘテロダイマーを形成し、数多くの細胞機能を調節していることが知られている。このため、RARは活性化せず、RXRだけを選択的に活性化するレキシノイド（rexinoid）が、RXRとヘテロダイマーを形成する各種の核内受容体の活性調節に有用であると考えられる。こうした考えから、RXRを選択的に活性化

40

アゴニストを探索し、各種の疾患治療へ応用する研究が活発になされている（例えば特許文献 1）。

本発明者らも、RXRのリガンドを漢方生薬から探索し、コウボクの抽出物からRXRに対する特に強いアゴニスト活性を見出している。そしてさらには、その活性成分の化学同定も行い、マグノロール及びホーノキオールがRXRアゴニストであることを見出している（特許文献 2）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特表平 10 - 511950 号公報

50

【特許文献2】特開2009-23961号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

上記マグノロールやホーノキオールは天然物であることから人体親和性が高いと考えられ、人体に対する副作用が低いものと期待される。しかしながら、非天然物のRXRアゴニストであるベキサロテンと比較すれば活性が低い。このため、さらにRXRアゴニストとしての活性が高く、しかもRXRに選択的に作用する天然物由来のリガンドが求められていた。

【0005】

本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、天然物由来であってマグノロールやホーノキオールよりも活性が高く、しかもRXRに対する選択性に優れたRXRアゴニスト剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

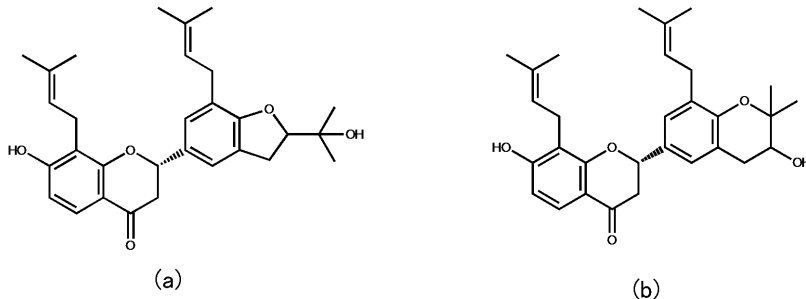
本発明者らは、RXRに対する作用について様々な生薬エキスを調べ、その抽出物及びその成分化合物を探索した。

【0007】

その結果、サンズコン（山豆根）に含まれる2種類のフラボノイドが、RXRに対して選択性に優れ、且つ、強いアゴニスト活性を示すことを見出し、本発明をなすに至った。すなわち、本発明のRXRアゴニスト剤は、下記化学構造式（a）及び／又は（b）で示されるフラバノン誘導体を含有する。

【0008】

【化1】



【0009】

上記フラバノン誘導体（a）及び（b）はサンズコンのメタノール抽出物から分離された。このため、サンズコンやその抽出物をRXRアゴニスト剤として利用することができる。特にサンズコンのアルコール抽出物にはフラバノン誘導体（a）及び（b）が多く含まれるのでRXRアゴニスト剤として好適である。

【0010】

前記の生薬の抽出溶媒としては、例えば、メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、ブタノール、イソブタノール等の低級アルコール及び含水低級アルコール及びプロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール等の多価アルコール及び含水多価アルコール等のアルコール系有機溶媒及び含水アルコール系有機溶媒、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ジオキサソラン、テトラヒドロフラン、アセトン、メチルエチルケトン、ブチルメチルケトン、アセトニトリル、酢酸エチルエステル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム、トリクロロエチレン、四塩化炭素、ベンゼン、トルエン、キシレン、ヘキサソラン等の非アルコール系有機溶媒及び含水非アルコール系有機溶媒、並びに水を挙げることができる。これらの有機溶媒のうち、アルコール若しくは含水アルコールが好ましく、低級アルコール若しくは含水低級アルコールが

10

20

30

40

50

さらに好ましい。

抽出操作は、冷浸、温浸、加熱還流、パーコレーション法などの常法でおこなうことができる。溶媒抽出に代えて、例えば水蒸気蒸留、超臨界抽出法により生薬抽出物を得てもよい。

【0011】

本発明の食品は、前述した本発明のRXRアゴニスト剤を含有する。この食品にはRXRアゴニスト剤が含まれるため、RXRを活性化する効果を有する。

【0012】

本発明の外用剤は、前述した本発明のRXRアゴニスト剤を含有する。この外用剤にはRXRアゴニスト剤が含まれるため、RXRを活性化する効果を有する。

10

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ヒト胎児腎細胞HEK293を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの工程図である。

【図2】各種生薬のMeOH抽出物のRXRアゴニスト活性を示すグラフ。

【図3】サンズコンMeOH抽出物からの各種分画を示す工程図である。

【図4】フラバノン誘導体(a)、(b)及びベキサロテンのRXRアゴニスト活性を示すグラフである。

【図5】フラバノン誘導体(a)及び(b)の核内受容体(PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、LXR、RXR及びPAR)に対するアゴニスト活性を示すグラフである。

20

【図6】フラバノン誘導体(a)及び(b)のRXR/LXR標的遺伝子ABCA1のタンパク質発現を示す電気泳動の写真である。

【図7】マウスマクロファージ様細胞RAW264.7からのコレステロールの排出実験を行うための工程図である。

【図8】マウスマクロファージ様細胞RAW264.7からのコレステロールの排出実験の結果を示すグラフである。

【図9】RXR/RAR標的遺伝子シトクロームP450 26A1のmRNAの発現に及ぼす効果を示すグラフ。

【図10】マウス線維芽細胞3T3-L1を用いた脂肪細胞への分化誘導試験の工程図である。

【図11】マウス線維芽細胞3T3-L1を用いた脂肪細胞への分化誘導試験の前及び後の光学顕微鏡写真である。

30

【図12】脂肪細胞内に蓄積した脂質量を吸光度測定から求めたグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明において「サンズコン」とは、マメ科(Leguminosae)の*Sophora subprostrata* Chun et T.Chen (Leguminosae)の根及び根茎をいう。

また「サンズコン抽出物」とは、上記サンズコンから水、有機溶媒などの溶剤を用いてその成分を溶出した溶液若しくは懸濁液、当該溶液若しくは懸濁液から当該溶剤を濃縮、除去、置換などして製した物をいう。

【0015】

40

また、本発明において「RXRアゴニスト剤」とは、RXRを活性化し、これより標的遺伝子の転写活性に影響を及ぼすものをいう。ここで、「剤」とは、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤などの固形剤、舐剤などの半固形剤、懸濁剤、酒精剤、乳剤、浸剤・煎剤などの液剤、その他製剤上許容される剤形をいう。

【0016】

本発明の食品としては、例えば、パン、米、食肉、食肉加工品、野菜加工品、菓子類、飲料(アルコール飲料を含む。)等を挙げることができる。また、食品には栄養補助食品(サプリメントを含む。)も含まれる。栄養補助食品の場合、粉末、顆粒末、タブレット、ペースト、液体等の形状で提供することができる。食品への添加物として使用する場合、RXRアゴニスト剤の添加量は、食品の用途等により異なる。例えば、治療的又は予防的

50

効果が期待される用途においては、食品を摂取する者の病状、健康状態、年齢、性別、体重などを考慮して適宜決定することができる。

【0017】

RXRアゴニスト剤に関する製剤化は常法により行うことができる。製剤化においては、製剤上許容される他の成分、例えば、担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、生理食塩水などを必要に応じて含有させることができる。賦形剤としては、乳糖、デンプン、ソルビトール、D-マンニトール、白糖等を用いることができる。崩壊剤としては、デンプン、カルボキシメチルセルロース、炭酸カルシウム等を用いることができる。緩衝剤としては、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩等を用いることができる。乳化剤としては、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。懸濁剤としては、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。無痛化剤としては、ベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。安定剤としては、プロピレングリコール、ジエチリン亜硫酸塩、アスコルビン酸等を用いることができる。保存剤としては、フェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン等を用いることができる。防腐剤としては、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。

10

【0018】

RXRアゴニスト剤中における有効成分、即ちフラバノン誘導体(a)及び(b)は、その剤形による制限を受けないが、例えば、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤等の剤形で適宜調製することができ、その含量は、通常これらの剤形により異なるが、所望の効果を達成できるように例えば約0.001重量%~約100重量%とする。

20

【0019】

サンズコンからのフラバノン誘導体(a)及び(b)の単離は、液液分配、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィーなどの分離精製手段を用いておこなうことができる。

【実施例】

【0020】

RXRアゴニストのスクリーニングを行うため、50種類の漢方方剤を選び、ルシフェラーゼ発現系レポーターによるアゴニスト活性を行った。以下、詳細に説明する。

30

(生薬抽出物の調製)

50種類の漢方方剤のメタノール抽出エキスを調製した。即ち、各生薬10gに対しMeOH100mLを加え、一晚冷浸した。この操作を3回繰り返し、抽出液を濃縮乾固し、MeOH抽出物とした。

【0021】

(RXRアゴニスト活性の測定)

上記のようにして得られた様々な生薬のメチルアルコール抽出物について、図1に示す工程により、ヒト胎児腎細胞HEK293を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイによりRXRアゴニスト活性試験を行った。測定においては、RXRに対するルシフェラーゼレポーターアッセイ系を調製し、核内受容体発現プラスミドとレポータープラスミドをリン酸カルシウム法によりHEK293細胞にトランスフェクションし、6時間後にフラバノン誘導体(a)及び(b)(終濃度100µg/ml)を添加して30時間インキュベートした。その後ルシフェラーゼ活性を測定することにより、アゴニスト活性を求めた。また、ポジティブコントロールとして、非天然物系のRXRアゴニストである公知のベキサロテンについても、同様に活性試験を行った。

40

【0022】

その結果、図2に示すように、サンズコンのMeOH抽出物が他の生薬のMeOH抽出物に比べて、著しく高い活性を示すことが分かった。このため、サンズコンのMeOH抽出物に含まれている、RXRアゴニスト活性成分の単離及び同定を行った。以下にその詳細

50

を述べる。

【0023】

(RXRアゴニスト活性成分の単離及び同定)

サンズコンMeOH抽出物について、図3に示す抽出工程を行った。なお、この抽出に使用したサンズコンはSophora subprostrata Chun et T.Chen (Leguminosae)の根及び根茎(株式会社栃本天海堂製 商品名:山豆根(刻)(医療用) 500g 製造番号 020212001である。)

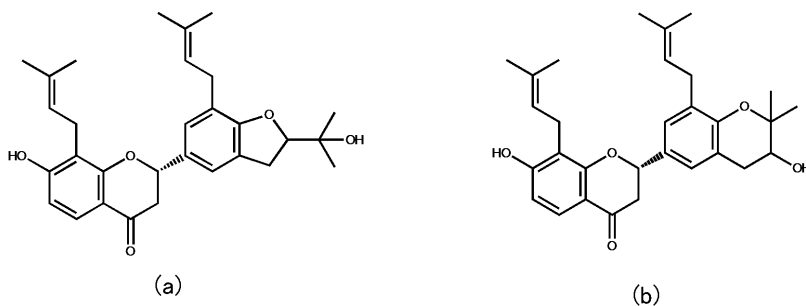
サンズコン500gを分液ロートに入れ、メタノール2Lで5回抽出した抽出液をエバポレータで溶媒を留去させ、MeOH抽出物74.58gを得た。これを、さらに酢酸エチル800mlで3回抽出し、抽出液をエバポレータで溶媒を留去させ、酢酸エチル抽出物15.99gを得た。これを順相オープンカラムクロマトグラフィー(長さ18cm、径4.7cm)でヘキサン:酢酸エチル=1:1、1:3、純MeOHの順で溶出させ、Fr1、Fr2、Fr3に分画した。さらにFr2をエバポレータで溶媒を留去させ、抽出物1628.7mgを得、さらにこれを逆相オープンカラムクロマトグラフィー(長さ11.5cm、径4.7cm)でMeOH:水=3:1、純MeOHの順で溶出させ、Fr2-1、Fr2-2、Fr2-3、Fr2-4に分画した。さらにFr2-3をエバポレータで溶媒を留去させ、抽出物128.8mgを得、これをiHPLC(Develosil c18)アセトニトリル75%水溶液で溶出し、HPLC1, 2, 3に分画した。

【0024】

こうして分画された抽出物について、前述したルシフェラーゼレポーターアッセイによるRXRアゴニスト活性試験を行った。その結果、HPLC1, 2及び3の分画に強い活性が認められた。このため、ほぼ単一成分と認められたHPLC1(5.8mg)及びHPLC3(8.8mg)について¹H NMR及び¹³C NMRを測定した結果、HPLC1は文献(Xing-Nuo Li et al. Magn. Reson. Chem. 2008, 46, 898-902)に記載の下記フラバノン誘導体(a)と完全に一致し、HPLC3は同文献に記載の下記フラバノン誘導体(b)と完全に一致した。また、IRについても測定を行った結果、上記文献値と完全に一致した。以上の結果から、サンズコンMeOH抽出物中のRXRアゴニストはフラバノン誘導体(a)及びフラバノン誘導体(b)であることが分かった。

【0025】

【化2】



【0026】

(フラバノン誘導体(a)及び(b)のRXRアゴニスト活性の測定)

上記のようにして単離したフラバノン誘導体(a)及び(b)について、前述した図1に示す方法と同様の方法により、RXRアゴニスト活性試験を行った。また、ポジティブコントロールとして非天然物系のRXRアゴニストであるベキサロテンも、同様に活性試験を行った。さらには、本発明者らが以前に見出した天然物系のRXRアゴニストであるホーノキオール(以下「HK」と略すことがある)についても、同様に活性試験を行った。

【0027】

結果を図4に示す。図4の左側のグラフはサンズコンから単離したフラバノン誘導体(a)、フラバノン誘導体(b)及びホーノキオール(HK)の活性試験の結果であり、右

側のグラフはベキサロテンの活性試験の結果である。図4の左側のグラフから、フラバノン誘導体(a)及びフラバノン誘導体(b)は、従来知られている天然物系RXRアゴニストの中で最も活性度の強いホーノキオールと比較しても、さらに著しく強い活性を示すことが分かった。また、フラバノン誘導体(a)よりもフラバノン誘導体(b)の方が強いRXRアゴニスト活性を示すことが分かった。これらの活性は、非天然物系RXRアゴニストであるベキサロテンよりは弱いものの、ほぼ同程度の強い活性であった。

【0028】

(フラバノン誘導体(a)及び(b)のRXR以外の核内受容体に対するアゴニスト活性の測定)

フラバノン誘導体(a)及び(b)のRXR以外の核内受容体(PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 、LXR及びPAR)に対するアゴニスト活性についても、RXRアゴニスト活性を測定した方法と同様、それぞれのルシフェラーゼレポーターアッセイ系で検討した。

その結果、図5に示すように、フラバノン誘導体(a)及び(b)ともにRXRを最も強く活性化し、RARは活性化しなかった。このことから、フラバノン誘導体(a)及び(b)は、RXRを選択的に活性化するレキシノイド(rexinoid)であることが分かった。

【0029】

<RXR含有テロダイマー標的遺伝子のタンパク質発現に対する影響>

RXRはいくつかの核内受容体とヘテロダイマーを形成しており、他の核内受容体と異なり、多くの生理活性の調節に関与していることが示唆されている。LXRはコレステロール代謝を介して動脈硬化症に、PPAR β は糖代謝や脂肪細胞への分化を介して肥満・糖尿病などに、RARは制御性T細胞の分化誘導を介して自己免疫疾患などに対する有効性が期待されている。これらパートナー受容体とヘテロダイマーを形成するRXRは多くの生理活性の調節に関与している可能性が考えられ、RXRアゴニストは様々な慢性疾患の予防・治療に有効であると考えられる。

そこで、フラバノン誘導体(a)及び(b)の、RXR含有ヘテロダイマー標的遺伝子のタンパク質発現に対する影響を調べた。対象としたヘテロダイマーはRXR/LXR、RXR/PPAR β 、及びRXR/RARである。

【0030】

(RXR/LXR標的遺伝子であるABCA1のタンパク質発現に対するフラバノン誘導体(a)及び(b)の効果)

フラバノン誘導体(a)及び(b)がRXR/LXRヘテロダイマーを活性化することができるかを、RXR/LXRの標的遺伝子の一つであるABCA1(ATP-binding cassette transporter A1)のタンパク質の発現を、マウスマクロファージ様細胞RAW264.7を用いてウエスタンブロットリング法で調べた。また、比較のために、ホーノキオール(HK)についても同様に調べた。

【0031】

その結果、図6の左側に示すように、フラバノン誘導体(a)及び(b)はそれぞれ単独で、用量依存的にABCA1タンパク質の発現を誘導することが分かった。なお、公知の天然物系RXRアゴニストであるホーノキオール(HK)は、フラバノン誘導体(a)やフラバノン誘導体(b)と比べると、ABCA1タンパク質の発現誘導が弱かった。

さらに、LXRアゴニストであるT0901317(TO)によるRXR/LXR活性化能に及ぼす効果と比較したところ、図6の右側に示すように、TOは0.1、1 μ Mの濃度で単独でABCA1タンパク質を誘導した。また、0.1 μ MのTO共存下では、フラバノン誘導体(a)及び(b)は、ベキサロテン(BEX)あるいはホーノキオール(HK)と同様にABCA1タンパク質を相乗的に強く誘導した。以上の結果から、フラバノン誘導体(a)やフラバノン誘導体(b)は、TOのRXR/LXR活性化能を増大させることが分かった。

【0032】

(マウスマクロファージ様細胞RAW264.7によるコレステロール排出実験)

粥状動脈硬化症の初期の原因である泡沫化細胞は、マクロファージが過剰にコレステロールエステルを蓄積することにより生じる。RAW264.7細胞からのコレステロールの排出は

10

20

30

40

50

、コレステロールのトランスポーターであるABCA1を介して行われる。そこで、図7に示す工程図に従って、in vitroの実験系で、RAW264.7細胞にアセチル化LDLを取り込ませ、泡沫化細胞のモデルを作製した。その後、apoA1を添加して、マクロファージからのABCA1を介したコレステロールの排出能を測定した。細胞内から排出された $[^3\text{H}]$ 標識コレステロールを液体シンチレーションカウンターで測定することにより、細胞内からのコレステロール排出能を評価した。コレステロールの排出量は以下の式によって算出した。なお、試験はLXRアゴニストであるTOを同時に添加する場合についても行った。また、比較のためにベキサロテン(BEX)及びホーノキオール(HK)についても試験を行った。

【0033】

【数1】

$$\text{Cholesterol efflux} = \frac{\text{【Excreted } [^3\text{H}]\text{cholesterol】} \times 100}{\text{【Cellular } [^3\text{H}]\text{cholesterol】} + \text{【Excreted } [^3\text{H}]\text{cholesterol】}} (\%)$$

10

【0034】

その結果、図8に示すように、フラバノン誘導体(a)及びフラバノン誘導体(b)は、ベキサロテン(BEX)やホーノキオール(HK)と同様、コレステロールの排出を促進した。その作用は、 $1\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ と添加量を増すことにより増加した。また、TO存在下においては、その作用はさらに増強された。以上の結果と、前述したABCA1のタンパク質発現に対するフラバノン誘導体(a)及び(b)の効果から、フラバノン誘導体(a)及びフラバノン誘導体(b)がABCA1タンパク質を誘導し、その結果コレステロールの排出を促進するということが明らかになった。

20

【0035】

(RXR/RAR標的遺伝子であるシトクロームP450 26A1のmRNAの発現に対するフラバノン誘導体(a)及び(b)の効果)

RXR/RAR標的遺伝子であるシトクロームP450 26A1のmRNAの発現に対するフラバノン誘導体(a)及び(b)の効果 Maus奇形腫由来F9細胞を用いて調べた。シトクロームP450 26A1 mRNAの発現はリアルタイムPCRで定量した。その結果、図9に示すように、フラバノン誘導体(a)及び(b)及びベキサロテンは、単独でCYP26A1 mRNA量を増加させた。また、RARアゴニストであるall-transレチノイン酸(ATRA)は 1 nM という低濃度でCYP26A1 mRNA量を増加させた。さらに、フラバノン誘導体(a)及び(b)及びベキサロテンは、ATRAと共存させることによりCYP26A1 mRNAの発現誘導を相乗的にさらに増強させた。以上の結果より、フラバノン誘導体(a)及び(b)は、RXR/RARヘテロダイマーも活性化することが分かった。

30

【0036】

(RXR/PPARに対するフラバノン誘導体(a)及び(b)の効果)

RXR/PPARに対するフラバノン誘導体(a)及び(b)の効果を探るため、Maus線維芽細胞3T3-L1を用い、図10に示す工程により脂肪細胞への分化誘導試験を行った。すなわち、3T3-L1細胞を2日培養した後、インシュリン $10\mu\text{g/ml}$ と試料の所定量を添加し、7日間の分化誘導期間を経た後、Oil Red Oで染色して顕微鏡観察を行った。比較のために、ホーノキオール(HK)、ベキサロテン(BEX)及びPPARのアゴニストであり糖尿病の薬として知られているロシグリタゾン(Rosi)についても同様の試験を行った。

40

【0037】

その結果、図11に示すように、フラバノン誘導体(a)及び(b)はBEXやRosiと同程度の、脂肪細胞への分化促進作用が認められた。一方、ホーノキオール(HK)には脂肪細胞への分化促進作用がほとんど認められなかった。また、脂肪細胞内に蓄積した脂質量をadipo redを用いて吸光度を測定して求めたところ、図12に示すように同様の傾向が認められた。

【0038】

<マイクロアレイ法による遺伝子発現実験>

50

フラバノン誘導体 (b) のRXRアゴニストとしての特徴を調べるために、マウス筋管細胞C2C12、及び3T3-L1細胞における単独での遺伝子発現、並びにLXRアゴニストT0901317 (TO) やGW501516 (GW) との共存下における遺伝子発現をマイクロアレイ法により網羅的に調べた。なお、比較のために合成RXRアゴニストであるベキサロテン (BEX) 及び我々が以前に単離した天然物系RXRアゴニストであるホーノキオール (HK) についても調べた。図13にマイクロアレイ法による遺伝子発現実験に用いたアゴニストの組み合わせ及び濃度を示す。

【0039】

マイクロアレイ法によるC2C12細胞に対する遺伝子発現実験の結果を表1に示す。この表は、遺伝子のmRNA発現が2倍以上又は1/2以下となった遺伝子を示したものである。

単独のアゴニストを用いた場合の作用として、ベキサロテン (以下「BEX」という) では、Abca1、Angpl4、Pdk4及びSrebf1を強く誘導したが、フラバノン誘導体 (b) ではAbca1及びAngpl4しか誘導は認められなかった。

また、LXRアゴニストT0を共存させた場合には、BEXはAbca1及びApoDを強く誘導したが、フラバノン誘導体 (b) ではApoDの発現は弱かった。

さらに、注目すべきことにPck2及びRgs2はフラバノン誘導体 (b) で誘導されたが、BEXでは誘導されなかった。

また、脂質の合成に参与するFasnやSrebf1はBEXで誘導され、BEXによる中性脂質異常症の原因になっている可能性が考えられた。これに対して、フラバノン誘導体 (b) ではFasnは誘導せず、Srebf1の発現もBEXより弱かった。

一方、PPAR アゴニストGWを共存させた場合、フラバノン誘導体 (b) はBEXと同様Abca1、Angpl4及びRgs2を強く誘導したが、Hmox1やPck2はフラバノン誘導体 (b) でしか誘導されなかった。

【0040】

以上のように、フラバノン誘導体 (b) は単独又はLXRアゴニストやPPAR アゴニストの共存下で、BEXとは異なった遺伝子発現パターンを示し、RXRアゴニストとしてBEXとは異なった特徴を持つことが明らかになった。

例えば、脂質の合成に参与するFasnやSrebf1については、フラバノン誘導体 (b) はBEXのような強い誘導は認められなかったことから、フラバノン誘導体 (b) はBEXのような脂質異常症などの副作用を引き起こし難い、理想的なRXRアゴニストであることが強く示唆される。このため、フラバノン誘導体 (b) は代謝性疾患、炎症性疾患への応用が期待される。

また、Hmox1の誘導はメタボリックシンドロームの改善に寄与するという報告 (Adipocyte heme oxygenase-1 induction attenuates metabolic syndrome in both male and female obese mice. Burgess A, et al., Hypertension, 56, 1124-1130 (2010)) や、大腸炎等に対する抗炎症作用に寄与するという報告 (Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target for gastrointestinal diseases. Naito Y, et al., J. Clin. Biochem. Nutr., 48, 126-133 (2011)) や、エンドトキシンの感染による炎症系の病気の改善に寄与するという報告 (Endotoxin-induced mortality is related to increased oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficient mice. Wiesel P., et al., Circulation, 102, 3015-3022 (2000)) がある。このため、GW共存下におけるフラバノン誘導体 (b) のみに誘導が認められたという事実は、これらの疾患に対して効くという可能性が強く示唆されている。

また、Angpl4の誘導は内皮細胞障害等の血管系に効き、心不全を改善するという報告 (Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiotensin-like 4. Galaup A., et al., Circulation, 125, 140-149 (2012)) があることから、GW共存下におけるフラバノン誘導体 (b) においてAngpl4の強い誘導が認められたという事実は、血管系の疾患に対しても効果があるという可能性が強く示唆された。

【0041】

10

20

30

40

50

【表 1】

C2C12 microarray data

	BEX	HK	フラボノン誘導体(b)	TO	TO+BEX	TO+HK	TO+フラボノン誘導体(b)	GW	GW+BEX	GW+HK	GW+フラボノン誘導体(b)
Abca1	7.7	0.9	2.4	4.9	22.7	6.9	11.6	1.1	7.3	1.3	3.1
Angpl4	7.5	1.3	4.8	0.8	4.9	1.5	5.0	21.1	30.2	27.7	47.1
ApoD	1.3	0.8	0.5	1.6	27.1	2.3	3.5	0.7	0.9	0.8	0.6
ApoE	1.5	1.0	0.9	1.6	3.7	2.0	2.2	0.9	1.5	1.0	1.2
Cpt1a	1.3	0.7	0.7	0.6	1.0	1.0	1.0	1.6	1.7	1.7	2.1
Fabp3	1.6	0.9	0.8	0.9	1.5	0.9	0.9	0.9	3.1	1.4	2.3
Fasn	1.3	0.8	0.5	1.1	2.3	1.3	0.9	0.7	1.1	0.8	0.6
Hmox1	0.9	0.8	0.8	0.7	0.7	1.0	1.3	1.0	0.9	1.1	2.1
LPL	1.9	1.2	1.5	2.0	5.5	2.8	4.6	1.7	3.0	1.6	3.6
Me2					1.5			1.4	2.4	1.7	2.3
Pck2	0.0	0.9	1.4	1.1	1.0	1.4	2.2	1.2		1.2	3.7
Pdk4	2.5	0.8	1.0	0.7	2.1	1.1	1.4	6.1	11.9	6.5	12.4
Rgs2	0.0	1.1	1.4	1.2		2.1	2.1	1.3	2.0	1.5	2.4
Srebf1	2.5	1.1	1.1	1.8	4.1	2.2	2.4	1.1	2.1	1.1	1.1
Ucp2	1.7	1.0	1.5	0.7	1.2	0.9	1.5	5.1	5.6	5.3	6.7
Vegfa	1.6	0.9	0.9	1.0	2.7	1.2	1.8	0.9	1.4	0.9	1.7
Vldlr	1.5	1.3	1.3	1.4	1.5	1.6	2.0	1.3	1.9	0.9	1.6

BEX: 1 μ M
 HK: 10 μ M
 フラボノン誘導体(b) 10 μ M

TO: 1 μ M

GW: 1 μ M

interesting UP vs. BEX

interesting DOWN vs. BEX

【 0 0 4 2 】

一方、マイクロアレイ法による3T3-L1細胞に対する遺伝子発現実験の結果を表2に示す。この表から、3T3-L1細胞における、フラボノン誘導体(b)単独又はBEX単独における遺伝子発現パターンや、PPAR アゴニストであるロシグリタゾン(RGZ)やLXRアゴニストであるTOの共存下における遺伝子発現パターンは、フラボノン誘導体(b)及びBEXの間にC2C12マウス筋管細胞の場合のような大きな相違はなく、フラボノン誘導体(b)の作用効果は細胞の種類に大きく依存していることが考えられる。

【 0 0 4 3 】

【表 2】

3T3-L1 cell microarray data

	HK	BEX	フラボノン誘導体(b)	RGZ	RGZ/HK	RGZ/BEX	RGZ/フラボノン誘導体(b)	TO	TO/HK	TO/BEX	TO/フラボノン誘導体(b)
ABCA1	1.1	1.3	1.2	0.7	0.6	0.8	0.6	2.4	2.3	4.1	2.8
Acadm	1.2	1.0	1.5	1.4	1.4	1.1	0.9	1.4	1.3	2.0	1.6
Acox			1.9	0.0	0.8	1.5	1.2	1.8	1.8	3.7	3.6
ApoD	0.8	1.1	1.0	0.2	0.1	0.4	0.2	5.4	4.6	10.1	4.5
ApoE	1.1	1.6	0.9	0.4	0.4	0.7	0.4	3.9	3.4	7.3	3.0
Hmox1	0.7	0.9	0.9	0.8	0.9	2.2	1.8	0.9	1.2	2.2	2.5
PDK4	1.0	1.5	1.4	2.4	2.8	5.1	3.9	1.3	1.3	10.0	5.7
Trib3	1.1	1.6	1.8	0.8	0.9	1.0	1.4	1.9	2.0	2.0	2.9

BEX: 0.1 μ M
 HK: 10 μ M
 フラボノン誘導体(b) 10 μ M

RGZ: 0.1 μ M

TO: 1 μ M

x2 vs. TO or RGZ

【 0 0 4 4 】

本発明のRXRアゴニスト剤を使用することにより、RXRの活性化を介して、生活習慣病、慢性疾患の改善を図ることが期待できるとともに、本発明が提供する新規なRXRアゴニストのシード化合物に基づき、従来のシード化合物であるレチノイン酸に基づき合成されてきたその構造類縁体とはその構造が全く異なり、新規な作用効果を有し且つ副作用の少ないRXRアゴニストの構造類縁体の合成が期待できる。

【 0 0 4 5 】

この発明は上記発明の実施形態に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

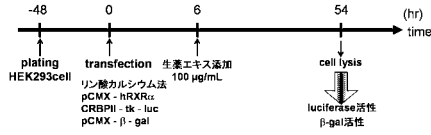
10

20

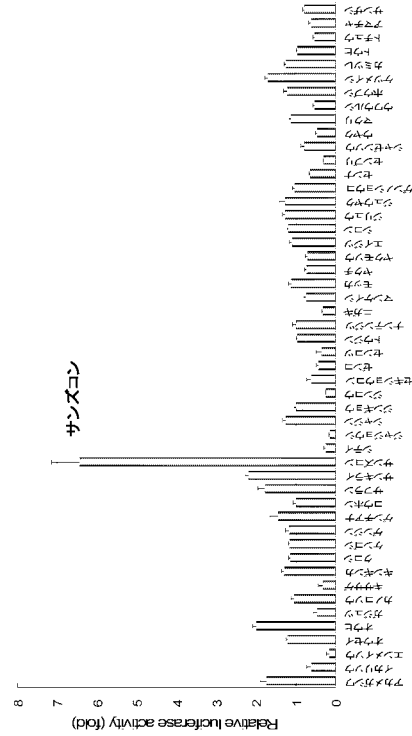
30

40

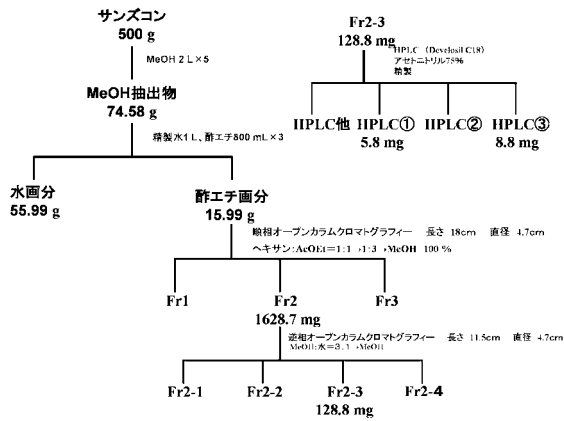
【 図 1 】



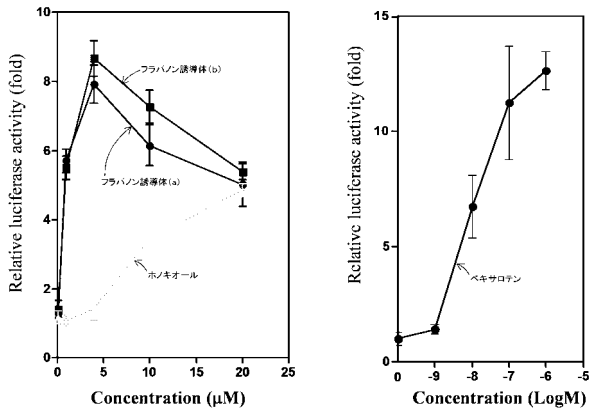
【 図 2 】



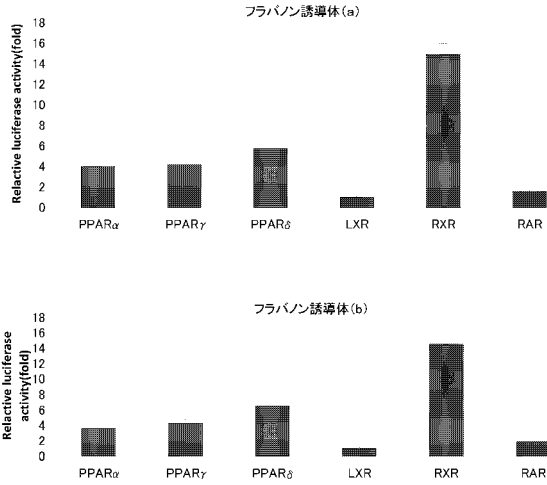
【 図 3 】



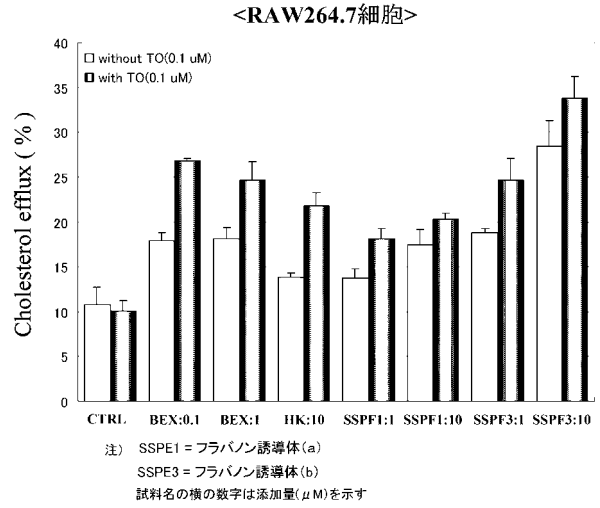
【 図 4 】



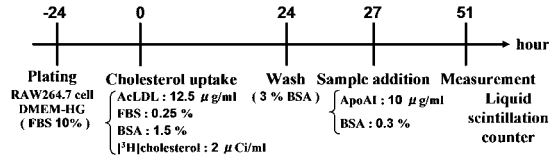
【 図 5 】



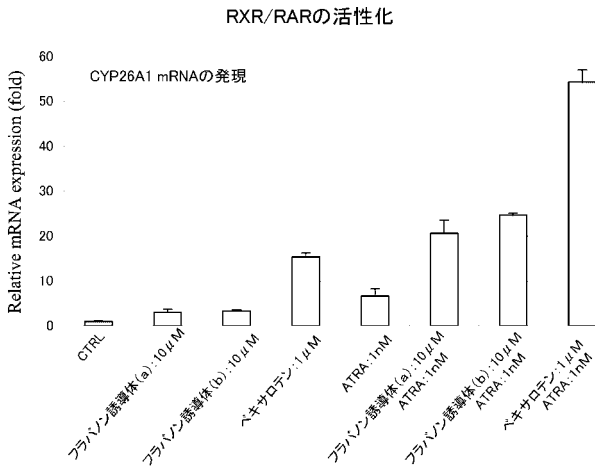
【 図 8 】



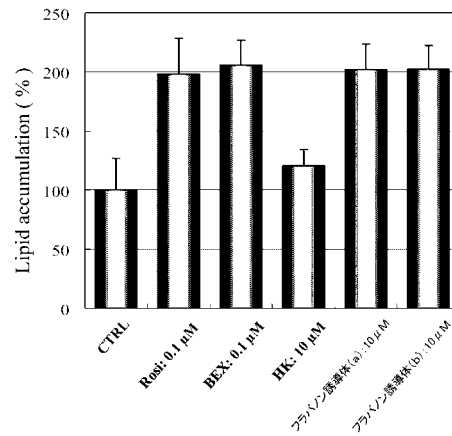
【 図 7 】



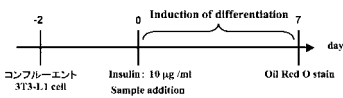
【 図 9 】



【 図 1 2 】

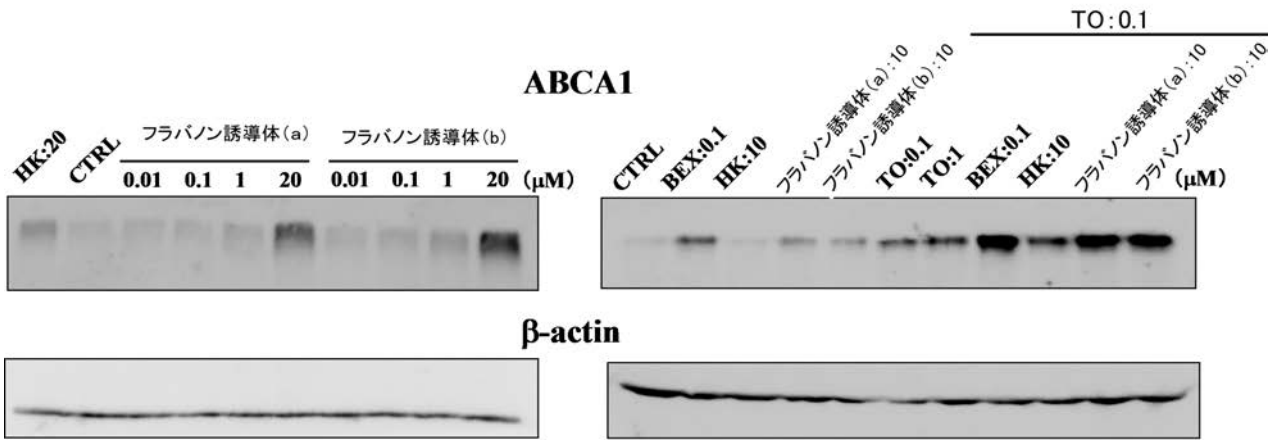


【 図 1 0 】

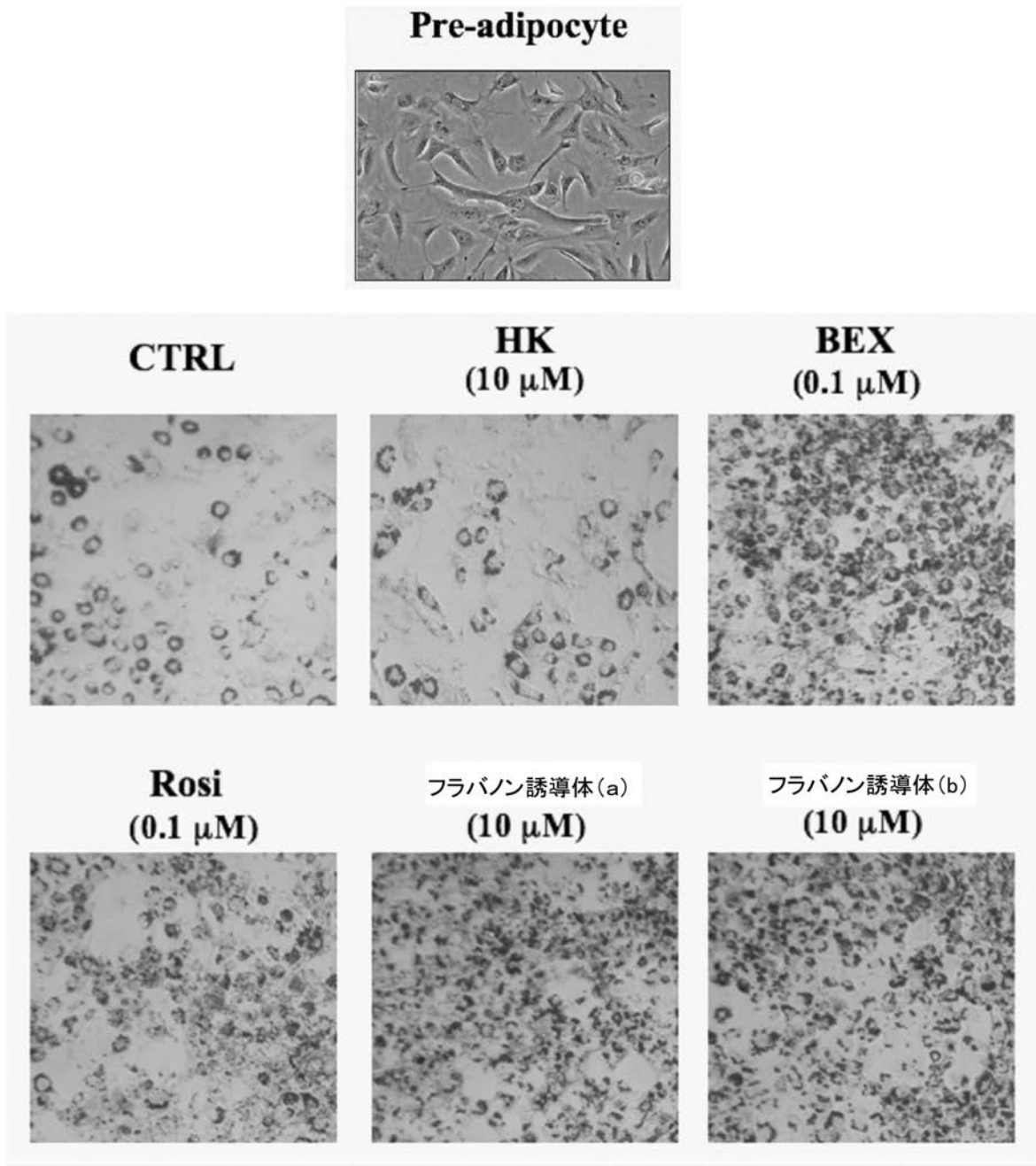


【 図 6 】

RXR/LXR標的遺伝子ABCA1の蛋白質発現に及ぼす効果



【 図 1 1 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 36/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	J
A 6 1 K 36/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/78	X
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	Z
C 0 7 D 407/04 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	B
C 0 7 D 311/48 (2006.01)	C 0 7 D 407/04	
	C 0 7 D 311/48	

(72)発明者 小谷 仁司

東京都新宿区大京町9 - 2 7 大塚ハウス102

Fターム(参考) 4B018 MD08 MD57 ME14 MF01
 4C062 EE49 EE99
 4C063 AA01 BB01 CC79 DD76 EE01
 4C086 AA01 AA02 BA08 GA17 MA01 MA17 MA22 MA23 MA27 MA35
 MA36 MA41 MA43 MA52 NA14 ZA45 ZA70 ZB08 ZC02 ZC35
 ZC41
 4C088 AB59 AC11 AC13 BA08 BA32 CA03 CA14 MA17 MA23 MA27
 MA35 MA36 MA41 MA43 MA52 NA14 ZA45 ZA70 ZB08 ZC02
 ZC35