(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7347744号
(P7347744)

(45)発行日　令和5年9月20日(2023.9.20)

(24)登録日　令和5年9月11日(2023.9.11)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　31/198(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/198
Ａ６１Ｋ　31/194(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/194
Ａ６１Ｋ　31/405(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/405
Ａ６１Ｋ　31/4172(2006.01)		Ａ６１Ｋ	31/4172
Ａ６１Ｐ　1/16 (2006.01)		Ａ６１Ｐ	1/16

ＦＩ

請求項の数　12　（全17頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-568462(P2020-568462)
(86)(22)出願日　平成31年4月2日(2019.4.2)
(65)公表番号　特表2021-529731(P2021-529731A)
(43)公表日　令和3年11月4日(2021.11.4)
(86)国際出願番号　PCT/IB2019/052694
(87)国際公開番号　WO2020/003013
(87)国際公開日　令和2年1月2日(2020.1.2)
審査請求日　令和4年2月16日(2022.2.16)
(31)優先権主張番号　102018000006725
(32)優先日　平成30年6月27日(2018.6.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
イタリア(IT)
前置審査

(73)特許権者　517061897
プロフェッショナル ダイエテティクス エス．ピー．エー．
イタリア国、ミラノ アイ－２０１２９　１／エー、ヴィア シロ メノッティ
(74)代理人　110000877
弁理士法人ＲＹＵＫＡ国際特許事務所
(72)発明者　ジョルジェッティ、パオロ ルカ マリア
イタリア国、２０１２４ ミラノ ４１、ヴィア ファビオ フィルチ
審査官　愛清 哲

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　肝疾患の予防および治療に使用されるアミノ酸を含む組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

哺乳動物におけるアルコール性肝臓疾患（ＡＬＤ）の予防および／または治療に使用するための組成物であって、

前記組成物は活性剤を備え、前記活性剤は、アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシン、および、カルボン酸であるクエン酸、コハク酸、リンゴ酸を有する、

組成物。

【請求項２】

クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総量と、ロイシン、イソロイシン、バリン、リシン、トレオニンの総量との重量比は、０．０５～０．３である、請求項１に記載の組成物。

【請求項３】

クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総量と、ロイシン、イソロイシン、バリンの総量との間の重量比は、０．１～０．４である、請求項１または２に記載の組成物。

【請求項４】

クエン酸と、リンゴ酸およびコハク酸の総量との重量比は、１．０～４．０である、請求項１から３のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項５】

クエン酸：リンゴ酸：コハク酸の重量比は、１０：１：１～２：１．５：１．５である、請求項１から４のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項６】
前記活性剤は更に、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、チロシン、システインからなる群から選択される少なくとも１つのアミノ酸を有する、請求項１から５のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項７】
前記活性剤は更に、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン、および、任意選択的にチロシンを有する、請求項１から６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項８】
クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総モル量と、メチオニン、フェニルアラニン、ヒスチジン、トリプトファンの総モル量との比は１．３５より高い、請求項１から７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項９】
３つのカルボン酸、すなわち、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の総モル量と、リシンおよびトレオニンの総モル量との比は、０．１０～０．７０である、請求項１から８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１０】
クエン酸の重量またはモル量は、リンゴ酸およびコハク酸の両方の総重量または総モル量より高い、請求項１から９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１１】
ロイシンとクエン酸との重量比は、１～５である、請求項１から１０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項１２】
前記組成物は更に、１または複数の種類のビタミンを備える、請求項１から１１のいずれか一項に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本明細書は概して、アミノ酸を含む組成物に関する。より具体的には、本説明は、肝疾患の予防および／または治療に使用されるアミノ酸を含む組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
肝疾患は、例えば、寄生虫およびウイルス、薬剤、毒性物質、アルコール症および喫煙など、様々な好ましくない環境条件によって引き起こされる、最も頻繁に発生する疾患の一種である。それらは、臨床的特徴の悪化が進行する慢性疾患であることが多い。慢性肝疾患は、肝実質の経時的な段階的損傷、炎症反応および脂肪蓄積を特徴とし、多くのケースにおいて、癌の進行の原因となる線維損傷および細胞変質を伴う。したがって、肝臓疾患は、肝臓の進行性臨床障害として、脂肪変性、線維症、肝硬変、および肝細胞癌を含み得る。肝硬変は、急性および慢性の肝疾患の結果であり、肝臓組織が線維性瘢痕組織および再生結節により置き換えられることを特徴とし、肝臓機能の進行的喪失につながる。線維症および結節再生は、肝臓の正常な微視的小葉構築の喪失をもたらす。線維症とは、例えば、感染症、炎症、傷害、更には回復によってもたらされる、瘢痕組織の増殖を意味する。時間の経過と共に、線維性瘢痕組織は徐々に正常機能肝臓組織と置き換わり、肝臓への血流量の減少をもたらし、肝臓は、血流中に存在する栄養、ホルモン、薬剤、および毒物を完全に処理することができなくなる。肝硬変のより一般的な原因は、アルコール症、Ｃ型肝炎ウイルス感染症、毒素の摂取を含み、原因は他にも多く存在する可能性がある。以下で言及されるように、疫学的に肝硬変、および、場合によっては癌に発展する可能性が最も高い障害は、体脂肪の増加、および、関連する肝臓脂肪蓄積である。この脂肪蓄積は、２つの主な臨床状態、すなわちアルコール乱用および肥満に起因し得る。
【０００３】

過剰かつ慢性的なアルコール摂取は、主要な世界的な健康問題であるアルコール性肝臓疾患（ＡＬＤ）を引き起こし得る。ＡＬＤの病理学的特徴は、長期間にわたって進行し、肝脂肪変性、脂肪性肝炎、肝硬変、癌を含む。

【０００４】

エタノール関連の病因には、多くの要因が寄与する。ミトコンドリア障害、活性酸素種（ＲＯＳ）生成、および、脂肪蓄積などの初期事象は、エタノール代謝の直接的な結果と考えられ、ＡＬＤおよび非アルコール性肝臓疾患またはＮＡＦＬＤ（以下を参照）の間で共通する特徴である（Ｍａｎｔｅｎａ　ｅｔ　ａｌ．　２００８）。

【０００５】

アルコールの有害な効果に対する細胞の防衛機構は、あまり理解されていない。エネルギーを得る、または、損傷した細胞構造を除去するために細胞タンパク質および細胞器官を消化する重要な細胞性分解経路であるオートファジーは、ＡＬＤにおいて役割を果たしていると考えられてきたが、これらの機構の理解はまだ断片的である（Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１５）。オートファジーは、肝細胞および非実質細胞（すなわち、マクロファージ、および、肝幹細胞）の両方において重要な機能を果たし、インスリン感受性、脂肪蓄積、肝細胞傷害、および、自然免疫応答に影響すると考えられている。

【０００６】

マウスおよび細胞モデルを用いた近年の研究では、急性エタノール摂取は肝臓におけるオートファジーを活性化させることが示された（Ｄｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．　２０１０；　Ｎｉ　ｅｔ　ａｌ．　２０１３；　Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．　２０１３）。

【０００７】

対照的に、慢性エタノール中毒は、肝臓のオートファジーを抑制する（Ｔｈｏｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．　２０１５；　Ｃｈｏ　ｅｔ　ａｌ．　２０１４）。オートファジーの阻害は、マウスにおいて、エタノールが原因である脂肪変性および肝臓損傷を悪化させることが示された（Ｄｉｎｇ　ｅｔ　ａｌ．　２０１０；　Ｎｉ　ｅｔ　ａｌ．　２０１３；　Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．　２０１３）。

【０００８】

反対に、オートファジーの薬理学的促進は、エタノールが原因である肝臓脂肪変性および肝臓損傷を緩和すると考えられる（Ｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１３）。その結果、オートファジーは、エタノールの細胞毒性効果に対する保護機構とみなされ、ＡＬＤに対する治療薬を開発するためのターゲットとして浮上した。

【０００９】

上記のように、肝臓障害の２番目に主要な原因は肥満であり、肥満は先進国において広く蔓延し、発展途上国においても疫学的に増加しており、いわゆる非アルコール性脂肪肝疾患またはＮＡＦＬＤを引き起こしている。脂肪性肝炎、肝硬変、および肝細胞癌への進行は、世界中でますます多く発生している。この状態に関与する生化学的機構および分子機構は、ＡＬＤにおいて典型的に説明されるものと重なる。

【００１０】

肝疾患の特徴はアミノ酸代謝の変化であり、アルコール摂取および肥満の進行の両方に関連し、特に血中の分岐鎖アミノ酸（ＢＣＡＡ）のレベルの減少を特徴とする（Ｃｈａｒｌｔｏｎ，　２００６）。肝疾患の治療として、アミノ酸補給に基づく新しい治療手法の開発に対する関心が高まっている。

【発明の概要】

【００１１】

本明細書は、肝疾患の予防および治療に有効な新しいアミノ酸ベースの組成物を提供することを目的とする。

【００１２】

本明細書によれば、上記の目的は、本開示の不可欠な部分を形成するものとして理解される後述の特許請求の範囲において具体的に想起される主題のおかげで達成される。

【００１３】

本明細書の実施形態は、哺乳動物における肝疾患の治療に使用される組成物を提供し、当該組成物は活性剤を含み、当該活性剤は、アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンと、カルボン酸であるクエン酸、コハク酸、リンゴ酸とを含む。

【００１４】

１または複数の実施形態では、組成物の活性剤は、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システインおよびチロシンからなる群から選択される１または複数の種類のアミノ酸を更に含む。

【００１５】

好ましい実施形態において、肝疾患は、アルコール性肝臓疾患（ＡＤＬ）、非アルコール性肝臓疾患（ＮＡＦＤＬ）、リポジストロフィ、肝臓炎、肝硬変、肝細胞癌（ＨＣＣ）からなる群から選択され得る。

【００１６】

本開示の更なる実施形態は、哺乳動物における肝疾患を治療する方法を提供し、当該方法は、活性剤を含む組成物を選択する段階を含み、当該活性剤は、アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシン、カルボン酸であるクエン酸、コハク酸、リンゴ酸を含み、当該方法はまた、哺乳動物における肝疾患を治療するために当該組成物を投与する段階を含む。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

本発明は、例示のみを目的として、添付の図を参照して説明される。

【図１】異なるアミノ酸ベース組成物およびエタノール（ＥｔＯＨ）で９日間処理したＨｅｐＧ２細胞におけるｍＲＮＡレベルとして示される遺伝子発現を示す（対照細胞に対して、＊Ｐ値＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１）。

【図２】異なるアミノ酸ベース組成物およびＥｔＯＨで９日間処理したＨｅｐＧ２細胞におけるｐ６２タンパク質レベルを示す（対照細胞に対して、＊Ｐ値＜０．０５、＊＊Ｐ＜０．０１；ＥｔＯＨ処理細胞に対して、＃Ｐ値＜０．０５）。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

以下の説明では、実施形態の完全な理解を提供するために、多数の具体的な詳細が示される。実施形態は、具体的な詳細のうちの１または複数を省いても、または他の方法、成分、材料等を用いても実施可能である。他の例では、実施形態の態様を不明瞭にすることを避けるために、周知の構造、材料または動作は詳細に示されないか、または説明されない。

【００１９】

本明細書を通して「一実施形態」または「ある実施形態」について言及された場合、このことは、その実施形態に関連して説明されている特定の特徴、構造、または特性が少なくとも１つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通してさまざまな箇所における「一実施形態では」または「実施形態では」という語句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態を指しているわけではない。更に、特定の特徴、構造または特性は、１または複数の実施形態において任意の適切な方法で組み合わせることができる。本明細書におけるセクションタイトルは、便宜上に過ぎず、複数の実施形態の範囲または意味を解釈するためのものではない。

【００２０】

アルコール性肝臓疾患（ＡＬＤ）および非アルコール性脂肪肝疾患（ＮＡＦＬＤ）は、世界的に主要な健康問題であり、肝脂肪変性、脂肪性肝炎、肝硬変、癌までを含む、長期的に進行する病理的特徴を特徴とする。

【００２１】

例えば、ミトコンドリア障害、活性酸素種（ＲＯＳ）生成、および、脂肪蓄積などの、エタノール関連の病因の初期事象は、ＡＬＤとＮＡＦＬＤ（以下を参照）との間で共通する特徴である。

【００２２】
加えて、アミノ酸代謝の変化は、肝疾患の際立った特徴であることが示されており、低レベルの血中分岐鎖アミノ酸（ＢＣＡＡ）を特徴とし、ＢＣＡＡの補給は、維持療法として処方される場合、肝硬変の合併症の頻度の減少に関連すると考えられる（Ｃｈａｒｌｔｏｎ ２００６）。
【００２３】
本願の発明者は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、およびリシンの組み合わせを含む組成物に特定のカルボン酸を追加することにより、例えばＡＬＤおよびＮＡＦＬＤなどの肝疾患の緩和における高い有効性を実現できることを発見した。
【００２４】
本明細書において開示される組成物は、トリカルボン酸回路の基質である、特定の量のクエン酸、コハク酸、およびリンゴ酸を含む３種類のカルボン酸と組み合わされた、アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンを活性剤として含み、エタノールによって誘導されるアミノ酸代謝の変化を元に戻すこと、および、結果としてオートファジーを防止することが示された。トリカルボン酸回路（ＴＣＡ回路）は、クレブス回路およびクエン酸回路とも呼ばれ、ミトコンドリアのマトリックスにおいて実行され、細胞呼吸（３段階のプロセスであり、これにより、生細胞は成長および分裂するのに必要なエネルギーを回収するために、酸素の存在下で燃料の有機分子を分解する）の第２段階である。
【００２５】
上記の活性剤を含む組成物、および、更に特定のアミノ酸（下の表１に列挙される）を含む上記の活性剤を含む組成物は、そのような特定のカルボン酸を含まない同様のアミノ酸組成物と比べて、有効性が著しく高い。
【００２６】
１または複数の実施形態において、本明細書において開示される組成物において、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の総量と、アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンの総量との間の重量比は、０．０５～０．３、好ましくは、０．１～０．２５である。
【００２７】
１または複数の実施形態では、活性剤は、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン、チロシンからなる群から選択される１または複数の種類のアミノ酸を更に備え得る。
【００２８】
１または複数の実施形態において、組成物に含まれるカルボン酸は、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸から成る。
【００２９】
更なる実施形態では、本明細書に開示される組成物の活性剤は、アスパラギン酸および／またはオルニチンＬ－アルファケトグルタル酸（ＯＫＧ）も含み得る。
【００３０】
一実施形態によれば、組成物は、活性剤を備え、この活性剤は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システインおよび任意にチロシン、ならびにクエン酸、コハク酸およびリンゴ酸を含み、組成物に含まれるアミノ酸は上記アミノ酸だけである。組成物に含まれるカルボン酸は、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸だけであり得る。
【００３１】
更なる実施形態では、組成物は、活性剤の重量に対して３５重量％～６５重量％、好ましくは４２重量％～５６重量％の量のアミノ酸であるイソロイシン、ロイシンおよびバリンを含み得る。
【００３２】
１または複数の実施形態では、ロイシンとクエン酸との重量比は、１～５、好ましくは

２．５０～３．５０である。
【００３３】
更なる実施形態では、クエン酸の重量またはモル量は、リンゴ酸およびコハク酸のそれぞれの重量またはモル量よりも多い。好ましくは、クエン酸の重量またはモル量は、リンゴ酸にコハク酸を加えた総重量または総モル量よりも多い。更なる実施形態では、クエン酸と、リンゴ酸およびコハク酸の合計との重量比は、１．０～４．０、好ましくは１．５～２．５である。好ましい実施形態では、クエン酸：リンゴ酸：コハク酸の重量比は、１０：１：１～２：１．５：１．５、好ましくは７：１：１～１．５：１：１、より好ましくは５：１：１～３：１：１である。好ましい実施形態では、クエン酸：リンゴ酸：コハク酸の重量比は、４：１：１である。
【００３４】
本開示のいくつかの実施形態によれば、好ましいイソロイシン：ロイシンのモル比は、０．２～０．７の範囲、好ましくは０．３０～０．６０の範囲であり、かつ／またはバリン：ロイシンの好ましい重量比は、０．２～０．７０の範囲、好ましくは０．３０～０．６５の範囲である。
【００３５】
更なる実施形態では、トレオニン：ロイシンのモル比は、０．１０～０．９０の範囲、好ましくは０．２０～０．７０の範囲であり、かつ／またはリシン：ロイシンの重量比は、０．２０～１．００の範囲、好ましくは０．４０～０．９０の範囲にある。
【００３６】
好ましい実施形態では、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総モル量と、メチオニン、フェニルアラニン、ヒスチジンおよびトリプトファンの総モル量との比は、１．３５よりも高い。
【００３７】
１または複数の実施形態では、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の合計と、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸の合計との重量比は、０．１～０．４、好ましくは０．１５～０．３５である。
【００３８】
更なる実施形態では、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸にトレオニンおよびリシンを加えた総重量は、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸などの３つのカルボン酸の総重量よりも多い。好ましくは、単一のカルボン酸（クエン酸、コハク酸またはリンゴ酸）の重量は、単一アミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニンおよびリシンのそれぞれの重量よりも少ない。
【００３９】
更なる実施形態では、リシンおよびトレオニンの総モル量は、カルボン酸であるクエン酸、コハク酸、リンゴ酸の３つの総モル量よりも多い。好ましくは、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の３つのカルボン酸の総モル量と、リシンおよびトレオニンの総モル量との比は、０．１～０．７、好ましくは０．１５～０．５５である。
【００４０】
１または複数の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、ビタミン類を更に備え、このビタミン類は、好ましくは、ビタミンB_1および／またはビタミンB_6などのビタミンＢ群から選択される。
【００４１】
本開示の更なる実施形態では、組成物は、炭水化物、添加剤および／または香味物質を含み得る。
【００４２】
好ましい実施形態において、組成物は、脂肪肝疾患、リポジストロフィ、肝臓炎、肝硬変、肝細胞癌（ＨＣＣ）からなる群から選択される肝疾患の予防および／または治療に用いられる。
【００４３】

１または複数の実施形態において、肝疾患は脂肪肝疾患である。脂肪肝疾患は、アルコール摂取（アルコール脂肪肝疾患、ＡＬＤ）によって引き起こされ得る。１または複数の実施形態において、脂肪肝疾患は、非アルコール性脂肪肝疾患（ＮＦＬＤ）である。

【００４４】

１または複数の実施形態において、脂肪肝疾患は、例えば、アミオダロン、メトトレキサート、ジルチアゼム、高活性抗レトロウイルス療法、糖質コルチコイド、タモキシフェン、キノコ中毒などの薬剤または毒素に起因し得る。

【００４５】

更に、特に本開示による組成物、具体的には活性剤を調製する場合、アミノ酸であるアルギニンは、好ましくは回避される。加えて、本明細書に開示される組成物により好ましく除外される更なるアミノ酸は、セリン、プロリン、アラニンである。そのようなアミノ酸は、組成物内のある濃度または化学量論比では、逆効果または有害でさえあり得る。

【００４６】

本願に開示されるアミノ酸は、それぞれの薬学的に許容される誘導体、すなわち塩で置き換えられ得る。

【００４７】

以下で明らかになるように、本開示による組成物の投与は、肝疾患の予防および／または治療に特に有効である。

【００４８】

好ましい実施形態において、開示される組成物は、アルコール性肝臓疾患（ＡＬＤ）の治療に使用され得る。

【００４９】

更なる実施形態によれば、アミノ酸組成物は、例えばタンパク質、ビタミン類、炭水化物、天然および人工の甘味料ならびに／または香味物質のような薬学的に許容される賦形剤を備え得る。好ましい実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、ホエータンパク質、マルトデキストリン、フルクトース、カゼイン酸カルシウム、魚油、スクラロース、スクロースエステル、ビタミンＤ３、ビタミンＢ群から選択され得る。

【００５０】

経口使用の場合、本明細書に記載の組成物は、錠剤、カプセル、顆粒、ゲル、ゲル化可能な粉末、または粉末の形態をとり得る。

【００５１】

組成物により提供されるさまざまなアミノ酸の量および比に関する更なる仕様は、添付の特許請求の範囲に含まれ、本発明に関して本明細書に提供される技術的教示の不可欠な部分を形成する。

実施例

【００５２】

表１は、以下に開示されるように、肝細胞（ＨｅｐＧ２細胞）に対してインビトロで、および、エタノールを摂取するラットに対してインビボで試験された２つの異なるアミノ酸ベース組成物を示す。

【００５３】

以下の「ＢＣＡＡｅｍ」という名称の組成物は、アミノ酸であるロイシン、リシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、システイン、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、チロシン、トリプトファンを含む活性剤を備える。

【００５４】

「アルファ５ｍ（α５ｍ）」という名称の組成物は、上記アミノ酸に加えて、クエン酸、コハク酸、およびリンゴ酸を含む活性剤を備える。

表１

【表１】

組成(% w/w)	BCAAem	α5m
Ｌ－ロイシン	30,01	31,0885
Ｌ－リジンＨＣｌ塩酸塩	19,58	16,903
Ｌ－イソロイシン	15	10,3628
Ｌ－バリン	15	10,3628
Ｌ－スレオニン	8,4	7,254
Ｌ－システイン	3,6	3,1089
Ｌ－ヒスチジン	3,6	3,1089
Ｌ－フェニルアラニン	2,4	2,0726
Ｌ－メチオニン	1,2	1,0363
Ｌ－チロシン	0,72	0,6218
Ｌ－トリプトファン	0,48	2,0726
ＯＫＧ（オルニチンＬ－αケトグルタル酸）	-	-
ビタミンＢ１（チアミン塩酸塩）	-	0,004
ビタミンＢ６（ピリドキシン塩酸塩）	-	0,0038
無水クエン酸	-	8,0000
リンゴ酸	-	2,0000
酸Ｌ－アスパラギン酸	-	-
コハク酸	-	2,0000
ロイシン：イソロイシン：バリン比率	2:1:1	3:1:1

【００５５】

上記の表１の組成物は、０．８メッシュですべての成分を篩分けすることにより最初に調製することができる。予備混合物を得るために、各成分（総量の１０重量％未満の量）をＬ－リシン塩酸塩の一部と一緒にポリエチレン袋にとり、組成物全体の重量の１０％を得る。次いで、バッグを５分間手で振る。次いで、予備混合物を残りの成分と一緒にミキサー（Ｐｌａｎｅｔａｒｉａ）に入れ、１２０ｒｐｍで１５分間混合して均一な最終組成物を得る。

方法

動物および治療

【００５６】

実験プロトコルは、１９８６年１１月２４日の欧州共同体理事会指令（８６／６０９／ＥＥＣ）およびイタリア保健省によって承認、実施され、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ Ｇｕｉｄｅｌｉｎｅｓに遵守する。

【００５７】

以下に開示される実験分析には、Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ（Ｃａｌｃｏ、Ｃｏｍｏ、イタリア）製のオスＷｉｓｔａｒラット（３月齢）を使用した。

【００５８】

動物は清潔なポリプロピレン製ケージに別々に収容され、６群に分けられた。

１）同時飼育群（同時飼育対照、ｎ＝６）には、エタノール（ＥｔＯＨ）が等カロリーのマルトースデキストランで置き換えられた対照液体飼料を与えた。

２）ＥｔＯＨ群（ＥｔＯＨ、ｎ＝７）には、ＥｔＯＨを含むＬｉｅｂｅｒ－ＤｅＣａｒｌｉ液体飼料を不断給餌で与えた（ＥｔＯＨの量を徐々に増加させ、１週間後、カロリー摂取量の３６％（最終濃度６．２％（ｖｏｌ／ｖｏｌ）に対応する）まで上げた）。

３）ＢＣＡＡｅｍ群（ＢＣＡＡｅｍ、ｎ＝６）には、ＥｔＯＨが等カロリーのマルトースデキストランで置き換えられた対照液体飼料を与え、１．５ｇ／ｋｇ／日のＢＣＡＡｅｍを提供する分岐鎖アミノ酸組成物（表１の「ＢＣＡＡｅｍ」）を補給した。

４）アルファ５群（α５ｍ、ｎ＝６）には、ＥｔＯＨが等カロリーのマルトースデキス

トランで置き換えられた対照液体飼料を与え、１．５ｇ／ｋｇ／日を提供するアミノ酸組成物（表１の「α５ｍ」）を補給した。

５）ＥｔＯＨ＋ＢＣＡＡｅｍ群（ＥｔＯＨ＋ＢＣＡＡｅｍ、ｎ＝７）には、ＥｔＯＨおよびＢＣＡＡｅｍ組成物を含むＬｉｅｂｅｒ－ＤｅＣａｒｌｉ液体飼料を不断給餌で与えた。

６）ＥｔＯＨ＋α５ｍ群（ＥｔＯＨ＋α５ｍ、ｎ＝７）には、ＥｔＯＨおよびα５ｍ組成物を含むＬｉｅｂｅｒ－ＤｅＣａｒｌｉ液体飼料を不断給餌で与えた。

サンプル調製

【００５９】

肝臓（ｎ＝４の動物／群）を計量し、低温のメタノール：水（ｖ／ｖ、１：１）でホモジナイズし、Ｗａｎｔ ｅｔ ａｌ．（Ｗａｎｔ ｅｔ ａｌ． ２０１３）に従って抽出した。真空乾燥したサンプル組織５０ｍｇを、１２０μｌのメタノール：１ ｍＭ ＴＤＦＨＡ＝１：１で懸濁し、４℃、１６，０００ｇで１０分間遠心分離した。２μｌの上清をＵＰＬＣ質量分析計に直接ロードし、以下に記載されるように分析した。３つの異なる方法を使用して、各サンプルあたり４回の技術的反復実験を実行した。

クロマトグラフィおよび肝臓におけるアミノ酸の定量化

【００６０】

標準的なアミノ酸をＳｉｇｍａ（ミラノ、イタリア）から購入した。各アミノ酸保存溶液は、水を用いて１ｍｇ／ｍｌとなるように調製し、最終濃度が３ｐｍｏｌ／μｌとなるように希釈し、注射器を用いて１０μｌ／分でＴｒｉｐｌｅＴＯＦ ５６００＋（ＡＢ Ｓｃｉｅｘ、ミラノ、イタリア）質量分析計に直接注入した。そして、デクラスタリングポテンシャル（ＤＰ）およびコリジョンエネルギー（ＣＥ）を各アミノ酸に最適化した。

【００６１】

次に、３つのアミノ酸混合物をＤＰおよびＣＥ値に基づいて調製した。ＭＩＸ１はトレオニン、アスパラギン、チロシンおよびセリンを含み、ＤＰ：３０Ｖ、ＣＥ：１５Ｖで分析した。ＭＩＸ２はグリシン、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、ヒスチジン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン、およびフェニルアラニンを含み、ＤＰ：４０Ｖ、ＣＥ：１５Ｖで分析した。ＭＩＸ３はグルタミン酸、リシン、アルギニンおよびトリプトファンを含み、ＤＰ：８０Ｖ、ＣＥ：１８Ｖで分析した。

【００６２】

ソースパラメータは、気体１：３３ｐｓｉ、気体２：５８ｐｓｉ、カーテンガス：２５ｐｓｉ、温度：５００℃、ＩＳＶＦ（ＩｏｎＳｐｒａｙ Ｖｏｌｔａｇｅ Ｆｌｏａｔｉｎｇ）：５５００Ｖであった。

【００６３】

検量線を得るために、ＵＰＬＣ １２９０（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ Ｉｔａｌｉａ、Ｃｅｒｎｕｓｃｏ ｓｕｌ Ｎａｖｉｇｌｉｏ、ミラノ、イタリア）を使用して、ＵＰＬＣ分離後に異なる量（１０、３３、５０、１００、２００、４００ｐｍｏｌ）の３つの混合物を質量分析計に注入するという技術的に同じ実験を４回行った（ｑｕａｄｒｕｐｌｉｃａｔｅ）。クロマトグラフィカラムはＷａｔｅｒｓのＡｃｑｕｉｔｙ ＨＳＳ Ｔ３ Ｃ１８ ２．１ ｘ １００ ｍｍ、１．７μｍであり、移動相はＡ：１ｍＭ ＴＤＦＨＡ（トリデカフルオロヘプタン酸）水溶液；Ｂ：１ ｍＭ ＴＤＦＨＡアセトニトリル溶液であった。Ｂのグラジエントを４分間で１２．５％～２６．５％に上げ、続いて３．５分間で２６．５％から９２％まで徐々に増加せる手法を使用することにより、すべてのアミノ酸を分離した。記載されているように（Ｌｅ ｅｔ ａｌ．， ２０１４）、流量は０．３５ｍｌ／分であり、カラム温度は６５℃であった。

【００６４】

オートサンプラーを４℃に設定した。ＭｕｌｔｉＱｕａｎｔ ｓｏｆｔｗａｒｅ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．１ （ＳＣＩＥＸ）を用いて、クロマトグラフィピーク面積および加重回帰を使用して検量線をプロットした（１／ｘ２にフィットされたアスパラギン、チロシン、バリンおよびグルタミン酸を除くすべての化合物について１／ｘ）。クロマトグラフィピ

ーク面積を、外部で実行された較正標準から得られたものと関連付けることにより、ラット肝臓サンプルにおける各アミノ酸の定量値（ｐｍｏｌ）を得て、組織（ｍｇ）に標準化した。

細胞培養および処理

【００６５】

ヒトＨＣＣ ＨｅｐＧ２細胞をＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＨＢ－８０６５；ＡＴＣＣ、マナッサス、バージニア州）から購入した。５％のＣＯ２を含む３７℃の雰囲気において、通常の方式でＲＰＭＩ－１６４０培地において細胞を培養し、１０％のウシ胎児血清、ペニシリン（１００Ｕ／ｍＬ）、ストレプトマイシン（１００μｇ／ｍＬ）を添加した。７５ｃｍ^{2}のフラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｃ．、Ｃｏｒｎｉｎｇ、ニューヨーク州）あたり２００万のＨｅｐＧ２細胞を播種した。

【００６６】

播種の６時間後、７５ｍＭ（０．３４％）のＥｔＯＨおよび１％のＢＣＡＡｅｍまたはα５ｍを単独で、または組み合わせて添加した。対照として未処理の細胞を播種した。２４時間ごとに、対照フラスコおよび処理フラスコの両方における培地を新しい培地（それぞれ、ＥｔＯＨおよびＢＣＡＡｅｍまたはα５ｍを含む、または含まない）で置き換えた。前に説明されたように（Ｐｏｃｈａｒｅｄｄｙ ｅｔ ａｌ． ２０１２）、播種の４日後、細胞をトリプシン処理して、新しいフラスコに播種し（フラスコあたり２００万の生細胞）、毎日培地を交換した。分裂プロセスの５日後（ＥｔＯＨ、ＢＣＡＡｅｍ、もしくはα５ｍ、または、ＥｔＯＨ＋ＢＣＡＡｅｍもしくはα５ｍを含む、または含まない状態で合計９日間）、異なるアッセイのために以下で記載されるように細胞を回収した。

定量的ＲＴ－ＰＣＲ分析

【００６７】

説明（Ｔｅｄｅｓｃｏ ｅｔ ａｌ． ２００８）に従って定量的ＲＴ－ＰＣＲ反応を実行し、ｉＱ ＳｙｂｒＧｒｅｅｎＩ ＳｕｐｅｒＭｉｘ （Ｂｉｏ－Ｒａｄ； セグラーテ、イタリア）と共にｉＣｙｃｌｅｒ ｉＱ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲ検出システム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）にかけた。

【００６８】

簡潔に説明すると、ＲＮｅａｓｙ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ （Ｑｉａｇｅｎ、ミラノ、イタリア）を使用してＲＮＡを組織から単離した。ｉＳｃｒｉｐｔＴＭ ｃＤＮＡ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｋｉｔ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、セグラーテ、イタリア）を使用して、ｃＤＮＡを合成した。

【００６９】

Ｐｒｅｍｉｅｒ Ｂｉｏｓｏｆｔ ＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌのＢｅａｃｏｎ Ｄｅｓｉｇｎｅｒ ２．６ソフトウェアを使用してプライマーを設計した（配列を以下の表２に記載した）。様々な転写産物が検出可能なサイクル数（閾値サイクル、ＣＴ）を、ΔＣＴと称されるＴＢＰと比較した。相対的遺伝子レベルを２－（ΔΔＣＴ）として表現した。ここで、ΔΔＣＴは、ＥｔＯＨまたはＢＣＡＡｅｍまたはＣＡＡ混合物で処理したラット（または処理されたＨｅｐＧ２細胞）のΔＣＴから対照ラット（または未処理のＨｅｐＧ２細胞）のΔＣＴを減算したものに等しい。

表２

【表２】

遺伝子	プライマー	配列	配列番号	T_a
PGC-1α	Sense 5’-3’	5’-GACCCCAGAGTCACCAAATGAC-3’	No.1	60
	Antisense 5’-3’	5’-TTGGTTGGCTTTATGAGGAGGA-3’	No.2	
Tfam	Sense 5’-3’	5’-AGATTGGGGTCGGGTCAC-3’	No.3	60
	Antisense 5’-3’	5’- GACAACTTGCCAAGACAGATG -3’	No.4	
NRF1	Sense 5’-3’	5’-ACTCGTGTGGGACAGCAAGC-3’	No.5	60
	Antisense 5’-3’	5’-ATGGTGAGAGGCGGCAGTTC-3’	No.6	
Cytc	Sense 5’-3’	5’-CGTTGTGCCAGCGACTAAAAA-3’	No.7	60
	Antisense 5’-3’	5’-TTCCGCCCAAAGAGACCA-3’	No.8	
TBP	Sense 5’-3’	5’-AGGCACCACAGCTCTTCCAC-3’	No.9	60
	Antisense 5’-3’	5’-CCCAGAACTCTCCGAAGCTG-3’	No.10	

【００７０】

アニーリング温度Ｔａ（℃）；アクセッション番号ＰＧＣ－１α：ＮＭ＿０１３２６１；アクセッション番号Ｔｆａｍ：ＮＭ＿００９３６０．４；アクセッション番号ＮＲＦ１：ＮＭ＿００５０１１；アクセッション番号Ｃｙｔｃ：ＪＦ９１９２２４．１；アクセッション番号ＴＢＰ：ＮＧ＿０５１５７２が遺伝子発現を標準化するために使用された。

ウエスタンブロット分析

【００７１】

プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、ミラノ、イタリア）の存在下で、製造業者によって説明された通り、Ｔ－ＰＥＲ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ　Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｐｉｅｒｃｅ，ＴｈｅｒｍｏＳｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、ロックフォード、米国）を用いて肝臓からタンパク質抽出物を得た。ビシンコニン酸タンパク質アッセイ（ＢＣＡ、Ｐｉｅｒｃｅ、Ｅｕｒｏｃｌｏｎｅ、ミラノ、イタリア）によってタンパク質含有量を測定し、還元条件下において５０μｇのタンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥにかけた。次に、分離されたタンパク質を電気泳動でニトロセルロース膜（（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、セグラーテ、イタリア）に移した。各々１：１０００の希釈率で目的のタンパク質を特定の抗体：抗ｐ６２および抗αアクチン（すべてＣｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ，　Ｅｕｒｏｃｌｏｎｅ、ミラノ、イタリア）で検出した。西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した抗ウサギまたは抗マウス免疫グロブリンを使用して、室温で１時間にわたって免疫染色を検出した。ＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（Ｐｉｅｒｃｅ、Ｅｕｒｏｃｌｏｎｅ、ミラノ、イタリア）を使用してタンパク質の量を測定し、ＩＭＡＦＥＪソフトウェア画像アナライザを用いた濃度測定により定量化した。

統計分析

【００７２】

すべての遺伝子発現データについて、両側のペアサンプルｔ検定（ｔｗｏ－ｓｉｄｅｄ　ｐａｉｒｅｄ－ｓａｍｐｌｅ　ｔ　ｔｅｓｔ）を使用して、対照細胞と処理細胞の値を比較した。Ｐ値＜０．０５を統計的に有意であるとみなした。

結果

【００７３】

ＥｔＯＨ摂取によって低下する肝臓のミトコンドリア生合成および機能を戻すために組成物α５ｍはＢＣＡＡｅｍ組成物より効果的である。

【００７４】

ＥｔＯＨにさらされることに起因するミトコンドリア生合成および機能の低下を緩和するＢＣＡＡｅｍおよびα５ｍ組成物の能力を評価した。ＢＣＡＡｅｍおよびα５ｍ組成物によってもたらされる効果に関与する分子機構を調査するべく、肝臓ＥｔＯＨ毒性のインビトロモデルを使用した。

【００７５】

この目的で、ＢＣＡＡｅｍ　α５ｍ組成物を含む、または含まない７５　ｍＭ　ＥｔＯＨに肝臓ＨｅｐＧ２細胞を９日間さらした。７５　ｍＭ　ＥｔＯＨに９日間さらしたＨｅｐＧ２細胞において、増殖剤活性化レセプタγ共活性化因子１α（ＰＧＣ－１α）、核呼吸因子１（ＮＲＦ－１）、ミトコンドリアＤＮＡ転写因子Ａ（Ｔｆａｍ）およびシトクロムｃのｍＲＮＡレベルは、未処理の対照細胞と比較して、変化が無かったか、または、わずかに低くなった（図１）。

【００７６】

しかしながら、ＢＣＡＡｅｍおよびα５ｍ組成物を９日間投与することにより、未処理細胞およびＥｔＯＨ処理細胞の両方と比較して、ＰＧＣ－１αおよびＴｆａｍ　ｍＲＮＡレベルが増加した（図１）。

【００７７】

なお、肝臓ミトコンドリア生合成マーカーを改善するα５ｍ組成物の有効性は、ＢＣＡＡｅｍより統計的に高かった。

オートファジーの分析

【００７８】

ＬＣ３ＩＩ／ＬＣ３Ｉ比、Ｂｅｃｌｉｎ１、およびＡｔｇ７に加えてｐ６２／　ＳＱＳＴＭ１のタンパク質レベルを含む複数のマーカーを４ＥＢＰ１リン酸化と組み合わせることによってオートファジーフラックスを推測できる（Ｋｌｉｏｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）。ｐ６２／ＳＱＳＴＭ１がオートファゴソームに入り、オートリゾソームにおいて分解されることが示された。したがって、ｐ６２／ＳＱＳＴＭ１タンパク質レベルの減少は、オートファジーの増加を示す（Ｋｌｉｏｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．　２０１６）。

【００７９】

本願の図２に示されるように、７５　ｍＭ　ＥｔＯＨに９日間さらされたＨｅｐＧ２細胞におけるｐ６２タンパク質レベルは、未処理対照細胞より低かった。

【００８０】

しかしながら、ＢＣＡＡｅｍまたはα５ｍ組成物の投与の９日後、ｐ６２タンパク質レベルは、未処理細胞およびＥｔＯＨ処理細胞の両方のｐ６２レベルと比較して高かった。

【００８１】

また、このケースにおいて、α５ｍ組成物の有効性は、ＢＣＡＡｅｍ組成物より統計的に高かった。

肝臓アミノ酸定量化

【００８２】

上に開示されるように、アミノ酸代謝の変化（具体的には、低レベルの血中ＢＣＡＡ）は、アルコール性肝臓疾患の決定的特徴であることが示されている（Ｃｈａｒｌｔｏｎ，２００６）。

【００８３】

以下において提供されるデータは、慢性的にＥｔＯＨを摂取するラットの肝臓におけるアミノ酸代謝に対するＢＣＡＡｅｍまたはα５ｍ組成物の効果を示す。

【００８４】

この目的で、クロマトグラフィ分析を使用して、ＥｔＯＨだけを摂取する、または、ＥｔＯＨを試験対象組成物と組み合わせて摂取するラットの肝臓組織における遊離アミノ酸レベルを測定した。

【００８５】

表３に記載されるように、ＢＣＡＡｅｍおよびα５ｍ組成物の補給は、アルギニン、ロイシンおよびトリプトファンのレベルに効果的でなかった。対照的に、ＥｔＯＨ摂取は、肝臓におけるこれらのアミノ酸のレベルの低減をもたらした。

【００８６】

興味深いことに、ＥｔＯＨを摂取するラットにＢＣＡＡｅｍおよびα５ｍ組成物を投与すると、アルギニン、ロイシン、およびトリプトファンの低減が防止される。

【００８７】

また、イソロイシン、セリン、チロシンおよびバリン濃度は、ＥｔＯＨを含む飼料にさらされたマウスの肝臓において、より低かった。

【００８８】

ＢＣＡＡｅｍの補給はそれらの減少を防止できなかったが、α５ｍの補給は対照的に、ＥｔＯＨによって誘導されるイソロイシンおよびバリンの低減の防止にも有効であった。残りのアミノ酸の濃度は、群の間で統計的に違いが無かった。

【００８９】

これらの結果は、ＥｔＯＨを摂取するラットの肝臓サンプルにおけるＢＣＡＡのレベルの再標準化において、ＢＣＡＡｅｍ組成物と比較したα５ｍ組成物の特定の能力と一致する。

表３

【表３】

	CTRL	BCAAem	α5m	EtOH	EtOH + BCAAem	EtOH + α5m
アラニン	670.1 ± 65.7	832.0 ± 25.0	932.0 ± 34.0	691.2 ± 128.0	679.0 ± 110.0	703.0 ± 90.0
アルギニン	6.6 ± 0.7	4.3 ± 0.8	5.3 ± 0.7	2.46 ± 0.5*	4.3 ± 0.7#	4.6 ± 0.5#
アスパラギン	8.9 ± 2.4	7.9 ± 2.7	9.1 ± 1.7	8.1 ± 2.1	6.9 ± 2.8	7.8 ± 2.3
グリシン	409.8 ± 78.2	479.8 ± 32.0	442.8 ± 54.0	424.1 ± 52.0	440.7 ± 67.2	416.7 ± 59.2
グルタミン酸	5232.0 ± 430.0	5394.0 ± 438.0	5193.0 ± 328.0	5970.5 ± 832.0	4717.70 ± 850	4928.67 ± 550
ヒスチジン	$527.9 \cdot 10^3 \pm 80.3 \cdot 10^3$	$606.8 \cdot 10^3 \pm 10.8 \cdot 10^3$	$705.8 \cdot 10^3 \pm 10.5 \cdot 10^3$	$461.1 \cdot 10^3 \pm 44.6 \cdot 10^3$	$406.0 \times 10^3 \pm 19.3 \cdot 10^3$	$606.0 \times 10^3 \pm 11.3 \cdot 10^3$
イソロイシン	141.9 ± 29.7	144.4 ± 4.5	153.4 ± 3.4	92.9 ± 16.6*	93.2 ± 17.9*	143.1 ± 16.4#
ロイシン	195.0 ± 56.4	189.1 ± 81.9	197.1 ± 71.6	110.2 ± 18.8 *	188.9 ± 92.4#	195.8 ± 82.3#
リジン	72.2 ± 16.8	90.5 ± 19.7	87.5 ± 17.8	62.3 ± 9.6	53.3 ± 6.4	67.2 ± 7.3
メシオン	12.9 ± 5.5	17.9 ± 5.3	16.5 ± 3.9	11.9 ± 3.9	17.8 ± 4.7	15.9 ± 5.1
フェニル	32.0 ± 13.2	36.4 ± 4.8	39.2 ± 3.3	27.7 ± 10.2	28.8 ± 5.2	35.6 ± 4.5
プロリン	33.7 ± 5.2	33.5 ± 1.3	33.9 ± 2.3	27.2 ± 8.7	24.6 ± 4.2	31.7 ± 3.9
セリン	348.7 ± 33.9	362.4 ± 9.9	385.4 ± 10.9	220. 7 ± 58.4*	215.4 ± 43.0*	342.4 ± 39.1*
スレオニン	55.5 ± 2.41	52.2 ± 2.0	51.2 ± 1.7	52.9 ± 2.5	51.5 ± 2.2	53.5 ± 1.7
トリプトップ	$1252.8 \cdot 10^3 \pm 226.4 \cdot 10^3$	$1350.4 \cdot 10^3 \pm 74.54 \cdot 10^3$	$1299.4 \cdot 10^3 \pm 99.4 \cdot 10^3$	$787.1 \cdot 10^3 \pm 112.7 \cdot 10^{3}$*	$1038.2 \cdot 10^3 \pm 169.9 \cdot 10^{3}$#	$1178.2 \cdot 10^3 \pm 178.9 \cdot 10^{3}$#
チロシン	514.5 ± 63.3	382.6 ± 19.7	472.6 ± 29.7	311.7 ± 71.89 *	274.6 ± 39.7*	354.8 ± 35.6*
バリン	429.9 ± 46.7	455.3 ± 17.7	564.3 ± 20.7	291.9 ± 61.1	290.8 ± 48.9	450.8 ± 62.7#

【００９０】

値は平均±標準偏差（組織ｍｇあたりのｐｍｏｌ）として記載され、ｎ＝４（動物／群）、対照群に対して＃Ｐ＜０．０５、ＥｔＯＨ群に対し＃Ｐ値＜０．０５である。

【００９１】

まとめると、インビトロおよびインビボの結果は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシン、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸の組み合わせを含む活性剤を備える組成物を用いた栄養補助食品は、ＥｔＯＨにさらされた肝細胞のミトコンドリア障害の予防に著しく有効であることを示す。

【００９２】

この効果には、ＥｔＯＨにさらされることによって増加する（すなわち、ｐ６２タンパク質レベルの減少）オートファジーの低減（すなわち、ｐ６２タンパク質レベルの増加）も伴う。

【００９３】

ＥｔＯＨ自体は、オートファジーを強化して、ＥｔＯＨ毒性、特に、アルコールにさらされた肝細胞、および、アルコールを摂取する動物の肝臓において見られるミトコンドリア障害を相殺し得る。

【００９４】

実際、オートファジーは、ミトコンドリアを含む機能不全の細胞器官を除去することを目的とした細胞機構である。肝細胞がアルコールにさらされ、ミトコンドリア機能が低減する場合、本願においても開示されるようなオートファジーの増加は、機能不全のミトコ

ンドリアを除去するのに有益である。

【００９５】

ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンのクエン酸、コハク酸、リンゴ酸との組み合わせを含む、本明細書に開示されるアミノ酸組成物は、ミトコンドリア障害を予防することができ、それにより、細胞はそのエネルギー機能を維持するのにオートファジーを必要としない。その結果、オートファジーが減少する（本願において示されるように、ｐ６２タンパク質レベルの増加によって示される）。

【００９６】

更に、最も重要なこととして、開示される組成物は、ＥｔＯＨを摂取するラットの肝臓における遊離ＢＣＡＡ、アルギニン、およびトリプトファン濃度を戻すのに非常に有効であることが分かった。

【００９７】

なお、予備結果によれば、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンのクエン酸、コハク酸、およびリンゴ酸との組み合わせを含む、本明細書において開示されるアミノ酸組成物はまた、高脂肪飼料（ＨＦＤ、脂肪から６０％カロリー）に６か月さらされたマウス（広く使用されるＮＡＦＬＤのモデルマウス）の肝細胞における脂肪滴の直径を低減できることが示唆される。これらの結果はまとめて、本明細書に開示される、アルコール依存肝臓毒性において活性を有するアミノ酸組成物が、ＮＡＦＬＤの進行および悪化を予防するのに有益であり得るという考えを支持している。

【００９８】

以上より、世界中の多くの成人人口が患い、社会的コストが増加している肝疾患の予防および／または治療に対して、本開示による組成物がどのように有益であるかが明確に分かる。

【００９９】

参考文献

Charlton M. (2006) Branched-Chain Amino Acid Enriched Supplements as Therapy for Liver Disease. J Nutr 136: 295S-298S.

Cho HI, Choi JW, Lee SM (2014) Impairment of autophagosome-lysosome fusion contributes to chronic ethanol-induced liver injury. Alcohol 48:717-725.

Cooper GM and Hausman RE (2009) La cellula. Un approccio molecolare. Bioenergetica e metabolismo. Mitocondri, cloroplasti e perossisomi. Piccin 11: 432-468.

Ding WX, Li M, Chen X, Ni HM, Lin CW, Gao W, Lu B, Stolz DB, Clemens DL, Yin XM (2010) Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. Gastroenterology 139:1740-1752.

Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H (2010) mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett 584:1287-1295.

Klionsky DJ et al (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy 12:1-222.

Lin CW, Zhang H, Li M, Xiong X, Chen X, Chen X, Dong XC, Yin XM (2013) Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice. J Hepatol 58:993-999.

Lin Wang, Bilon Khambu, Hao Zhang, Xiao-Ming Yin (2015) Autophagy in alcoholic liver disease, self-eating triggered by drinking. Clinics and research in hepatology and gastroenterology 39, S2-S6.

Le A, Ng A, Kwan T, Cusmano-Ozog K, Cowan TM. (2014) A rapid, sensitive method for quantitative analysis of underivatized amino acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 944: 166-174.

Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB and Bailey SM (2008) Mit

ochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. Free Radical Biology and Medicine 44: 1259-1272.

Ni H-M, Du K, You M, Ding W-X (2013) Critical role of FoxO3a in alcohol-induced autophagy and hepatotoxicity. Am J Pathol 183:1815-1825.

Pochareddy S, Edenberg HJ. (2012) Chronic alcohol exposure alters gene expression in HepG2 cells. Alcohol Clin Exp Res 36: 1021-1033.

Tedesco L, Valerio A, Cervino C, Cardile A, Pagano C, Vettor R, Pasquali R, Carruba MO, Marsicano G, Lutz B, Pagotto U, and Nisoli E. (2008) Cannabinoid type 1 receptor blockade promotes mitochondrial biogenesis through endothelial nitric oxide synthase expression in white adipocytes. Diabetes 57: 2028-2036.

Thomes PG, Trambly CS, Fox HS, Tuma DJ, Donohue TM Jr (2015) Acute and chronic ethanol administration differentially modulate hepatic autophagy and transcription factor EB. Alcohol Clin Exp Res 39:2354-2363. https:// doi.org/10.1111/acer.12904.

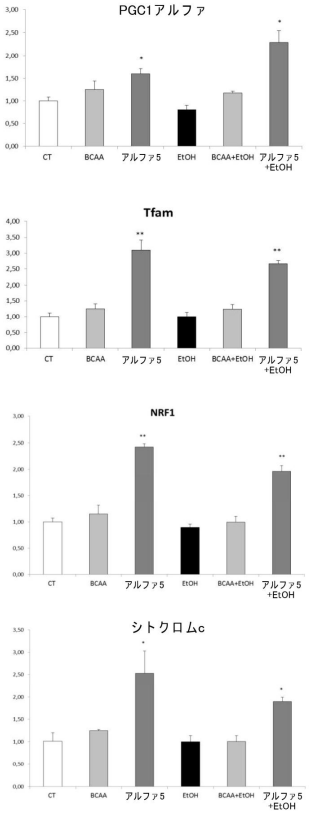
Valerio A, D'Antona G, Nisoli E. (2011) Branched-chain amino acids, mitochondrial biogenesis, and healthspan: an evolutionary perspective. Aging 3: 464-478.

Want EJ, Masson P, Michopoulos F, Wilson ID, Theodoridis G, Plumb RS, Shockcor J, Loftus N, Holmes E, Nicholson JK. (2013) Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. Nat Protoc 8: 17-32.

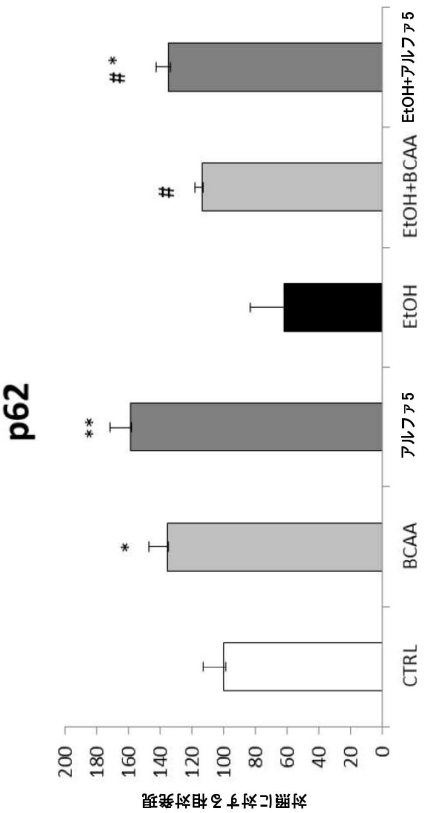
【０１００】

【図面】

【図１】



【図２】



【配列表】

0007347744000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)

ＦＩ
Ａ６１Ｐ　43/00　１２１

(56)参考文献
国際公開第２０１６／０９３１０４（WO，Ａ１）
国際公開第２０１６／１７９６５７（WO，Ａ１）
国際公開第２００７／０４９８１８（WO，Ａ１）
特開２００７－１６１６４２（ＪＰ，Ａ）
A specific amino acid formula prevents alcoholic liver disease in rodents，Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2018年，314，G566-G582

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３１／００－３１／８０
Ａ６１Ｐ　１／００－１／１８
Ａ６１Ｐ　４３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）