

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6811316号

(P6811316)

(45) 発行日 令和3年1月13日 (2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月16日 (2020.12.16)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K	31/165	(2006.01)	A 6 1 K	31/165	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	38/28	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 2 3 L	33/10	(2016.01)	A 6 1 K	38/28	

請求項の数 6 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-520949 (P2019-520949)
 (86) (22) 出願日 平成29年10月20日 (2017.10.20)
 (65) 公表番号 特表2019-535663 (P2019-535663A)
 (43) 公表日 令和1年12月12日 (2019.12.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/011636
 (87) 国際公開番号 W02018/074879
 (87) 国際公開日 平成30年4月26日 (2018.4.26)
 審査請求日 平成31年4月19日 (2019.4.19)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0137763
 (32) 優先日 平成28年10月21日 (2016.10.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0137764
 (32) 優先日 平成28年10月21日 (2016.10.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

(73) 特許権者 518100627
 セルバーティクス カンパニー リミテッ
 ド
 大韓民国 06621 ソウル ソチョー
 グ カンナムーデロ 373 9階 ナン
 バー 103-エー
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (72) 発明者 ソ、ホンソク
 大韓民国 04322 ソウル ヨンサン
 -グ ハンガンーデロ 211 ナンバー
 101-2804

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む糖尿病及び／または高脂血症の予防または治療用薬学的組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物。

【請求項 2】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、AMPK活性化を誘導することを特徴とする請求項 1 に記載の糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物。

【請求項 3】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、PPAR- δ またはPGC-1 α の発現を誘導することを特徴とする請求項 1 に記載の糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物。

【請求項 4】

前記薬学的組成物は、インスリンをさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載の糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物。

【請求項 5】

前記薬学的組成物は、薬学的組成物全体重量部に対して、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩 20 ~ 40 重量部と、インスリン 60 ~ 80 重量部と、を含むことを特徴とする請求項 4 に記載の糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物。

【請求項 6】

ミドドリンを含む血糖降下用健康補助食品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む糖尿病及び／または高脂血症の予防または治療用薬学的組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

運動訓練は、骨格筋で表現型変化を起こすリモデリングプログラムを活性化させることにより、運動耐性を向上させ、適当な運動は、代謝性疾患や心疾患などの病理状態の好転に効果的である。

10

【0003】

特に、AMPK (AMP-activated protein kinase)、PPAR- δ (Peroxisome Proliferator activated Receptor- δ)、PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1 α) は、運動耐性のための骨格筋の表現型変化に関与する重要因子として知られている。

【0004】

この際、AMPKは、 α / β / γ サブユニットからなるヘテロ三量体 (heterotrimeric) 複合体であって、筋肉収縮及び運動時に、AMPKの上位酵素であるLKB1及びCaMKK (Ca^{2+} / calmodulin-dependent kinase kinase) によるリン酸化によって活性化され、グルコース恒常性、食欲、及び運動生理に対する細胞 / 器官代謝の主な調節子である。PPAR- δ は、骨格筋代謝の転写調節において、核心的な役割を行い、PGC-1 α は、ミトコンドリア生合成及び機能の調節子であって、エネルギー代謝に関与し、骨格筋の耐性運動によって活性化される遺伝子を調節する転写共同活性化因子である。

20

【0005】

AMPKは、同時に多様な転写プログラムをターゲティングすることができると知られているが、このような転写プログラムは、PPAR- δ 、PGC-1 α のような基質によって調節されて、運動と類似した遺伝的効果を誘発する。これと関連して、AMPK-PPAR- δ 信号経路をターゲティングする運動類似薬物が、耐性表現型に対する筋肉を再びプログラミングする新たな薬剤学的戦略になりうるという点が報告されている (非特許文献1)。

30

【0006】

また、A-769662、メトホルミン (metformin)、5-アミノイミダゾール-4-カルボキシアミド-1- β -D-リボフラノシド (AICAR) 及びレスベラトロール (resveratrol) のようなAMPK活性化を促進する幾つかの薬物が、心不全症に対して治療効果を発揮すると報告されている。心疾患に対するAMPKの保護機能は、細胞質のうち、活性酸素種生産の減少、アンジオテンシンIIの活性抑制、心臓トロポニンIのリン酸化、PGC-1 α の活性化、eNOS-NAD(P)H酸化酵素発現の調節、エストロゲン関連受容体の調節及びエネルギー均衡と心臓内信号伝達の調節などの重要な機能を通じて達成されるので、AMPK活性化は、直接・間接的に心筋機能を向上させうる。

40

【0007】

このように、AMPK活性化 (リン酸化) 及びこれと関連した因子 (PPAR- δ 、PGC-1 α) は、骨格筋内でのグルコース摂取 (uptake)、エネルギー代謝恒常性維持、心機能増大などの運動類似効果を誘導するために、運動類似効果によって治療される疾患のターゲットとして、AMPKを活性化させる薬物に対する要求が持続的にあった。

50

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Vihang A. Narkar et al., AMPK and PPAR δ Agonists Are Exercise Mimetics, Cell, Volume 134, Issue 3, 8 August 2008, Pages 405 - 415。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

10

本発明者らは、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体($\alpha 1$ -AR)をその効能剤(agonist)であるミドドリン(midodrine)を通じて活性化させる場合、糖尿病及び/または高脂血症が改善されうるということを見つけ、その作用メカニズムを鋭意研究した結果、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体が活性化されれば、活性型-AMPK、PPAR- δ 及びPGC-1 α の発現が増加し、それを通じて骨格筋、心筋、肝などの多器官で運動類似効果を起こしうるということを確認して、本発明を完成した。

【0010】

本発明の目的は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物を提供することにある。

本発明の他の目的は、有効成分であるミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩にインスリン(insulin)をさらに含む糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物を提供することにある。

20

本発明のさらに他の目的は、ミドドリンを利用した糖尿病治療方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む高脂血症の治療または予防のための薬学的組成物を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、ミドドリンを利用した高脂血症治療方法を提供することにある。

【0011】

しかし、本発明が解決しようとする技術的課題は、前述した課題に制限されず、言及されていないさらなる課題は、下記の記載から当業者に明確に理解される。

30

【課題を解決するための手段】

【0012】

一側面において、本発明は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む糖尿病の治療または予防のための薬学的組成物を提供する。

【0013】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、AMPK活性化を誘導することができる。

【0014】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、PPAR- δ またはPGC-1 α の発現を誘導することができる。

40

【0015】

前記薬学的組成物は、インスリンをさらに含む。

【0016】

前記薬学的組成物は、薬学的組成物全体重量部に対して、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩20~40重量部；及びインスリン60~80重量部；を含む。

【0017】

一態様において、本発明は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を薬剤学的に有効な量で個体に投与する段階を含む糖尿病治療方法を提供する。

【0018】

50

他の態様において、本発明は、糖尿病治療または予防のための薬剤製造のためのミドドリンの用途を提供する。

【0019】

他の側面において、本発明は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む高脂血症の治療または予防のための薬学的組成物を提供する。

【0020】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、AMPK活性化を誘導することができる。

【0021】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、PPAR- δ またはPGC-1 α の発現を誘導することができる。

【0022】

一態様において、本発明は、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を薬学的に有効な量で個体に投与する段階を含む高脂血症治療方法を提供する。

【0023】

他の態様において、本発明は、高脂血症治療または予防のための薬剤製造のためのミドドリンの用途を提供する。

【0024】

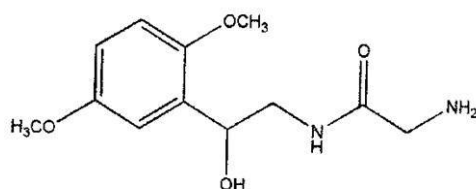
本発明において、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体($\alpha 1$ -AR)効能剤は、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体に作用して活性化させる物質であれば、特に制限はない。アドレナリン受容体は、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β という3種のタイプがあり、本発明では、 $\alpha 1$ タイプの受容体を活性化させる公知の化合物を制限なしに利用することができるが、望ましくは、ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩であり得る。

【0025】

ミドドリン化合物は、アマチン(amatine)、プロアマチン(proamatine)、グترون(gutron)などの商標名で販売され、そのIUPAC名は、(RS)-N-[2-(2,5-ジメトキシフェニル)-2-ヒドロキシエチル]グリシンアミド((RS)-N-[2-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-hydroxyethyl]glycinamide)であって、下記化学式Iで表示される。

【0026】

【化1】



【0027】

ミドドリンは、投与後、生体内で目的化合物に変化される薬物前駆体(prodrug)であり、生体内投与後、活性代謝産物であるデスグリミドドリン(desglymidodrine)に変化されて、 $\alpha 1$ -アドレナリン受容体を活性化させ、引き続きAMPK活性化、PPAR- δ 、またはPGC-1 α の発現を誘導を通じて最終的に運動類似効果を誘導することができる。

【0028】

前記化学式1で表される化合物は、「薬学的に許容可能な塩」を形成しうる。適した薬学的に許容可能な塩は、酸付加塩のように、本発明が属する技術分野で通常使われるものであって、特に制限されるものではない。望ましい薬学的に許容可能な酸付加塩としては、例えば、塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、過塩素酸、または臭素酸のような無機酸；酢酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、フマル酸、マイレン酸

10

20

30

40

50

、マロン酸、フタル酸、コハク酸、乳酸、クエン酸、シトロン酸、グルコン酸、酒石酸、サリチル酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、エンボン酸、アスパラギン酸、またはグルタミン酸のような有機酸が挙げられる。有機塩基付加塩の製造に使われる有機塩基としては、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン、ジシクロヘキシルアミンなどを例として挙げられる。アミノ酸付加塩基の製造に使われるアミノ酸としては、アラニン、グリシンなどの天然アミノ酸を例として挙げられる。

【 0 0 2 9 】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、AMPK活性化を誘導するものである。

AMPKは、生体内エネルギー状態を感知して、それを一定のレベルに保持させるエネルギーセンサー（energy sensor）の役割を行い、例えば、代謝性ストレスや運動によって細胞内のエネルギーが減少する場合、すなわち、ATPが枯渇してAMP/ATP比率が増加する場合に活性化されて、ATPを消費する過程（例えば、脂肪酸酸化と当該過程）を促進する。AMPKの活性化は、筋肉のような主要標的臓器に代謝的に重要な結果を誘導するが、特に、骨格筋で脂肪酸の酸化と糖吸収とを促進すると知られている。

【 0 0 3 0 】

前記ミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩は、PPAR- δ またはPGC-1 α の発現を誘導するものである。

PPAR- δ は、AMPKを調節して細胞内異化的エネルギー代謝を促進し、抗炎症作用など生体代謝の均衡（恒常性）保持に必須的な役割を行うと知られている。

【 0 0 3 1 】

PGC-1 α は、ミトコンドリア増殖の主な調節物質であって、運動、飢え、寒さのような激しい代謝的变化に反応して発現が誘導され、AMPK、PPAR- δ 、NAD-dependent deacetylase sirtuin-1（SIRT1）などの調節を受けると知られている。

【 0 0 3 2 】

本発明による有効成分は、運動類似効果を誘導し、前記運動類似効果は、AMPK活性化が必要な疾患の予防または治療効果であり得る。

本発明において、運動類似効果とは、筋肉のインスリン鋭敏度増加及び酸化リン酸化機能増進、心臓機能改善（収縮力増加）、酸化リン酸化機能増進、コレステロール減少、脂肪蓄積及び体重減少など運動時に発揮される生理効果を意味し、特に制限はない。

【 0 0 3 3 】

本発明において、AMPK活性化が必要な疾患とは、AMPKの非活性化によって生じる多様な疾患であって、特に制限はなく、例を挙げれば、糖尿病及び/または高脂血症を含む代謝性疾患であり得る。

【 0 0 3 4 】

本発明において、「薬学的組成物」は、既存の治療活性成分、その他の補助剤、薬剤学的に許容可能な担体などの成分をさらに含みうる。前記薬剤学的に許容可能な担体は、食塩水、滅菌水、リンゲル液、緩衝食塩水、デキストロース溶液、マルトデキストリン溶液、グリセロール、及びエタノールなどを含む。

【 0 0 3 5 】

前記組成物は、それぞれ通常の方法によって、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアロゾルなどの経口型剤形、外用剤、座剤及び滅菌注射溶液の形態で剤形化して使われる。

【 0 0 3 6 】

本発明において、「投与量」は、患者の体重、年齢、性別、健康状態、食餌、投与回数、投与方法、排泄率及び疾患の重症度などによって、その範囲が多様に調節されうるということは当業者には明白である。

【 0 0 3 7 】

10

20

30

40

50

本発明において、「個体」とは、疾病の治療を必要とする対象を意味し、より具体的には、ヒトまたは非ヒトである霊長類、マウス (mouse)、ラット (rat)、犬、猫、馬及び牛などの哺乳類を意味する。

【0038】

本発明において、「薬学的有効量」は、投与される疾患の種類及び重度度、患者の年齢及び性別、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出比率、治療期間、同時使われる薬物を含んだ要素、及びその他の医学分野によく知られた要素によって決定され、前記要素をいずれも考慮して副作用なしに最大効果が得られる量で、当業者によって容易に決定されうる。

【0039】

本発明の組成物は、目的組織に到達することができる限り、「投与方法」には制限もない。例を挙げれば、経口投与、動脈注射、静脈注射、経皮注射、鼻腔内投与、経気管支投与または筋肉内投与などが含まれる。一日投与量は、約 0.0001 ~ 100 mg / kg であり、望ましくは、0.001 ~ 10 mg / kg であり、一日一回ないし数回分けて投与することが望ましい。

【0040】

本発明の一実施例において、ミドドリン及びインスリンを混合投与時に、細胞内ブドウ糖吸収が増加して、糖尿病の予防または治療に有効であることを確認した。

【0041】

本発明の一実施例では、 $\alpha 1$ -AR 刺激効果が、心筋細胞、骨格筋細胞で運動類似遺伝子の発現に及ぼす効果を分析し、それをヒトの代謝症候群と類似した症状を示す動物である自発性高血圧ラット (SHR) を使用して、インビボ (in vivo) で心臓、骨格筋及び肝に及ぼす効果と比較した。

その結果、ヒトの代謝症候群に該当する自発性高血圧ラット (SHR) は、ミドドリンによって $\alpha 1$ -AR を刺激時に、心臓、骨格筋、肝で AMPK、PPAR- δ 、PGC-1 α の活性化及び発現増加を引き起こすという事実を明らかにした。

【0042】

また、 $\alpha 1$ -AR 刺激時に、心筋で AMPK 刺激に対する PPAR- δ 及び PGC-1 α の活性化の比率が、骨格筋と肝での数値よりもさらに高いことを確認した。このような結果は、運動類似 AMPK-PPAR- δ の活性化と関連し、 $\alpha 1$ -AR 刺激による筋肉収縮効果とは独立したことを意味し、薬理学的に刺激された心筋収縮作用が心臓 AMPK-PPAR- δ -PGC-1 α の活性化に寄与するという点を初めて報告したものである。

【0043】

本発明では、インビトロ (in vitro) 及びインビボ実験を通じて、筋肉運動とは無関係に、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR 刺激が骨格筋で AMPK-PPAR- δ -PGC-1 α の発現を活性化させるという点を初めて明らかにした。このような運動関連遺伝子発現が、持続的運動 (endurance exercise) を保持するための適応反応のうちの 1 つであるという点に対しては既に報告されている。

【0044】

本発明では、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR 刺激時に、肝で AMPK-PPAR- δ -PGC-1 α の活性化が誘導されることを確認した。本発明は、ミドドリンとインスリンとの複合投与によってブドウ糖吸収が増加するということを確認したので、これにより、糖尿病の予防または治療に有効であるということが分かる。

【0045】

さらに、既存の糖尿病治療剤は、副作用として体重増加及び心不全が発生したが、ミドドリン使用時には、血糖減少と共に体重減少、心不全の予防及び抗炎症効果が共に発揮されて、既存の糖尿病治療剤に比べて糖尿調節に非常に有利である。

【0046】

本発明では、 $\alpha 1$ -AR 効能剤であるミドドリンが、 $\alpha 1$ -AR 刺激によって AMPK

10

20

30

40

50

を活性化させるものと独立して、PPAR- δ 及びPGC-1 α の発現を増加させて心臓機能を向上させることを確認したので、これは、運動訓練が心臓断片短縮を40～50%まで増加させ、収縮及び弛緩両者の速度をいずれも向上させるためである。

したがって、 $\alpha 1$ -AR効能剤は、心臓収縮の直接的刺激に対する三重効果及びその運動効果を通じて、また、心臓、筋肉及び肝を含む多器官での $\alpha 1$ -AR刺激による運動類似AMPK-PPAR- δ の活性化という間接的効果を通じて心臓機能を向上させることにより、インビボで運動耐性の向上に寄与すると判断される。

【0047】

このように、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR刺激によってAMPK-PPAR- δ の活性化という心臓運動類似効果が表われ、付加的にPPAR- δ 及びPGC-1 α の発現増加という他の運動類似プログラムを作動させるAMPK-独立的心臓運動効果が表われるという事実は、本発明で初めて明らかにしたものである。

10

【0048】

本発明の一実施例では、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR刺激効果が、心筋細胞、骨格筋細胞で運動類似遺伝子の発現に及ぼす効果を分析し、それをヒトの代謝症候群と類似した症状を示す動物である自発性高血圧ラット(SHR)を使用して、インビボで心臓、骨格筋及び肝に及ぼす効果と比較した。

また、 $\alpha 1$ -AR刺激効果が、心臓機能/サイズ、アディポネクチン及び脂肪レベルなどに及ぼす効果を観察した。

【0049】

20

その結果、ヒトの代謝症候群に該当する自発性高血圧ラット(SHR)は、ミドドリンによって $\alpha 1$ -ARを刺激時に、心臓、骨格筋、肝でAMPK、PPAR- δ 、PGC-1 α の活性化及び発現増加を引き起こし、心臓肥大または追加的な血圧上昇なしに心臓収縮性を増加させるという事実を明らかにした。

【0050】

また、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR刺激時に、血液でコレステロールレベルが減少し、心筋でAMPK刺激に対するPPAR- δ 及びPGC-1 α の活性化の比率が、骨格筋と肝での数値よりもさらに高いことを確認した。このような結果は、運動類似AMPK-PPAR- δ の活性化と関連し、 $\alpha 1$ -AR刺激による筋肉収縮効果とは独立したことであることを意味し、薬理的に刺激された心筋収縮作用が心臓AMPK-PPAR- δ -PGC-1 α の活性化に寄与するという点を初めて報告したものである。

30

【0051】

また、本発明では、ミドドリンが、他の運動類似効果誘発薬物(アテノロール)に比べて、さらに効果的であるという事実を明らかにした。これは、ミドドリンが心臓収縮性を向上させる二重効果を有する一方に、他の薬物は、心臓筋肉収縮に対する直接的なエネルギー代謝作用なしに運動類似効果のみを発揮するためである。また、他の運動類似剤は、それぞれの機能を高めるために、多様な薬物を混合して使われているが、 $\alpha 1$ -AR効能剤は、一種の物質でも、このような運動効果を多器官に同時多発的に表わすという長所がある。

【0052】

40

また、本発明では、ミドドリンで処理されたラットで左心室拍出係数がアテノロール処理された動物ほど増加したが、心臓でのリン酸化されたAMPKは、実験グループの間に差があることを明らかにした。 $\alpha 1$ -ARが心臓に対して友好的な効果を表わすにもかかわらず、 $\alpha 1$ -AR刺激の程度が長期的予後面では重要であると判断されるが、これは、心臓 $\alpha 1$ -ARドライブの高度に持続した補強が収縮性機能障害、漸進的繊維化及び母細胞タンパク質遺伝子の再活性化に対して病理的リモデリングを引き起こすためである。

【0053】

また、本発明では、 $\alpha 1$ -AR刺激にもかかわらず、心臓肥大が表われないということを明らかにし、さらに、本発明によれば、左心室質量は、アテノロール処理された群よりもミドドリン処理された群でさらに小さく、これは、心臓ATI発現の差として説明さ

50

れる。

【 0 0 5 4 】

また、本発明では、インビトロ及びインビボ実験を通じて、筋肉運動とは無関係に、 $\alpha 1$ -AR刺激が骨格筋でAMPK-PPAR- δ -PGC-1 α の発現を活性化させるという点を初めて明らかにした。このような運動関連遺伝子発現が、持続的運動を保持するための適応反応のうちの1つであるという点に対しては既に報告されている。

【 0 0 5 5 】

また、本発明では、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR刺激時に、肝でAMPK活性化が誘導され、総コレステロール、LDL-コレステロール、及びHDL-コレステロールレベルが著しく減少するということを確認したので、これにより、高脂血症の予防または治療に有効であるということが分かる。

10

【 0 0 5 6 】

また、本発明では、ミドドリンを通じる $\alpha 1$ -AR刺激時に、脂肪細胞内脂肪含有量が減少し、脂肪合成/蓄積が抑制され、体重及び腹部脂肪が減少するということを確認した。

【 0 0 5 7 】

さらに、高脂血症に対する効果は、コレステロール低下剤であるスタチン(statin)が副作用として糖尿が来ることとは異なって、ミドドリン使用時に、コレステロールの減少と共に糖尿が予防になるので、副作用がなく、効果に優れた新たな高脂血症治療剤として適用することができる。

20

【 0 0 5 8 】

さらに他の側面において、本発明は、ミドドリンを含む血糖降下用健康補助食品を提供する。

【 0 0 5 9 】

さらに他の側面において、本発明は、ミドドリンを含む高脂血症改善用健康補助食品を提供する。

【 0 0 6 0 】

本発明の健康補助食品は、ミドドリンに各種の副材料及び食品添加物が添加される。この際、健康補助食品は、食品総重量でミドドリンを0.1~90重量%を含有することができる。

30

【 0 0 6 1 】

食品添加物として、例えば、単糖類、二糖類、多糖類、糖アルコールなどの糖類と、タウマチン、ステビア抽出物、サッカリン、アスパルテームなどの香味剤と、栄養剤、ビタミン、食用電解質、風味剤、着色剤、増進剤(例、チーズ、チョコレートなど)、ペクチン酸、アルギン酸、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸化剤などが用いられうる。

【 0 0 6 2 】

本発明の健康補助食品は、多様な形態で剤型が可能なので、その形態は、特に制限されるものではない。したがって、飲物、顆粒、錠剤、パウダー、丸、カプセルのうちから選択された何れか1つの剤型で形成されうる。飲物、顆粒、錠剤、パウダー、丸、カプセルの剤型を有する健康補助食品は、携帯が簡便であり、いつでもどこでも随時に摂取することが容易である。

40

【 0 0 6 3 】

本発明の健康補助食品の剤型の一例として、飲物は、ミドドリン0.1~40重量%、精製水60~99.9重量%に組成される。また、飲物に添加物としてタウリン、クエン酸、ビタミンCなどをさらに添加することができる。

【 0 0 6 4 】

それ以外にも、通常の飲物のように、さまざまな香味剤が追加成分として含有されうる。香味剤としてタウマチン、ステビア抽出物などの天然香味剤を使用することができる。

【 0 0 6 5 】

50

顆粒、錠剤、パウダー、丸、カプセルなどの剤型は、ミドドリンを1～50重量%を含有し、その他の粘着剤、香味料、ビタミン、炭水化物などをさらに含有することができる。

【発明の効果】

【0066】

本発明のミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む組成物は、生体内エネルギー代謝活性保持と調節とに核心的な作用を行うp-AMPK、PPAR- δ 、PGC-1 α の発現を増加させることにより、骨格筋細胞内へのブドウ糖吸収率を高め、ミトコンドリアの代謝障害を調節することができるので、糖尿病の予防及び治療に有用に用いられる。

10

【0067】

また、本発明のミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩を有効成分として含む組成物は、脂肪細胞内脂肪含有と脂質蓄積とを抑制し、腹部脂肪量と体重とを減少させるだけでなく、ミトコンドリアの代謝障害を調節することができるので、高脂血症の予防及び治療に有用に用いられる。

【0068】

また、本発明のミドドリンは、血糖降下及び/または高脂血症改善用健康補助食品として用いられる。

【図面の簡単な説明】

【0069】

20

【図1】図1の(A)及び図1の(B)は、それぞれマウス骨格筋細胞株(C2C12)とマウス心筋細胞株(HL1)で、ミドドリンによって $\alpha 1$ -アドレナリン受容体($\alpha 1$ -AR)を活性化させる場合、AMPK活性化型(リン酸化型)であるp-AMPK及びPPAR- δ のタンパク質発現が増加することを示すウェスタンブロットの結果である。

【図2A】基底4週齢対照群ラット(I)、ミドドリン投与ラット(II)、アテノロール投与ラット(III)及び未投与8週齢対照群ラット(IV)の骨格筋で $\alpha 1$ -ARのタンパク質発現状態をウェスタンブロットングで確認した結果である。

【図2B】図2Bないし図2Eは、前記ラットグループの心筋、骨格筋、脂肪及び肝のそれぞれでAMPK-PPAR- δ -PGC-1 α のタンパク質発現状態をウェスタンブロットングで確認した結果である。

30

【図3A】基底4週齢ラット(I)、ミドドリン投与ラット(II)、アテノロール投与ラット(III)及び未投与8週齢対照群ラット(IV)の骨格筋でSDH(succinate dehydrogenase)酵素活性度を測定した結果である。

【図3B】前記グループの骨格筋組織で、シトクロムcオキシダーゼ(cytochrome c oxidase)に対する免疫組織化学染色した結果である。

【図4】基底4週齢ラット(I)、ミドドリン投与ラット(II)、アテノロール投与ラット(III)及び未投与8週齢対照群ラット(IV)の心筋、骨格筋及び肝でELISA方法でATPレベルを測定した結果である。

【図5】マウス骨格筋細胞(C2C12細胞)でインスリンのブドウ糖吸収に及ぼすミドドリン効果を確認した結果である。

40

【図6】4週齢ラットからなる3つのグループの1ヶ月間心拍数を測定した結果である。

【図7】ラットグループの肝でHMG-CoA reductaseタンパク質(HMGCR)の発現レベルを確認した結果である。

【図8】図8Aは、脂肪細胞内脂肪含有量、図8Bは、脂肪合成/蓄積を抑制するPPAR- δ 、p-AMPK、PGC-1 α のタンパク質発現に及ぼすミドドリン効果を確認した結果である。

【図9】図9Aは、体重、図9Bは、腹部脂肪量に及ぼすミドドリン効果を確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0070】

50

以下、本発明の理解を助けるために、実施例を挙げて詳細に説明する。但し、下記の実施例は、本発明の内容を例示するものであり、本発明の範囲が、下記の実施例に限定されるものではない。本発明の実施例は、当業者に本発明をより完全に説明するために提供されるものである。

【0071】

実施例1：細胞培養及び動物実験準備

1-1：細胞培養

ラット骨格筋細胞株(L6)、マウス心筋細胞株(HL1)及びマウス脂肪前駆細胞株(3T3-L1)は、37℃ CO₂培養器内で6ウェルプレート(well plate)あるいは24ウェルプレートに各細胞を分注した。

10

【0072】

以後、L6及びHL1細胞は、10% FBS(fetal bovine serum)、1%抗生剤を含む培地(DMEM)で培養皿の底に80%程度飽和されるまで育てた後、培地を1% FBSを含む培地に取り替えて、4日間分化させるが、分化3日目に薬物を処理した。L6及びHL1細胞を利用したあらゆるインビトロ実験は、薬物処理後、24時間後に行った。

【0073】

3T3-L1細胞は、10% FBS、1%抗生剤を含む培地(DMEM)で培養皿の底に100%まで満ちるように育てた後、新たな培地に取り替えた後、48時間さらに培養した後、分化培地と薬物を入れ、48時間培養した。分化培地の組成は、次の通りであった；0.0125 µmol/Lデキサメタゾン(dexamethasone)、12.5 µmol/L 3-イソブチル-1-メチルキサンチン(3-isobutyl-1-methylxanthine)、10 µg/mLインスリン、10% FBS。48時間分化培地を処理した後、10 µg/mLインスリンと10% FBSとを含有したインスリン培地に取り替え、48~96時間処理した。以後、10% FBSのみを含有した一般培地に取り替え、24~48時間培養後、実験した。

20

【0074】

1-2：動物実験

自発性高血圧ラット(Spontaneously Hypertensive Rat; SHR)は、遺伝性高血圧が発現される実験動物であって、ヒトの原発性高血圧と最も類似した高血圧を発現させると知られている。SHRは、ほとんど4~6週齢に血圧が上昇し始めて、8~12週齢に本格的な高血圧が発現される。SHRは、心肥大、心不全及び腎障害のような高血圧性標的臓器の損傷をよく伴うために、原発性高血圧、特に、心臓病変を有した高血圧に対する動物モデルとして関連研究に幅広く使われている。

30

【0075】

3週齢の自発的高血圧ラット(SHRs)を標準化された条件(21℃、41%~62%の湿度)下で放置するが、規則的な昼/夜(10/14時間)サイクルを加え、水及び餌に自在に近づくようにした。あらゆる動物実験は、大韓民国の高麗大学校動物科学規則に符合するように行った(KUIACUC-2012-100)。実験過程及び収容条件は、高麗大学校動物実験委員会の承認を受けた。

40

【0076】

適応1週後に、ラットは、下記のように、4個群のうち1つ(群当たり6匹ラット)に割り当てた：グループI(基底対照群(basal control)、4週齢に犠牲)、グループII(4週間ミドドリン投与)、グループIII(4週間アテノロール(atenolol)投与)、及びグループIV(4週間薬剤投与ない対照群(control))。グループI及びグループIVは、如何なる薬物の投与なしに標準保持の餌を与え(K-H4ペレット、sniff)、グループIIは、ミドドリンを含む飲用水(0.3 mg/kg/d)と共に同じ餌を与え、グループIIIは、アテノロールを含む飲用水(1 mg/kg/d)と共に同じ餌を与えた。

【0077】

50

グループⅠ中のラットは、4週齢で安楽死させた一方、他のグループのラットは、4週間薬物を処方した後、8週齢で安楽死させた。血液サンプルは、下大静脈から採取し、心臓、大動脈、肝、骨格筋肉、及び内臓脂肪（腹部脂肪）は、きれいに切開して実験に使用した。回収された臓器は、-80℃冷蔵庫または浸漬固定のための10%ホルマリンで保管した。

【0078】

実施例2：実験方法

2-1：ATP測定のためのELISA方法

実施例1-2のラットから分離した肝組織0.02gを500μLのPBS中で均質化した。均質液を1500μg（または、5000rpm）で15分間遠心分離した以後に、上澄み液に対して測定を行った。基準物質またはサンプル100μLを抗体予めコーティングされたマイクロ適正プレート中の適当なウェルに注いだ後、残余溶液10μLをサンプルに添加した。50μLのコンジュゲートを各ウェルに添加し、混合した後、カバーを覆ったプレートを37℃で1時間培養した。それぞれ50μLの基質A及びBをそれぞれのウェルに添加し、37℃で15分間培養した。それぞれのウェルに停止液を添加した後、マイクロプレート判読器を使用して450nmで光学密度を測定した。

【0079】

2-2：SDH酵素活性度の測定

ウェル内PBS（phosphate buffer saline）溶液1ml当たりタンパク質分解酵素阻害剤カクテル10μLを添加して、ウェル当たり500μLになるように準備し、1Mリン酸緩衝溶液25μL×25=625μL、0.2Mコハク酸ナトリウム125μL×25=3125μL、NBT 25μL×25=625μL、D.W 235μL×25=5875μLを混ぜて作った培養溶液をウェル当たり410μLになるように準備して、反応20分前に37℃に温めておいた。実施例1-2のラットから分離した骨格筋肉組織0.02g当たり、前記であらかじめ準備したPBS 500μLを入れ、破砕機で磨くが、短い時間分けて磨いて、温度が上昇して酵素が破壊されないように準備した。13000rpm、4℃で5分間遠心分離後、上澄み液を収得して新たなチューブに移した。培養溶液410μLをあらかじめチューブに入れて置き、サンプル90μLを入れて酵素反応させた。さらに他のチューブに蒸留水（DW）410μLを入れ、サンプル90μLを添加した後、希釈液の吸光度を測定した。予め準備した酵素反応のチューブと他のチューブとをそれぞれ37℃水湯煎に入れ、30分間反応させ、氷にチューブを挿入して反応を終了させた後、96ウェルプレートに200μLずつ分注して、吸光度550nmで測定し、結果値を次のような式に適用して、コハク酸デヒドロゲナーゼ（SDH）の酵素活性度を計算した。

【0080】

酵素活性度 = (酵素反応吸光度値 - 酵素液希釈液吸光度値) / タンパク質定量値 (ブラッドフォード595nm)

【0081】

2-3：ウェスタンブロット

タンパク質は、細胞からPREPTMタンパク質抽出溶液（iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Korea）を用いて収得した後、タンパク質20~30μgを10% SDS-PAGE（SDS-polyacrylamide gel electrophoresis）ゲル上にローディングして分離し、ニトロセルロースペーパー（GE Healthcare、イギリス）にトランスファー（transfer）した。メンブレンは、5%（w/v）スキムミルク、0.05%（v/v）Tween-20を含むTBS（Tris-buffered saline）で4℃で一晩または室温で2時間ブロッキング（blocking）した後、AMPKα（全体形態のαサブユニット）、リン酸化されたAMPKα（Thr172でリン酸化）、PPAR-δ及びPGC-1αに対する1次抗体（Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA）

を投入し、室温で2時間または4 で一晩培養した後、ワサビダイコン過酸化酵素 (horseradish peroxidase) が結合された抗ウサギ2次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) で反応させた。検出試薬 (detection reagent) としてClarity Western ECL Substrateキット (Bio-rad, Hercules, CA, USA) を利用した。映像は、Kodak GBX現像及び固定試薬 (Kodak, Rochester, NY, USA) を使用して手動で取得した。X線フィルムは、Agfa (Mortsel, Belgium) から購入した。細胞由来の各タンパク質の含量は、ブラッドフォード法を使用して測定した。

【0082】

10

2 - 4 : 細胞内ブドウ糖吸収率の測定

実施例1 - 1の方法で培養したマウス骨格筋細胞 (C2C12細胞) にインスリン100 $\mu\text{M}/\text{L}$ 、ミドドリン30 $\mu\text{M}/\text{L}$ 、ミドドリン30 $\mu\text{M}/\text{L}$ 及びインスリン100 $\mu\text{M}/\text{L}$ の混合物 (1 : 2 (w/w)) をそれぞれ処理した後、2 - デオキシブドウ糖 (2 - deoxy glucose) でブドウ糖吸収 (uptake) レベルを測定した。

【0083】

2 - 5 : 心臓機能及び体重測定

実施例1 - 2の8週齢ラットにゾレチル (zoletil) (8 mg/kg) 及びキシラジン (xylazine) (2 mg/kg) を筋肉注射して麻酔させた後、ラットを左側に寝かせ、Mモードエコー映像を得た。あらゆる検査は、12 MHz トランスデューサを備えたvivid 7 (GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA) を使用して行った。乳頭筋レベルで左心室に対する最適2次元短縮映像を獲得した以後に、Mモードトレーシングを行う同時に心電図記録を行いながら、100 mm/s の速度で記録した。Mモードトレーシングに対する少なくとも3回連続心臓サイクルからエコー心超音波検査を用いて (American Society for Echocardiography) 測定方法を適用して、心臓壁の厚さ、左室駆出率 (収縮機能) 及び質量を測定した。

20

【0084】

体重は、前記心臓機能を測定したラットと同じラットを対象にして測定した。また、実施例1 - 2の4週齢ラットを対象にして1ヶ月にわたって心拍数を測定した。

30

【0085】

2 - 6 : 血液生化学及びアディポネクチンの測定

実施例1 - 2のラット由来の血液から総コレステロール、HDL (high density lipoprotein) コレステロール、LDL (low density lipoprotein) コレステロール、及びトリグリセリドの濃度を測定するために、酵素発色法 (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim, Germany) を使用した。

【0086】

実施例1 - 2のラット由来の血液内アディポネクチンは、ラットアディポネクチン検出ELISAキット (Abcam, Cambridge, UK) を使用して測定した。測定されたアディポネクチンレベルは、内臓脂肪重量 (g) に対して定量した。

40

【0087】

2 - 7 : 脂肪細胞脂肪含有の抑制確認

実施例1 - 1の方法で培養したマウス由来の脂肪前駆細胞 (3T3-L1) を脂肪細胞に分化させた後に、ミドドリン30 $\mu\text{M}/\text{L}$ 、ミドドリン30 $\mu\text{M}/\text{L}$ 及びGSK0660 (PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) β/δ inverse agonist) 50 $\mu\text{M}/\text{L}$ の混合物 (1 : 2 (w/w)) をそれぞれ処理した後、脂肪細胞内脂肪含有程度を顕微鏡 (OLYMPUS IX71) を用いて肉眼で観察した。

【0088】

50

2 - 8 : 統計的分析

連続的変数は、平均 ± 標準偏差 (SD) で記録した。4 個群にわたった変数の全般的差値は、Kruskal-Wallis テストを使用して分析した。2 つの群の間の差値は、Mann-Whitney U - テストを使用して評価した。0.05 未満の p - 数値は、統計的に有意なものと見なした。あらゆる統計的分析は、SPSS (ver. 20.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用して行った。

【0089】

実施例 3 : 実験の結果

3 - 1 : インビトロで骨格筋細胞または心筋細胞にミドドリン投与時に、AMPK のリン酸化に対する効果の検定

AMPK 及び AMPK リン酸化 (活性化) に対する $\alpha 1$ - AR 刺激効果をインビトロで確認するために、実施例 1 - 1 で培養したマウス骨格筋細胞株 (C2C12) とマウス心筋細胞株 (HL1) とに $\alpha 1$ - AR 効能剤であるミドドリン 30 μ M を処理した後、実施例 2 - 3 の方法でウェスタンブロットを行った。

【0090】

その結果、図 1 の (A) 及び図 1 の (B) に示すように、骨格筋細胞の AMPK が $\alpha 1$ - AR 刺激によって発現され、リン酸化された AMPK 発現がミドドリンの濃度によって増加したので、 $\alpha 1$ - AR 刺激が AMPK の活性化に関与するということが分かった。また、ミドドリン投与による $\alpha 1$ - AR 刺激は、骨格筋の以外に心筋細胞でも同じ態様で AMPK の発現及びリン酸化反応が表われた。

【0091】

このように、骨格筋肉でミドドリンが作用して表われる変化 (AMPK 活性化) が心筋でも、既存に知られた心筋収縮機能向上と共に表われるので (AMPK 活性化 + 心筋収縮増加)、 $\alpha 1$ - AR 刺激で追加的な心筋運動効果が表われているということが分かった。すなわち、インビトロ実験で、今までは単純に心筋細胞の収縮力のみ増加する可能性のみ知られているが、本実施例による結果では、骨格筋及び心筋細胞で AMPK 増加及びリン酸化が増加して運動効果関連作用が予想された。

【0092】

3 - 2 : 心筋、骨格筋、脂肪及び肝で AMPK、PPAR- δ 、PGC-1 α のタンパク質発現の検定

骨格筋で $\alpha 1$ - AR の存在を確認するために、基底 4 週齢対照群ラット (I)、ミドドリン投与ラット (II)、アテノロール投与ラット (III) 及び未投与 8 週齢対照群ラット (IV) の骨格筋で $\alpha 1$ - AR のタンパク質発現状態を実施例 2 - 3 の方法でウェスタンブロットングを行って確認した結果、図 2 A に示すように、グループ IV で $\alpha 1$ - AR が最も高い発現を示した。

【0093】

また、前記 4 個群のラット由来の心筋、骨格筋、脂肪及び肝で AMPK、PPAR- δ 、PGC-1 α のタンパク質の発現状態をそれぞれ実施例 2 - 3 の方法でウェスタンブロットングを行って確認した結果、図 2 B (心筋)、図 2 C (骨格筋)、図 2 D (脂肪) 及び図 2 E (肝) に示すように、心筋の場合に、リン酸化された AMPK タンパク質の発現は、グループ I がグループ IV よりも高く ($p < 0.05$)、ミドドリン投与グループ II は、対照群グループ IV よりも心筋、骨格筋、脂肪で顕著に高い AMPK 発現を示したが、アテノロール投与グループ III は、同じ年齢の対照群グループ IV と比較する時、当該器官でさらに高い AMPK タンパク質の発現を示していない。

【0094】

特異な点は、心筋では、AMPK 増加に比べて、PGC-1 α と PPAR- δ との増加が遥かに大きい、骨格筋では、AMPK 増加に比べて、PGC-1 α と PPAR- δ との増加が遥かに少ないという点である。これは、心筋の運動効果が、AMPK 活性化と共に直接に PGC-1 α と PPAR- δ との発現を増加させるのに対して、骨格筋は、運動を相対的に多くしていなかったために、比較的 AMPK に比べて、PGC-1 α と PPA

10

20

30

40

50

R - δ とが増加しないということを意味する。

【0095】

3 - 3 : 骨格筋のミトコンドリア酸化酵素の発現変化

ミトコンドリア酸化過程 (TCA 回路) 酵素である SDH 酵素活性度を骨格筋で実施例 2 - 2 の方法で測定した結果、図 3 A に示すように、ミドドリン投与グループ II で最も高く増加するということが分かった。

【0096】

また、ミトコンドリア酸化過程酵素であるシトクロム c オキシダーゼ酵素に対して骨格筋組織で免疫組織化学染色した結果、図 3 B に示すように、ミドドリン投与グループ II で最も高く増加するということが分かった。

10

このような結果から、ミドドリンが、代謝作用を増進させるということが分かった。

【0097】

3 - 4 : 組織内 ATP レベルの比較

基底 4 週齢ラット (I)、ミドドリン投与したラット (II)、アテノロール投与ラット (III) 及び未投与 8 週齢対照群ラット (IV) に対して、心臓、骨格筋及び肝で ATP レベルを ELISA 方法を用いて実施例 2 - 1 の方法で測定して比較した。その結果、図 4 に示すように、ミドドリンまたはアテノロール投与グループの心臓組織では、ATP レベルが、心臓のさらに高い収縮活性にもかかわらず、対照群 SHRs の数値よりも高く観察された。

【0098】

20

3 - 5 : 細胞内ブドウ糖吸収の効果の検定

マウス骨格筋細胞 (C2C12 細胞) でインスリンのブドウ糖吸収に及ぼすミドドリン効果を確認した結果、図 5 に示すように、インスリン単独よりもインスリンとミドドリンとの混合物を処理する場合、ブドウ糖吸収率が著しく増加するということを確認した。このような結果から、ミドドリンが、糖尿病治療に有効であるということが分かった。

【0099】

3 - 6 : インビボ動物モデルで心臓機能及び体重に対するミドドリン投与効果の検定

ミドドリン投与時に、インビボ心臓筋でも、AMPK、PPAR - δ 及び PGC - 1 α が増加するならば、骨格筋で運動効果が既に証明された AMPK - PPAR - δ - PGC - 1 α の同時発現カスケードが心筋収縮機能向上に影響を与えると見なすことができるので、実施例 2 - 5 の方法でインビボで心臓機能及び体重を確認した。

30

その結果、下記表 1 に示すように、8 週齢ラットのエコー心拍動データから、ミドドリン投与ラットグループ II 及びアテノロール投与ラットグループ III の左心室性能が、未投与対照グループ IV の当該数値よりもさらに高いと表われた。

【0100】

左心室質量は、グループ II で最も低かったが、心臓質量は、グループの間で有意な差異点が観察されず、グループ III が最も高い体重を示した。

また、4 週齢のラットからなる 3 個のグループ (青色 : 対照群、赤色 : ミドドリン投与群、緑色 : アテノロール投与群) で 1 ヶ月にわたって心拍数を測定した結果、実験の末尾にアテノロールグループで最も低かった (図 6)。

40

【0101】

【表 1】

パラメータ	ミドドリン (グループⅡ)	アテノロール (グループⅢ)	対照群 (グループⅣ)	p-数値
拡張期左心室隔膜、mm	1.46±0.13 ^a	1.50±0.13 ^a	1.45±0.11 ^a	0.3256
拡張期左心室後壁、mm	1.54±0.13 ^a	1.67±0.16	1.54±0.15 ^a	0.0046
拡張期左心室内部サイズ、mm	6.06±0.42 ^a	6.33±0.35 ^a	6.37±0.72 ^a	0.1082
収縮期左心室内部サイズ、mm	3.32±0.54 ^a	3.43±0.28 ^a	3.82±1.01	0.0445
左心室区画短縮率、%	45.48±6.25 ^a	45.70±5.82 ^a	38.77±8.59	0.0019
左心室拍出係数、%	81.55±6.12 ^a	82.00±5.31 ^a	73.87±10.13	0.0007
ASEによる左心室質量、g	1.04±0.06	1.10±0.07 ^a	1.07±0.12 ^a	0.0313
体重、g	238.24±11.69 ^a	296.46±16.73 ^b	236.20±7.58 ^a	0.009
心臓重量、g	1.47±0.16 ^a	1.47±0.15 ^a	1.78±0.35 ^a	0.062

10

【0102】

20

3-7: アディポネクチン発現及び脂肪プロファイルに対するミドドリン投与効果の検定
ミドドリンの臓器投与が、アディポネクチン (adiponectin) 発現及び脂肪プロファイルに及ぼす効果を実施例 2-6 の方法で確認した。

α1-AR 刺激が如何に AMPK を活性化させるかを確認するために、AMPK の上流分子であるアディポネクチンレベルを測定した結果、下記表 2 に示すように、グループⅡが、グループⅣに比べて、内臓脂肪重量当たり著しく高い血清アディポネクチンレベルを示した。

【0103】

【表 2】

	基底対照群 (グループⅠ)	ミドドリン (グループⅡ)	アテノロール (グループⅢ)	対照群 (グループⅣ)	p-数値
アディポネクチン (ng/ml/g)	74796.6±13898.0 ^a	7585.8±182.3 ^b	6136.5±574.7 ^{b,c}	5455.8±709.7 ^c	<0.001

30

【0104】

図 2 E に示すように、肝でリン酸化 AMPK タンパク質発現は、大動脈、骨格筋、脂肪などの他臓器の結果と類似にグループⅡで最も高く、グループⅣでは相対的に低かった。また、図 7 で示すように、肝で AMPK の下部連携要素であるコレステロール合成酵素 HMG-CoA reductase タンパク質 (HMGCR) の発現が、グループⅡ、Ⅲで最も低く、対照群であるグループⅣでは高かった。

【0105】

40

実際の血液での脂肪プロファイルと関連したは、下記表 3 に示すように、総コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロールは、薬物投与群 (グループⅡ及びⅣ) に比べて、対照群 (グループⅠ及びⅢ) でさらに高かったが、トリグリセリドレベルは、グループの間にあまり差がなかった。

【0106】

このような結果から、ミドドリンが、高脂血症治療に有効であるということが分かる。

【0107】

【表 3】

脂質 (S I / L)	基底対照群 (グループ I)	ミドドリン (グループ II)	アテノロール (グループ III)	対照群 (グループ IV)	p-数値
総コレステロール	1.69±0.29	0.73±0.15 ^a	1.01±0.27 ^a	1.66±0.17	<0.001
LDL-コレステロール	0.43±0.06	0.15±0.04 ^a	0.15±0.03 ^a	0.40±0.03	<0.001
HDL-コレステロール	0.81±0.08	0.49±0.11 ^a	0.52±0.04 ^a	0.87±0.15	<0.001
トリグリセリド	0.83±0.33 ^a	0.43±0.12 ^a	0.77±0.33 ^a	0.77±0.31 ^a	0.092

10

【0108】

3-8: 脂肪細胞脂肪含有の抑制、体重及び腹部脂肪減少の効果の検定

脂肪前駆細胞 (3T3-L1) にミドドリンを処理した結果、図 8A に示すように、脂肪細胞で脂肪含有量が減少し、GSK0660 (PPAR β/δ inverse agonist) 50 μ M/L の混合物 (1:2 (w/w)) を追加時に、ミドドリンの効果が減少した。また、ミドドリンを処理した脂肪細胞を実施例 2-3 の方法でウェスタンブロッティングした結果、図 8B に示すように、脂肪合成/蓄積を抑制する PPAR- δ 、p-AMPK、PGC-1 α のタンパク質発現が増加した。

【0109】

20

実施例 1-2 のミドドリン投与ラット (II)、アテノロール投与ラット (III) 及び未投与 8 週齢高血圧対照群ラット (IV) で、それぞれ体重を測定し、摘出した腹部脂肪 (内臓脂肪) の重量を測定した結果、図 9 に示すように、ミドドリン投与時に、体重と腹部脂肪いずれも減少した。このような結果から、ミドドリン使用時には、血糖減少と共に体重減少、心不全の予防効果が同時に発揮されることを確認した。

【0110】

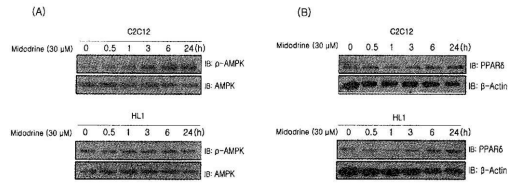
また、 $\alpha 1$ -AR 効能剤であるミドドリンまたはその薬学的に許容可能な塩による $\alpha 1$ -AR 刺激は、骨格筋及び肝に運動時に発揮される生理効果を招き、心臓肥大または血圧上昇を伴わず、左心室の拍出係数を向上させ、自発性高血圧ラットの初期生涯のうち、初期高血圧時期に生化学的反応を変化させることが分かる。これは、直接に刺激された心臓

30

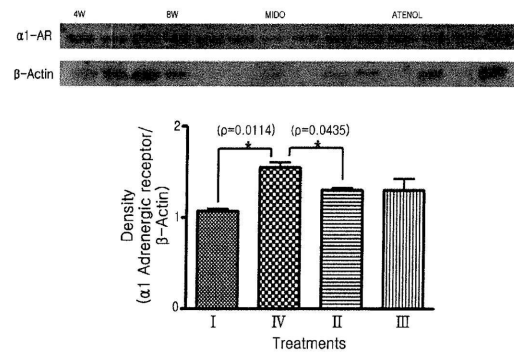
【0111】

前述した本発明の説明は、例示のためのものであり、当業者ならば、本発明の技術的思想や必須的な特徴を変更せずとも、他の具体的な形態に容易に変形が可能であるということを理解できるであろう。したがって、前述した実施例は、あらゆる面で例示的なものであり、限定的ではないということを理解しなければならない。

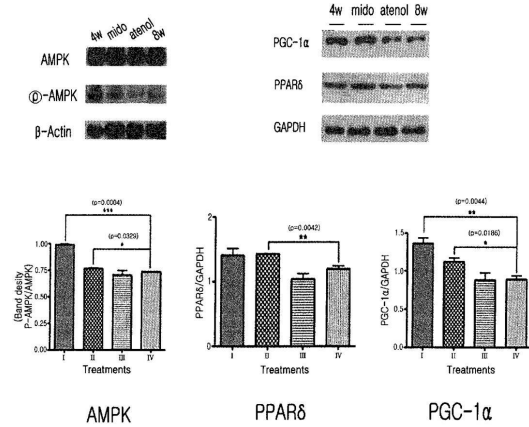
【図 1】



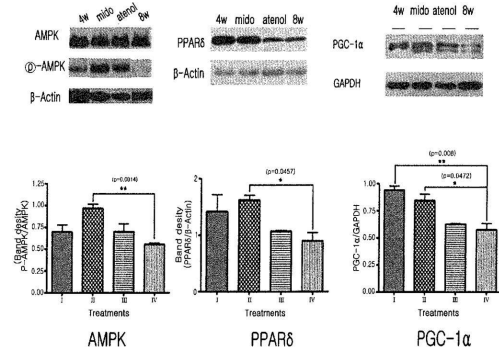
【図 2 A】



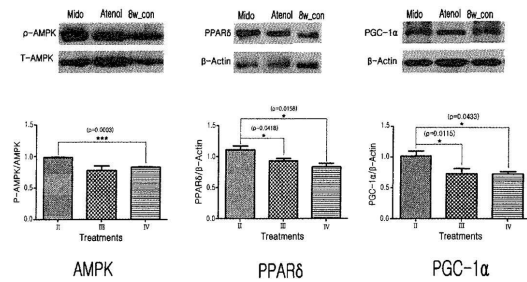
【図 2 B】



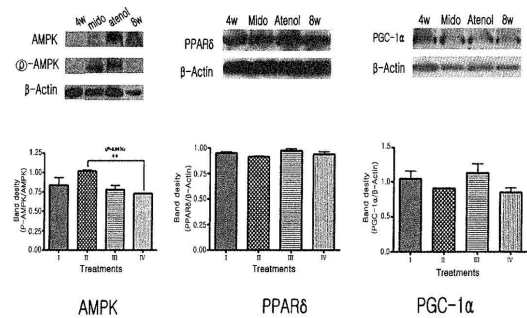
【図 2 C】



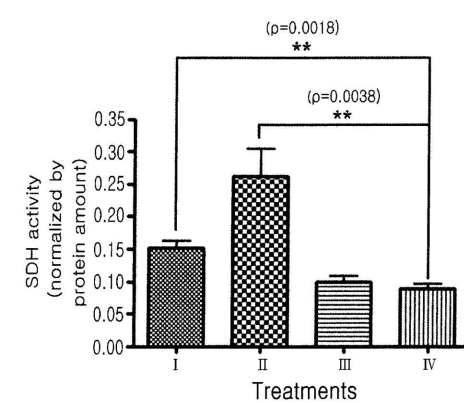
【図 2 D】



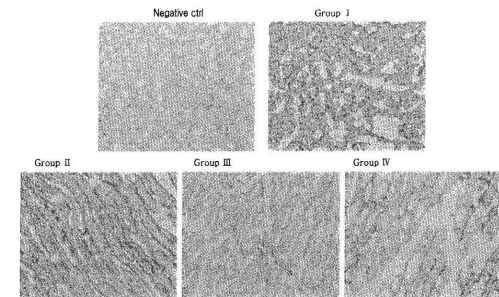
【図 2 E】



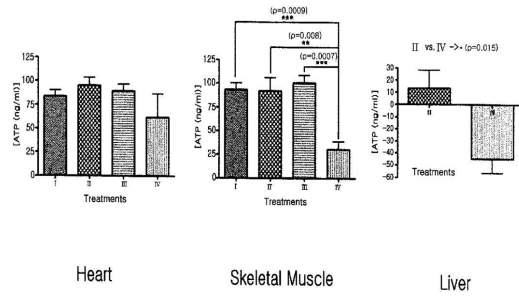
【図 3 A】



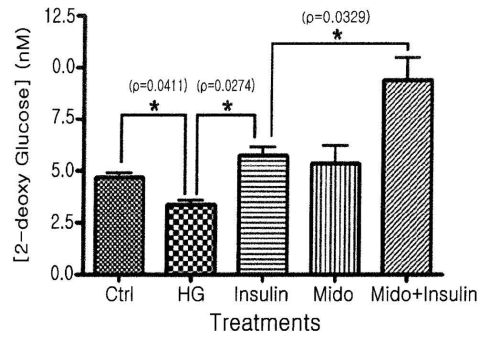
【図 3 B】



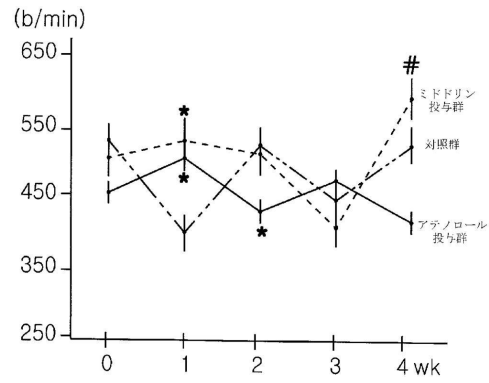
【図 4】



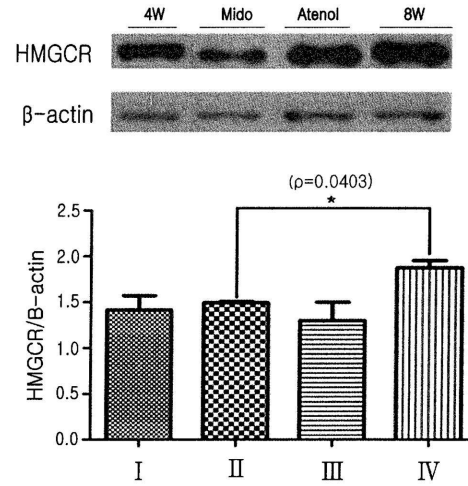
【図 5】



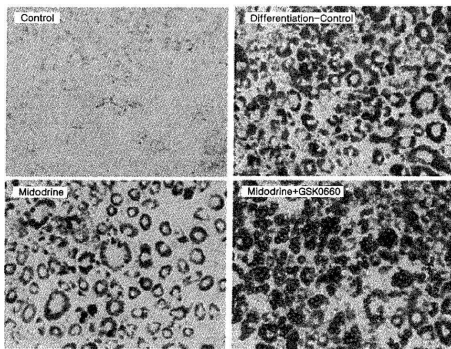
【図 6】



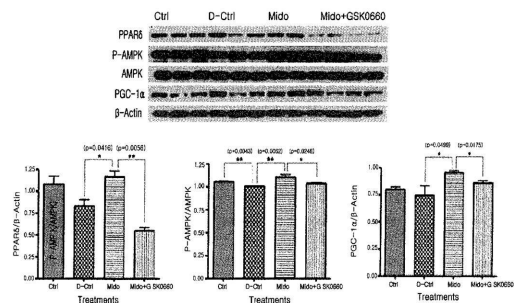
【図 7】



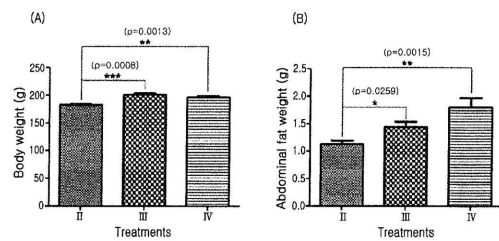
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 2 3 L 33/10

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 国際公開第2008/100977(WO, A2)
米国特許出願公開第2004/0063719(US, A1)
韓国公開特許第2013-0065133(KR, A)
Acta Physiologica Sinica, 2007年 4月, Vol.59, No.2, p.175-182
運動中の筋肉と似たような代謝状態の変化を引き起こす薬物を発見, 徳島大学プレスリリース,
2014年, p.1-3

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 1 / 1 6 5
A 2 3 L 3 3 / 1 0
A 6 1 K 3 8 / 2 8
A 6 1 P 3 / 1 0
A 6 1 P 4 3 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)