

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年9月9日(09.09.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/108487 A1

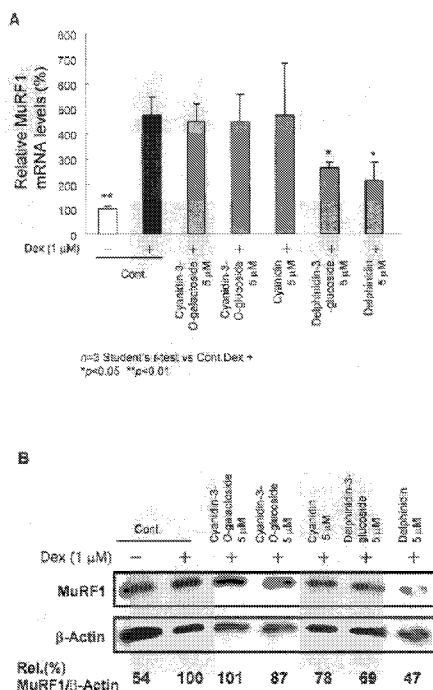
- (51) 国際特許分類:
A61K 31/353 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61P 21/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/054499
- (22) 国際出願日: 2011年2月28日(28.02.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-044113 2010年3月1日(01.03.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人九州大学(KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 立花 宏文(TACHIBANA, Hirofumi) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

[続葉有]

(54) Title: MUSCULAR ATROPHY INHIBITOR

(54) 発明の名称: 筋萎縮阻害剤

[図2]



(57) Abstract: Disclosed is a new usage, with the goal of preventing skeletal muscle atrophy, for a specific polyphenol that inhibits the expression of a gene that causes muscular atrophy. Also disclosed is a composition which inhibits muscular atrophy and contains a polyphenol selected from among the following: delphinidin, delphinidin glucoside, epigallocatechin gallate, delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-galactoside, cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-galactoside, delphinidin-3-O-β-galactoside, cyanidin-3-O-β-galactoside, cyanidin-3-β-glucoside, cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-glucoside, petunidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-galactoside, petunidin-3-β-glucoside, methylated catechin, quercetin glycoside, myricetin glycoside, and theogallin. Said composition inhibits muscular atrophy by inhibiting the expression of a gene that causes muscular atrophy, such as MuRF1.

(57) 要約: 筋萎縮原因遺伝子の発現阻害作用を有する特定のポリフェノールについて、骨格筋萎縮の防止を目的とする新たな用途を提供する。デルフィニジン、デルフィニジン glucoside、エピガロカテキンガレート、Delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-galactoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-galactoside、Delphinidin-3-O-β-galactoside、Cyanidin-3-O-β-galactoside、Cyanidin-3-β-glucoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-glucoside、Petunidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)-β-galactoside、Petunidin-3-β-glucoside、メチル化カテキン、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体、及びテオガリンから選択されるポリフェノールを含有する、筋萎縮阻害作用を有する組成物を提供する。当該組成物は、MuRF1などの筋萎縮原因遺伝子の発現を抑制することにより、筋萎縮を阻害する作用を有する。

WO 2011/108487 A1



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 筋萎縮阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、筋萎縮を阻害する効果を有する組成物に関する。

背景技術

[0002] 骨格筋は人体で最大の組織であり、エネルギー代謝、糖取込み、運動において重要な役割を果たす。骨格筋の量と質はその機能に重要であり、筋肉タンパク質の量と質は絶え間ない合成と分解によるタンパク質代謝回転により維持されている。また骨格筋は身体活動の程度やホルモン、成長因子、ストレスや栄養状態によってその筋量を調節している。骨格筋量が減少すると、身体的な活動を低下させることによりQOL(Quality of Life：生活の質)を低下させ、また筋力を低下させ疲労抵抗性が低下することから、高齢化の進む日本において筋萎縮を防ぐことは意義深いと考えられる。

[0003] 骨格筋萎縮は様々な要因によって起こることが知られており、加齢や筋肉を使用せずにいることといった活動量の低下により起こるが、一方で慢性閉塞性肺疾患、重度のやけどなどにおける悪液質、代謝性疾患、ガン、神経変性病など様々な病態によっても生じることが知られている。(Ann Surg., 233, 9-17(2001); Pharmacol Ther., 113, 461-487(2007); N Engl J Med., 335, 1897-1905(1996))。また特にいくつかの悪液質では、グルココルチコイドの一種であるコルチゾールのレベルが上昇することが筋萎縮に関係している(J. Am. Coll. Cardiol., 30, 997-1001(1997); J. Am. Coll. Surg., 188, 98-103. (1999); Am. J. Physiol., 264, E668-E676. (1993))。

[0004] こういった筋萎縮において、タンパク合成と分解の代謝回転が分解に傾くことがその原因のひとつであるとされている。骨格筋の構成タンパク質を分解する経路の一つにユビキチン化タンパク質を分解するユビキチン・プロテアソーム経路がある。ユビキチン・プロテアソームタンパク質分解経路では

、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素とユビキチンリガーゼの酵素群からなるユビキチン化システムにより分解すべきタンパク質にユビキチンという小さなタンパク質を次々に結合させ、26Sプロテアソームによってポリユビキチンを認識し、タンパク質を分解する。またその経路の中では基質の特異性を決定するユビキチンリガーゼの発現がこの経路の律速段階であると考えられている。

[0005] ユビキチンリガーゼの中でもMuRF1 (muscle RING finger protein-1)やatrogin-1/MAFbx-1 (muscle atrophy F-box protein-1)は骨格筋や心筋に発現し、またこれらの遺伝子をノックアウトしたマウスが筋萎縮に抵抗性を示したことにより、筋萎縮原因遺伝子 (atrogenes) と示され注目されている (Science 294, 1704(2001))。これらのMuRF1とatrogin-1はグルココルチコイド処理、筋肉の不使用や酸化ストレスなど、少なくとも13種類の筋萎縮で発現が上昇し、萎縮現象のマーカーであるとされている (Science 294, 1704(2001); FEBS Lett. 544, 214-217(2003); Cell Biol., 37, 1974-1984(2005); Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 289, E969-E980(2005); J. Biol. Chem. 280, 2737-2744(2005); J. Am. Soc. Nephrol., 15, 1537-1545(2004); Am. J. Physiol. Cell Physiol., 285, C806-C812(2003); FASEB J., 19, 362-370(2005); Cell, 117, 399-412(2004); Int. J. Biochem. Cell Biol., 35, 698-705(2003))。

[0006] またグルココルチコイドは筋肉分解の重要なメディエーターであり、骨格筋においてユビキチン・プロテアソーム経路依存性のタンパク分解を引き起こす (Crit. Care. Med., 35, S602-S608(2007))。また合成グルココルチコイドの一種であるデキサメタゾンは骨格筋においてMuRF1及びatrogin-1の発現を上昇させることが明らかになっている (J. Cell. Biochem., 105, 353-364(2008))。グルココルチコイド処理した培養筋管細胞は筋萎縮のモデルとして多くの研究で用いられてきた。デキサメタゾンによってもたらされる代謝的な変化は、動物や患者の筋萎縮において見られる変化と似ており、デキサメタゾン処理された筋管は筋萎縮のメカニズムを解析するために良く用い

られている。

[0007] 一方、ポリフェノールはその抗酸化活性などの機能性によって注目されている食品成分である。中でもアントシアニン類はパソコン作業による疲労を軽減させるなどの活性から注目されている (Altern. Med. Rev., 5, 553-562 (2000))。また緑茶に含まれるポリフェノールであるカテキンは様々な生理機能を有する。中でも茶葉に含まれるカテキンの約半分量を占めるエピガロカテキンガレート (Epigallocatechin-3-O-gallate : EGCG) はその生理活性に抗酸化作用、抗ガン作用などが知られている。

[0008] 骨格筋の筋萎縮に関するポリフェノールの作用については、酸化ストレスの関与が示唆されている廃用性筋萎縮の抑制を目的として、果実ポリフェノール (具体的にはりんごポリフェノール) を有効成分として含有することを特徴とする廃用性筋萎縮抑制組成物が報告されている (特許文献 1 : 特開 2001-89387)。りんごポリフェノールの主成分はプロシアニジンやプロアントシアニジンである。また、プロアントシアニジン を有効成分として含有する筋肉萎縮抑制剤 (特許文献 2 : 特開 2002-338464)、果実由来ポリフェノールを有効成分とする廃用性筋萎縮時の筋繊維タイプの移行を抑制する筋繊維タイプ移行抑制剤 (特許文献 3 : 特開 2006-328031)、カテキン類を有効成分とする筋機能低下抑制剤 (特許文献 4 : 特開 2008-13473) も開示されている。

[0009] しかしながら、これらの文献において、筋萎縮原因遺伝子やユビキチンリガーゼに対するポリフェノールの作用に関する言及はない。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献 1 : 特開 2001-89387 号公報

特許文献 2 : 特開 2002-338464 号公報

特許文献 3 : 特開 2006-328031 号公報

特許文献 4 : 特開 2008-13473 号公報

非特許文献

- [0011] 非特許文献1 : Ann Surg., 233, 9-17(2001)
- 非特許文献2 : Pharmacol Ther., 113, 461-487(2007)
- 非特許文献3 : N Engl J Med., 335, 1897-1905(1996)
- 非特許文献4 : J. Am. Coll. Cardiol., 30, 997-1001(1997)
- 非特許文献5 : J. Am. Coll. Surg., 188, 98-103. (1999)
- 非特許文献6 : Am. J. Physiol., 264, E668-E676. (1993)
- 非特許文献7 : Science 294, 1704(2001)
- 非特許文献8 : FEBS Lett. 544, 214-217(2003)
- 非特許文献9 : Cell Biol., 37, 1974-1984(2005)
- 非特許文献10 : Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 289, E969-E980(2005)
-)
- 非特許文献11 : J. Biol. Chem. 280, 2737-2744(2005)
- 非特許文献12 : J. Am. Soc. Nephrol., 15, 1537-1545(2004)
- 非特許文献13 : Am. J. Physiol. Cell Physiol., 285, C806-C812(2003)
- 非特許文献14 : FASEB J., 19, 362-370(2005)
- 非特許文献15 : Cell, 117, 399-412(2004)
- 非特許文献16 : Int. J. Biochem. Cell Biol., 35, 698-705(2003)
- 非特許文献17 : Crit. Care. Med., 35, S602-S608(2007)
- 非特許文献18 : J. Cell. Biochem., 105, 353-364(2008)
- 非特許文献19 : Altern. Med. Rev., 5, 553-562(2000)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 筋萎縮原因遺伝子の発現阻害作用を有するポリフェノールを特定し、骨格筋萎縮の防止を目的とする新たな用途を提供することが本発明の課題である。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らは、ストレスホルモンであるグルココルチコイドの合成薬剤であるデキサメタゾンによる骨格筋萎縮において、筋萎縮原因遺伝子の発現に

対するポリフェノールの作用を検討した。そして、デルフィニジン (Delphinidin)、デルフィニジングルコシド (Delphinidin-glucoside 又は Delphinidin-3-O- β -glucoside)、EGCG の各ポリフェノールが筋萎縮を阻害する可能性を持つことを見出した。さらに本発明者らは経口投与されたポリフェノールによる廃用性筋萎縮阻害活性を *in vivo* で確認し、本発明を完成するに至った。

[0014] 本発明の要旨は以下の通りである。

[0015] (1) デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、エピガロカテキンガレート、Delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Delphinidin-3-O- β -galactoside、Cyanidin-3-O- β -galactoside、Cyanidin-3- β -glucoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -glucoside、Petunidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Petunidin-3- β -glucoside、メチル化カテキン、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体、及びテオガリンから選択されるポリフェノールを含有する、筋萎縮阻害作用を有する組成物。

(2) デルフィニジン、デルフィニジングルコシド及びエピガロカテキンガレートから選択されるポリフェノールを含有する、筋萎縮阻害作用を有する組成物。

(3) 筋萎縮原因遺伝子の発現を抑制することにより、筋萎縮を阻害する作用を有する、(1) 又は (2) の組成物。

(4) デルフィニジン又はデルフィニジングルコシドを含有する、(3) の組成物。

(5) 筋萎縮原因遺伝子が MuRF1 である、(3) 又は (4) の組成物。

(6) 組成物が食品、栄養補助食品、機能性食品又は医薬品である、(1) から (5) のいずれかの組成物。

発明の効果

[0016] 本発明により、食品由来の機能性成分として知られるアントシアニン及び緑茶カテキンを、骨格筋萎縮阻害を目的とした食品、栄養補助食品、機能性

食品又は医薬品などの組成物に利用することが可能となった。特に、飲食品による筋萎縮阻害が可能になるので、病者や高齢者のQOL改善に資する新たな手段を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1] 図 1 は、マウス骨格筋細胞株C2C12におけるデキサメタゾン（Dex）によるMuRF1発現を示す。

[図2] 図 2 は、マウス骨格筋細胞株C2C12におけるデキサメタゾン誘導性MuRF1発現におよぼすアントシアニン類の影響を示す。

[図3] 図 3 は、マウス骨格筋細胞株C2C12におけるデキサメタゾン誘導性MuRF1発現におよぼすEGCGの影響を示す。

[図4] 図 4 は、マウス尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼすデルフィニジンの経口投与の効果を示す。図 4 A は、尾懸垂試験 10 日後の各筋肉重量（mg/g body weight）を示す。図 4 B は、GR 群と比較した TS 群の筋萎縮（重量の減少）を 100% としたときの各 TS+Del 群の筋萎縮度を示す。

[図5] 図 5 は、DNA チップを用いたマウス大腿四頭筋における尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼすデルフィニジンの経口投与の効果を示す。

[図6] 図 6 は、マウス尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼす「やぶきた」ならびに「サンルージュ」抽出物の経口投与の効果を示す。図 6 A は、尾懸垂試験 10 日後の各筋肉重量（mg/g body weight）を示す。図 6 B は、GR 群と比較した TS 群の筋萎縮（重量の減少）を 100% としたときの TS+YB, TS+SR 群の筋萎縮度を示す。

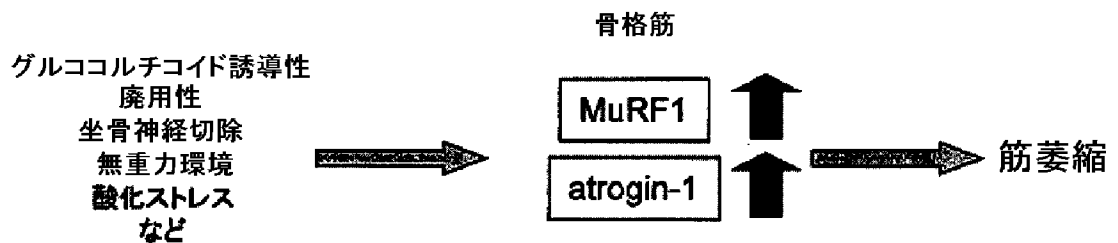
発明を実施するための形態

[0018] 骨格筋はグルココルチコイド長期投与・ガン・糖尿病・エイズなどの病気、加齢、栄養不足、あるいはギプス固定や寝たきりによって骨格筋を長い間使用しない場合などによって萎縮し、骨格筋機能が低下することが知られ、その結果、生活の質の低下がもたらされる。

[0019] この骨格筋萎縮にはユビキチン・プロテアソーム系が関与しており、特にユビキチンリガーゼであるmuscle RING finger protein-1 (MuRF1)やatrogin

-1といった遺伝子が注目されている。MuRF1やatrogin-1は筋萎縮原因遺伝子であり、筋萎縮において初期に誘導されるなど重要な遺伝子であり、様々な筋萎縮に関与していることが知られている。

[0020] [化1]



[0021] 一方、ストレス誘導ホルモンであるコルチゾールはグルコルチコイドの一種であり、異化の働きを持つことにより筋萎縮との関連が考えられている。またデキサメタゾン合成グルコルチコイドの一種であり、in vitro及びin vivoにおいて骨格筋萎縮を招くため、デキサメタゾン処理された筋管細胞は筋萎縮のメカニズムを検討するために用いられる評価系である。

[0022] 本発明者らは、機能性食品因子として知られるポリフェノールに着目し、ポリフェノールが筋萎縮原因遺伝子の発現に及ぼす作用を検討した。具体的には、骨格筋細胞株においてデキサメタゾン処理により誘導されたMuRF1発現に対して、ポリフェノールが及ぼす影響を評価した。ポリフェノールとしては、各種アントシアニン及びEGCGを用いた。

[0023] その結果、デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、EGCGの各ポリフェノールが、筋萎縮原因遺伝子であるMuRF1の発現を抑制することを見出した。

[0024] 以上の結果より、これらアントシアニンやEGCGを、筋萎縮原因遺伝子の発現を抑制するための組成物の有効成分として利用することが可能であることが分かった。

[0025] 筋萎縮原因遺伝子の具体例としては、MuRF1やatrogin-1が挙げられる。MuRF1は多くの筋萎縮で発現が上昇し、また骨格筋において構成タンパク質の分

解に関わるため、上述の組成物は骨格筋の筋萎縮を阻害するために利用することができると考えられる。

[0026] さらに、本発明者らは、筋萎縮に対するポリフェノールの効果を *in vivo* の経口投与実験により評価した。その結果、デルフィニジン、並びに茶品種「やぶきた」や「サンルージュ」に廃用性筋萎縮阻害活があることを確認した。

[0027] 「サンルージュ」は高アントシアニン茶として知られる新しい緑茶の品種である。「サンルージュ」の特長は、カテキン類の含有量は他の茶品種と同程度であるが、アントシアニンの含有量は「やぶきた」の15倍以上であり、カテキン類とアントシアニンを同時に摂取できることにある。また、「サンルージュ」には、通常の茶には含まれていない Delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Delphinidin-3-O- β -galactoside、Cyanidin-3-O- β -galactoside、Delphinidin-3-O- β -glucoside、Cyanidin-3- β -glucoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -glucoside、Petunidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside が含有されている。また、epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallateなどのメチル化カテキン、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体、Petunidin-3- β -glucoside、テオガリンを含有している。

[0028] したがって、これらのポリフェノールを、筋萎縮を阻害するための組成物の有効成分として用いることができる。

[0029] すなわち、本発明は、哺乳動物において骨格筋の筋萎縮を阻害する、ポリフェノールを含有する組成物を提供する。そのような組成物は、好ましくは、筋萎縮原因遺伝子の発現の抑制により骨格筋の筋萎縮を阻害する。

[0030] 本発明の組成物は、デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、又はEGCGを含有する食品やサプリメント（栄養補助食品）、あるいはこれらポリフェノールを利用した筋萎縮阻害剤の形態であることができる。

[0031] あるいは、本発明の組成物は、デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、Delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Cyanidin-3-

0- (6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Delphinidin-3-0- β -galactoside、Cyanidin-3-0- β -galactoside、Cyanidin-3- β -glucoside、Cyanidin-3-0-(6-trans-p-coumaroyl)- β -glucoside、Petunidin-3-0-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Petunidin-3- β -glucosideなどのアントシアニン；EGCG；epigallocatechin-3-0-(3-0-methyl)-gallateなどのメチル化カテキン；Quercetin-3-0- β -galactosideなどのケルセチン配糖体；ミリセチン配糖体；又はテオガリンを含有する食品やサプリメント（栄養補助食品）、あるいはこれらポリフェノールを利用した筋萎縮阻害剤の形態であることができる。

[0032] 本発明の組成物中で、これらの各種ポリフェノールは単独で含まれていてもよいし、複数の種類が一緒に含まれていてもよい。

[0033] これらのポリフェノールは食品由来の成分であることから、特に、経口投与あるいは経口摂取により筋萎縮予防効果を発揮する医薬用組成物あるいは食品としての利用が好ましい。

[0034] 経口投与剤としての形態に特に制限はなく、例えば、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤などの固形製剤、水剤、懸濁剤、乳剤などの液剤その他に適宜製剤化し得る。製剤化にあたっては、有効成分である一種以上のポリフェノールの他に、経口投与剤に一般に用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、基剤、懸濁化剤、乳化剤、保湿剤、保存剤、安定剤、界面活性剤、矯味剤などを適宜添加し、常法に従って製造できる。

[0035] 上述したようなポリフェノールを含有する食品としては、例えば、その摂取により筋萎縮の予防効果が期待できる旨の表示を付した飲食品、例えば、病者用食品、高齢者用食品、特定保健用食品などの特別用途飲食品や機能性食品又はサプリメントとしての利用が考えられる。

[0036] 食品の形態には特に制限はなく、飲料、ヨーグルト、ジャムなどの液状若しくはペースト状食品、麺類、パン、キャンディー、ゼリー、クッキー、ガム、豆腐などの固形状食品、あるいは粉茶、ふりかけ調味料、粉末状スープなどの粉末状食品などいかなる形態でもよい。ポリフェノールは、食品製造

時に原料の一部として添加あるいは食品製造終了後に添加できる。

[0037] ポリフェノールは、公知の方法により適当な原料から抽出される粗精製物、生成物あるいは市販品のいずれを用いても良い。

[0038] デルフィニジン及びデルフィニジングルコシドは、例えばサクランボ、ビルベリー、ブルーベリー、クロフサスグリ、カーラント、ブドウ、ツルコケモモ、イチゴ、茶品種「サンルージュ」の抽出物から調製できる。精製処理の方法として、順相又は逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらの方法を組み合わせて用いることもできる。上記の果汁又は抽出物からデルフィニジン及びデルフィニジングルコシドを単離精製する方法は特に限定されないが、例えばHPLC、合成吸着剤クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等があり、特に合成吸着剤クロマトグラフィーが好ましい。この場合、溶出条件としては、例えば10～50%エタノール溶液を用いて溶出することが好ましい。またさらに、デルフィニジン及びデルフィニジングルコシドは酸性条件下で安定化するため、この溶出液に塩酸又は酢酸などを加え酸性にすることが特に好ましい。

[0039] EGCGは「べにふうき」、「べにふじ」、「べにほまれ」、「やえほ」、「するがわせ」、「ゆたかみどり」、「かなやみどり」、「やぶきた」、「さやまかおり」、「さえみどり」、「あさつゆ」、「おおいわせ」、「おくむさし」、「めいりよく」、「ふうしゅん」、「おくゆたか」、「青心大パン」、「青心烏龍」、「大葉烏龍」、「鳳凰単叢」、「鳳凰水仙」、「白葉単叢水仙」、「黄枝香」、「武夷水仙」、「紅花」、「べにひかり」、「やまかい」、「やまとみどり」、「からべに」、「香駿」、「おくみどり」及び「サンルージュ」からなる群から選ばれる緑茶葉の抽出液から調製できる。精製処理の方法として、順相又は逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらの方法を組み合わせて用いることもできる。緑茶葉からEGCGを単離精製する方法は特に限定されないが、例えばHPLC、合成吸着剤クロマトグラフィー、イオン交換クロマト

グラフィー、ゲルろ過等があり、特に合成吸着剤クロマトグラフィーが好ましい。この場合、溶出条件としては、例えば10～50%エタノール溶液を用いて溶出することが好ましい。またさらに、EGCGは酸性条件下で安定化するため、この溶出液に塩酸又は酢酸などを加え酸性にすることが特に好ましい。

[0040] また、「サンルージュ」の茶葉の抽出液には、EGCGの他に、メチル化カテキン、多くのアントシアニン類、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体、及びテオガリンが含まれる。したがって、上述のアントシアニンやカテキンを調製する場合と同様の方法により、epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate、Delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Delphinidin-3-O- β -galactoside、Cyanidin-3-O- β -galactoside、Delphinidin-3-O- β -glucoside、Cyanidin-3- β -glucoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -glucoside、Petunidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Petunidin-3- β -glucoside、ならびにケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体、及びテオガリンを得ることができる。

[0041] 本発明に用いるポリフェノールの有効投与量は、成人一日用量として0.1mg～2000mg、又は、0.1mg～1000mg、又は、0.1mg～200mg、好ましくは、0.1mg～100mgを使用する。本発明においては、ポリフェノールの有効投与量が前記範囲となるように、組成物中に適宜配合すればよい。

[0042] 具体的な実施態様において、本発明の組成物中の有効成分として、デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、及びEGCGから選択されるポリフェノールが好適に使用される。

[0043] さらに具体的な実施態様において、本発明の組成物中の有効成分として、デルフィニジン及びデルフィニジングルコシドから選択されるアントシアニンが好適に使用される。

[0044] 本発明の組成物は、活動量の低下により起こる筋萎縮（廃用性筋萎縮）、

あるいは様々な病態による筋萎縮のいずれの要因による筋萎縮の抑制にも用いられる。言い換えると、本発明の組成物は、ユビキチン・プロテアソーム系が関与する、あらゆる要因による筋萎縮の予防、抑制又は改善を目的として用いることができる。そのような筋萎縮の抑制においてはユビキチン・プロテアソーム系を阻害することが有益であるので、例えば、MuRF1又はatrogen-1の発現を阻害することにより、筋萎縮阻害作用を得ることができる。あるいは、本発明の組成物は、グルココルチコイドにより誘導される筋萎縮、又はコルチゾールのレベルが上昇することで特徴付けられる病態に伴う筋萎縮の予防、抑制又は改善を目的として用いることができる。

実施例

[0045] 実施例 1：骨格筋細胞へ分化させた細胞株を用いた筋萎縮原因遺伝子発現阻害作用の検討

[実験材料及び実験方法]

1) デキサメタゾンによる骨格筋萎縮誘導作用の評価

骨格筋萎縮誘導作用の評価に用いたマウス骨格筋細胞株C2C12(ATCC)は10%ウシ胎児血清(FCS)(BIOLOGICAL INDUSTRIES)添加DMEMにて37°C、水蒸気飽和した5% CO₂条件下で継代、維持した。細胞は対数増殖期で培養維持した。培養に使用したDMEM培地は、dH₂O 1 Lあたり、ダルベッコMEM培地(コスモ・バイオ株式会社、東京)13.38 g、HEPES(和光純薬工業株式会社、大阪)5.958 g、注射用ペニシリン G カリウム 20万単位(明治製菓株式会社、東京)0.5 vial、硫酸ストレプトマイシン注射用1g(明治製菓株式会社、東京)0.1 vial、NaHCO₃(nacalai tesque、京都)3.7 gを懸濁した後、フィルター滅菌した。そして、ウシ胎児血清(FCS)をDMEM培地に添加し、細胞培養に使用した。細胞の継代の際は、PBSで洗浄した後、トリプシン溶液で細胞をはがした。PBSはdH₂O 1LあたりNaCl(nacalai tesque、京都)8.0 g、KCl(nacalai tesque、京都)0.2 g、Na₂HPO₄(和光純薬工業株式会社、大阪)1.15 g、KH₂P04(nacalai tesque、京都)0.2 gを懸濁し、オートクレーブ滅菌した。トリプシン溶液は、100 mL PBSあたりEDTA・2Na(和光純薬工業株式会社、大阪)0.05 g、トリプシン(nacalai

ai tesque、京都) 0.02 gを懸濁し、フィルター滅菌した。また、細胞の継代・維持には10 mL接着dish(nuncTM、東京)を使用した。

[0046] 骨格筋萎縮誘導作用の評価にはデキサメタゾンによるMuRF1の発現上昇を用いた。マウス骨格筋細胞株C2C12を 1×10^4 cells/mLに調整して2 mL dish (nuncTM、東京)に播種し、10% FCS含有DMEMにて24時間培養した。その後、0.5% FCS含有DMEM (分化培地) に培地交換することにより分化誘導をかけた。分化培地は誘導開始48時間後に培地交換した。誘導開始96時間後、デキサメタゾン (Sigma) 終濃度0、0.1、1 μ Mを含む分化培地に培地交換し24時間後処理した。デキサメタゾンはジメチルスルホキシド(DMSO) (Nacalai tesque, Inc. Kyoto, Japan)にて10 mMとなるように溶解し、 -30°C にて保存した。使用に際しては適宜解凍して用いた。その後、上清を除去し、PBS 1 mLにて洗浄し、TRIzolTM Reagent (invitrogen、東京) 800 μ Lによって細胞を回収し、室温で5分間放置した。次に、クロロホルム(nacalai tesque、京都) 200 μ Lを添加・攪拌し、室温で3分間放置後、 4°C で15分間遠心($12,000 \times g$)した。その後、上層を取り出し、2-プロパノール (nacalai tesque、京都) 500 μ Lを添加・攪拌し、室温で10分間放置後、 4°C で10分間遠心($12,000 \times g$)した。その後、上清を除去し、75% EtOH(nacalai tesque、京都) in DEPC水(DEPC (SIGMA-ALDRICH、東京) 1 mLを dH_2O 1 Lに溶かし、オートクレーブ滅菌したもの)を1 mL添加・攪拌後、 4°C で5分間遠心($12,000 \times g$)した。その上清を完全に除去し、DEPC水を20から25 μ L入れて懸濁した。その後、PrimixScript RT reagent kit (TaKaRa)を用いてcDNAを合成した。調製したcDNAは -20°C で保存した。その後リアルタイムPCRによってMuRF1及びGAPDHの発現を検討した。リアルタイムPCRにはThermal Cycler Dice Real Time System TP800 (TaKaRa)を用いた。PCR反応液の組成は、1サンプルにつき dH_2O 8.5 μ L、SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) 12.5 μ L、Forward primer (10 μ M) 1 μ L、Reverse primer (10 μ M) 1 μ L、鋳型2 μ Lとした。PCR条件は初期変性を 95°C 10秒間行い、その後 95°C 5 秒間、 60°C 20 秒間で50サイクルとした。プライマーはMuRF1は Forward : 5'-TGAGGTGCCTACTTGCTCCT-3'

Reverse : 5'-TCACCTGGTGGCTATTCTCC-3'

を用いた。プライマーは株式会社ジーンネット(福岡)に合成を委託した。GAPDHのプライマーはタカラバイオから購入した。各プライマーはTE bufferによって溶解・保存した。TE bufferは、500 mLあたり、10mM Tris(nacalai tesque) 0.605 g、EDTA・2Na (和光純薬工業株式会社)0.186 g を約350 mLのdH₂Oに溶解してHCl (和光純薬)によってpH 8.0に調整後、500 mLにフィルアップし、オートクレーブ滅菌をした。実験結果の統計処理にはStudent's t検定を用いた。

[0047] 2) アントシアニン及びEGCGの筋萎縮阻害作用の検討 (mRNAレベル)

アントシアニン及びEGCGのデキサメタゾン誘導性ユビキチンリガーゼ発現に対する評価を行った。C2C12を 2×10^4 cell/mLにて2 mL dishに播種し、分化誘導した。分化培地は誘導開始から48時間後に交換した。誘導開始から72時間後にアントシアニンであるCyanidin-3-O-galactoside、Cyanidin-3-O-glucoside、Cyanidin、Delphinidin-glucoside、Delphinidin及びEGCG各終濃度5 μ M含有分化培地に置換し、24時間前処理した。その後、各被験物5 μ M及びデキサメタゾン1 μ Mを含有する分化培地にて24時間処理した。

[0048] Cyanidin-3-O-galactoside、Cyanidin-3-O-glucoside、Cyanidin、Delphinidin-3-glucoside、DelphinidinはEXTRASYNTHESSEから購入した。各々5 mMになるように、Cya-gal、Cya-glu、Del-gluは超純水に、Cyanidin、DelphinidinはDMSOにそれぞれ溶解し、-30°Cで保存した。EGCGはSigmaより購入し、5 mMとなるように超純水に溶解し、-15°Cで凍結保存した。各試薬とも用いる際は適宜解凍して用いた。

[0049] デキサメタゾン処理の後、細胞をTrizolにて回収後、cDNAを合成し、MuRF1及びGAPDHの発現レベルをリアルタイムPCRによって検討した。

[0050] 3) アントシアニン及びEGCGの筋萎縮阻害作用の検討 (タンパク質レベル)

次に、アントシアニン及びEGCGのデキサメタゾン誘導性ユビキチンリガーゼ発現に対する評価をタンパク質レベルで行った。C2C12を 1×10^4 cell/mLにて

24 well plate (nuncTM、東京)に播種し、分化誘導した。分化培地は誘導開始から48 時間後に交換した。誘導開始から72時間後に、アントシアニンであるCyanidin-3-O-galactoside、Cyanidin-3-O-glucoside、Cyanidin、Delphinidin-glucoside、Delphinidin及びEGCG各終濃度5 μ M含有分化培地に置換し、24時間前処理した。その後、各被験物5 μ M及びデキサメタゾン1 μ Mを含有する分化培地にて24時間処理した。その後上清を除去し、PBS 1 mLで洗浄後、処理した細胞に細胞溶解バッファー(50 mM Tris (nacalai tesque)-HCl(和光純薬工業) (pH 7.5)、150 mM NaCl(和光純薬工業)、1% (v/v) Triton-X100(nacalai tesque)、1 mM EDTA (和光純薬工業)、50 mM NaF(nacalai tesque)、30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (nacalai tesque)、1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride(和光純薬)、2 μ g/mL Aprotinin、1 mM pervanadate(和光純薬))を加え溶解した。その後、12000 x rpm で 10 min 遠心し、上清を回収した。これをサンプルとしてBicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Reagent (Rockford, IL)を用いてタンパク質の定量を行った。サンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl (pH6.8)、10% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS, 和光純薬)、50% glycerol(nacalai tesque)、1 % (w/v) bromophenol blue(和光純薬)、0.65 M 2-mercaptoethanol(和光純薬工業))をサンプルに対して等量加えて、10分煮沸し熱変性を行った。これを6% polyacrylamideゲルに供し(acrylamide monomer (nacalai tesque)使用)、0.02 A 110分でSDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)を行った。その後、ゲルを氷冷しながら、100 V 60分でエレクトロブロッティングを行い、ゲル中のタンパク質をニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell, Keene, NH)に転写した。この膜を、2.5% Bovine serum albumin (BSA) (Roche)-TTBS (0.1% Tween20 (nacalai tesque)含有 Tris buffered saline; 20 mM Tris-HCl, pH7.6)にて室温で1時間ブロッキングを行った。ブロッキング後に、1次抗体を2.5% BSA-TTBSで希釈し4°Cで一晩反応させ、2次抗体を室温で1時間反応させた。TTBSで4 回洗浄後、Chemi-Lumi Oneキット(nacalai tesque)又はECL キット(GE Healthcare)を用いて発色反応を行い、ChemilmagerTM 5500(Alpha Innotech)で検出を行った。

[0051] 1次抗体に用いた抗体は抗MuRF1抗体及び抗 β -Actin抗体である。Rabbit anti-MuRF1 monoclonal antibodyはSanta Cruz Biotechnologyより購入し、1000倍希釈して用いた。Mouse anti- β -Actin monoclonal antibodyはSigmaより購入し、10000倍希釈して用いた。Mouse anti-Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-Rabbit IgG antibody及びHRP-conjugated anti-Mouse IgG antibodyはROCKLANDより購入し、10000倍希釈して用いた。

[0052] [結果]

1) デキサメタゾンによる MuRF1 発現

C2C12細胞における筋萎縮原因遺伝子であるユビキチンリガーゼMuRF1の発現を誘導するデキサメタゾンの濃度を決定するために、分化させたC2C12筋管にデキサメタゾン処理を行った。

[0053] C2C12細胞を2 mL dishに 2×10^4 cells/mLとなるように播種し、増殖培地である10% FCS-DMEMにて24 時間前培養後、分化誘導培地である0.5% FCS-DMEMに培地交換し分化誘導をかけた。分化培地は48時間後に一回交換した。分化4日後、デキサメタゾンを0 (コントロール)、0.1、もしくは1 μ M 含有する分化培地に置換し24 時間処理後、細胞を回収しリアルタイムPCRによってMuRF1の発現を検討した。

[0054] その結果を図1に示す。デキサメタゾン0.1、1 μ MによってMuRF1の発現量は有意に増加した。C2C12細胞におけるデキサメタゾン処理によるユビキチンリガーゼ発現に関して、文献などでは1 μ Mにてよく検討されているため、以後の検討にはデキサメタゾン1 μ Mを用いることにした。

[0055] 2) デキサメタゾン誘導性MuRF1発現におよぼすアントシアニン類の影響
骨格筋細胞におけるデキサメタゾン誘導性MuRF1発現に及ぼすアントシアニン類の影響を見るために、分化させたC2C12にアントシアニン類を24時間添加し、その後デキサメタゾン処理した。

[0056] 結果を図2に示す。

[0057] 図2 Aでは、C2C12を2 mL dishに 2×10^4 cells/mLとなるように播種し、増殖培地である10% FCS-DMEMにて24時間前培養後、分化誘導培地である0.5% FC

S-DMEMに培地交換し分化誘導をかけた。分化培地は48時間後に一回交換した。分化3日後、各アントシアニン5 mM含有分化培地に置換し、24時間前処理後、各成分を5 mM及びデキサメタゾンを1 mM含有する分化培地にて24時間刺激した。その後細胞を回収しリアルタイム PCR によってMuRF1の発現(mRNA)を検討した。

[0058] シアニジンガラクトシド、シアニジングルコシド、シアニジンにはMuRF1発現低下作用は見られなかったが、デルフィニジングルコシド、デルフィニジンはデキサメタゾン誘導性 MuRF1発現レベルを有意に低下させた(図2 A)。

[0059] 図2 Bでは、C2C12を24 well plateに 1×10^4 cells/wellとなるよう播種し、増殖培地である10% FCS-DMEMにて24時間前培養後、分化誘導培地である0.5% FCS-DMEMに培地交換し分化誘導をかけた。分化培地は48時間後に一回交換した。分化3日後、各アントシアニン5 mM含有分化培地に置換し、24時間前処理後、各成分を5 mM及びデキサメタゾンを1 mM含有する分化培地にて6日間刺激した。その後細胞を回収しウェスタンブロット解析によってMuRF1の発現(タンパク質)を検討した。

[0060] タンパクレベルでは、シアニジングルコシド及びシアニジンに若干の低下作用が、またデルフィニジングルコシド及びデルフィニジンには明らかなMuRF1発現低下作用が見られた(図2 B)。

[0061] 3) デキサメタゾン誘導性MuRF1発現におよぼすEGCGの影響

骨格筋細胞におけるデキサメタゾン誘導性MuRF1発現に及ぼすEGCGの影響を見るために、分化させたC2C12にEGCGを24時間添加し、その後デキサメタゾン処理した。

[0062] 結果を図3に示す。

[0063] 図3 Aでは、C2C12を2 mL dishに 2×10^4 cells/mLとなるように播種し、増殖培地である10% FCS-DMEMにて24時間前培養後、分化誘導培地である0.5% FCS-DMEMに培地交換し分化誘導をかけた。分化培地は48時間後に一回交換した。分化3日後、EGCG 5 μ M含有分化培地に置換し、24時間前処理後、EGCG 5 μ M及びデキサメタゾンを1 μ M含有する分化培地にて24時間刺激した。その

後細胞を回収し、リアルタイムPCRによってMuRF1 の発現 (mRNA) を検討した。

[0064] EGCGはデキサメタゾン誘導性MuRF1の発現を有意に阻害した(図3A)。

[0065] 図3Bでは、C2C12を24 well plateに 1×10^4 cells/wellとなるよう播種し、増殖培地である10% FCS-DMEMにて24 時間前培養後、分化誘導培地である0.5% FCS-DMEMに培地交換し分化誘導をかけた。分化培地は48時間後に一回交換した。分化3日後、EGCG 5 mM含有分化培地に置換し、24時間前処理後、EGCG 5 μ M及びデキサメタゾン1 μ Mを含有する分化培地にて6日間刺激した。その後細胞を回収しウェスタンブロット解析によってMuRF1の発現(タンパク質)を検討した。

[0066] タンパク質レベルでも、MuRF1の発現誘導は顕著に阻害されていた(図3B)。

[0067] [考察]

デキサメタゾン誘導性のMuRF1発現に対し、シアニジン、シアニジンガラクトシド、シアニジングルコシドは影響を及ぼさなかったが、デルフィニジン及びデルフィニジングルコシドはMuRF1発現低下作用を発揮した。また、緑茶カテキンの一種であるEGCGも顕著にMuRF1の発現誘導を阻害することが明らかになった。

[0068] MuRF1は多くの筋萎縮で発現が上昇し、また骨格筋において構成タンパク質の分解に関わるため、デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、EGCGは筋萎縮を防ぐ可能性が示された。

[0069] 実施例2：廃用性筋萎縮阻害活性のin vivo評価

1) マウス尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼすデルフィニジンの経口投与効果

A) 12 週齢の C57BL/6 雄性マウスを通常飼育である Ground (GR) 群、尾懸垂 (Tail Suspension) である TS 群、TS 群にデルフィニジンを投与した TS+Del 群に群分けした。実験期間中デルフィニジンは溶媒に水を用い 0.1 mg 又は 0.5 mg/day となるようにゾンデによって強制経口投与した。GR 群、TS 群には水を強制経口投与した。投与開始 7 日間はいずれの群も通常

飼育を行い、その後 TS、TS+Del 群は尾懸垂試験を行った。尾懸垂はマウスの尾を吊り下げることで行った。尾懸垂試験開始 10 日後（デルフィニジンの最初の投与から計 17 日後）全てのマウスを屠殺し、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋を摘出し、筋萎縮を評価した。その結果、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋の全ての筋肉において GR 群に比べ TS 群では有意に筋肉重量が低値を示し、筋萎縮が尾懸垂によって誘導された（図 4 A）。

[0070] B) A の結果を基に GR 群と比較した TS 群の筋萎縮（重量の減少）を 100% としたときの各 TS+Del 群の筋萎縮度を評価した。その結果、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋において筋萎縮度がデルフィニジンの投与により低下し、デルフィニジンは筋萎縮を抑制する傾向を示した（図 4 B）。また、大腿四頭筋において TS+Del 0.5 mg 群では TS 群に比べ有意に筋萎縮度は阻害された（図 4 B）。よってデルフィニジンは *in vivo* においても筋萎縮阻害活性を発揮すること、またその抑制活性は経口投与によっても発揮されることが明らかとなった。

[0071] 2) DNA チップを用いたマウス大腿四頭筋における尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼすデルフィニジンの経口投与の効果

マウス尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼすデルフィニジンの影響実験時に得られた GR 群、TS 群、TS+Del 0.5 mg 群における大腿四頭筋から RNA を抽出し、cDNA を合成後 ビオチン化 aRNA を合成し精製後、aRNA を断片化し DNA チップと 16 時間ハイブリし、Cy5 アビジンで染色後検出した。

[0072] 結果を図 5 に示す。DNA チップに搭載されている疲労やストレスに関連する遺伝子の中で、24 種類の遺伝子が GR 群に比べ TS 群で有意に発現が増加し、かつ TS 群に比べ TS+Del 0.5 mg 群において有意に発現の増加が抑制された。これらデルフィニジンの経口投与によって発現増加が抑制された遺伝子のうち、Cbl-b はユビキチンリガーゼとして、Capn2 はカルシウム依存性タンパク質分解酵素として筋肉におけるタンパク質分解に関与している。また、NOX4 は酸化ストレスを生じるが、酸化ストレスは筋萎縮を誘導するユ

ビキチンリガーゼの発現を上昇させることが知られている。これらの結果より、デルフィニジンは筋萎縮に関与する遺伝子発現の増加を抑制することで筋萎縮を阻害することが示された。

[0073] 3) マウス尾懸垂誘導性廃用性筋萎縮におよぼす「やぶきた」ならびに「サンルージュ」抽出物の経口投与効果

A) 12 週齢の C57BL/6 雄性マウスを通常飼育である Ground (GR) 群、尾懸垂 (Tail Suspension) である TS 群、TS 群に やぶきたを投与した TS+YB 群、TS 群にサンルージュを投与した TS+SR 群に群分けした。実験期間中両茶は 4 g/ 100 mL の熱水で 10 分間抽出したものを 2 日に 1 回 1 mL をゾンデにより強制経口投与した。GR 群、TS 群には水を強制経口投与した。投与開始 7 日間はいずれの群も通常飼育を行い、その後 TS, TS+YB, TS+SR 群は尾懸垂試験を行った。尾懸垂はマウスの尾を吊り下げることで行った。尾懸垂試験開始 10 日後 (茶の最初の投与から計 17 日後) 全てのマウスを屠殺し、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋を摘出し、筋萎縮を評価した。

[0074] ヒラメ筋、腓腹筋、大腿四頭筋の筋肉において GR 群に比べ TS 群では有意に筋肉重量が低値を示し、筋萎縮が尾懸垂によって誘導された (図 6 A)。

[0075] B) A の結果を基に GR 群と比較した TS 群の筋萎縮 (重量の減少) を 100% としたときの TS+YB, TS+SR 群の筋萎縮度を評価した。TS+YB 群ではヒラメ筋、腓腹筋、大腿四頭筋において、TS+SR 群では腓腹筋、大腿四頭筋において筋萎縮度が低値を示す傾向が認められた (図 6 B)。また腓腹筋において TS+YB 群、TS+SR 群では有意に筋萎縮が抑制された (図 6 B)。以上の結果から、「やぶきた」及び「サンルージュ」の両緑茶抽出物には廃用性筋萎縮を阻害する活性があること、また、その活性は経口摂取においても発揮されることが示された。

[0076] [参考文献]

Anker, S.D., Clark, A.L., Kemp, M., Salsbury, C., Teixeira, M.M., H

ellewell, P. G., and Coats, A. J., Tumor necrosis factor and steroid metabolism in chronic heart failure: possible relation to muscle wasting, *Journal of American College of Cardiology*, 30, 997–1001. (1997)

Dehoux, M. J. M., van Beneden, R. P., Fernandez-Celemin, L., Lause, P. K., and Thissen, J-P. M., Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection, *FEBS Letters*, 544, 214–217 (2003)

Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37, 1974–1984 (2005)

Hasselgren, P. O., Burns and metabolism, *Journal of American College of Surgeons*, 188, 98–103. (1999)

H. Fujino, A. Ishihara, S. Murakami, T. Yasuhara, H. Kondo, S. Mohri, I. Takeda and R. R. Roy, Protective effects of exercise preconditioning of hindlimb unloading-induced atrophy of rat soleus muscle, *Acta Physiologica*, 197, 65–74 (2009)

Krawiec, B. J., Frost, R. A., Vary, T. C., Jefferson, L. S., and Lang, C. H., Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis, *American Journal of Physiology-Endocrinology and metabolism*, 289, E969–E980 (2005)

Latres, E., Amini, A. R., Amini, A. A., Griffiths, J., Martin, F. J., Wei, Y., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D., and Glass, D. J. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 2737–2744 (2005)

Lee, S. W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J., and Mitch, W. E., Regu

lation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase, *Journal of American Society of Nephrology*, 15, 1537–1545 (2004)

Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A.S., and Reid, M.B., Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes, *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 285, C806–C812 (2003)

Li, Y.-P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D.L., and Reid, M.B., TNF- α acts via p38 MAPK to stimulates expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB Journal*, 19, 362–370 (2005)

Menconi M, Fareed M, O Neal P, Poylin B, Wei W, Hasselgren PO., Role of glucocorticoids in the molecular regulation of muscle wasting, *Critical Care Medicine*, 35, S602–S608 (2007)

Michael Menconi, Patricia Gonnella, Victoria Petkova, Stewart Lecker, and Per-Olof Hasselgren, Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12, *Journal of Cellular Biochemistry*, 105, 353–364 (2008)

Nakaishi H., Matsumoto H., Tominaga S., Hirayama M., Effects of Black Currant Anthocyanoside Intake on Dark Adaptation and VDT Work-induced Transient Refractive Alteration in Healthy Humans, *Alternative Medicine Review*, 5, 553–562 (2000)

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H., and Goldver, A.L., Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy, *Cell*, 117, 399–412 (2004)

Sue C. Bodine, et al., Identification of ubiquitin ligases required

for skeletal muscle atrophy, *Science* 294, 1704–1708 (2001)

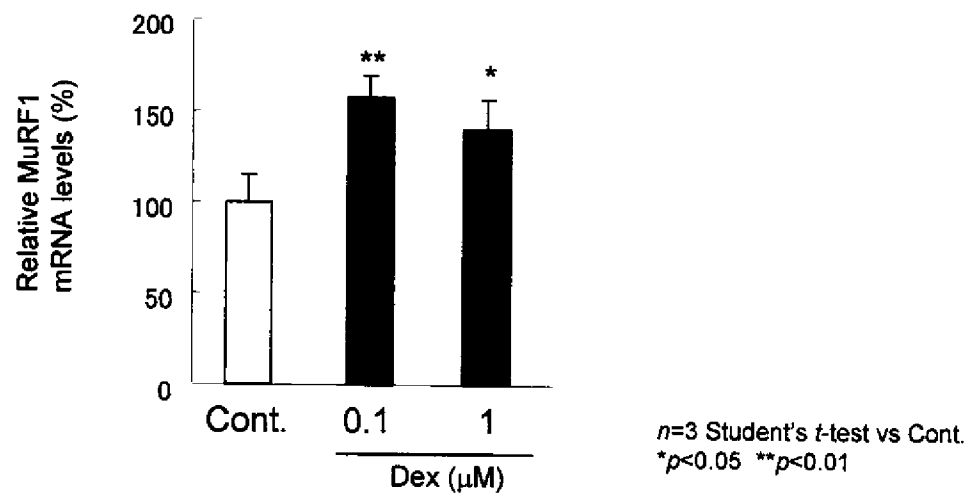
Wing, S.S., and Goldberg, A.L., Glucocorticoids activate the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting, *American Journal of Physiology*, 264, E668–E676. (1993)

Wray, C.J., Mammen, J.M., Hershko, D.D., and Hasselgren, P. O., Sepsis upregulates the gene expression of multiple ubiquitin ligases in skeletal muscle, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, 698–705 (2003)

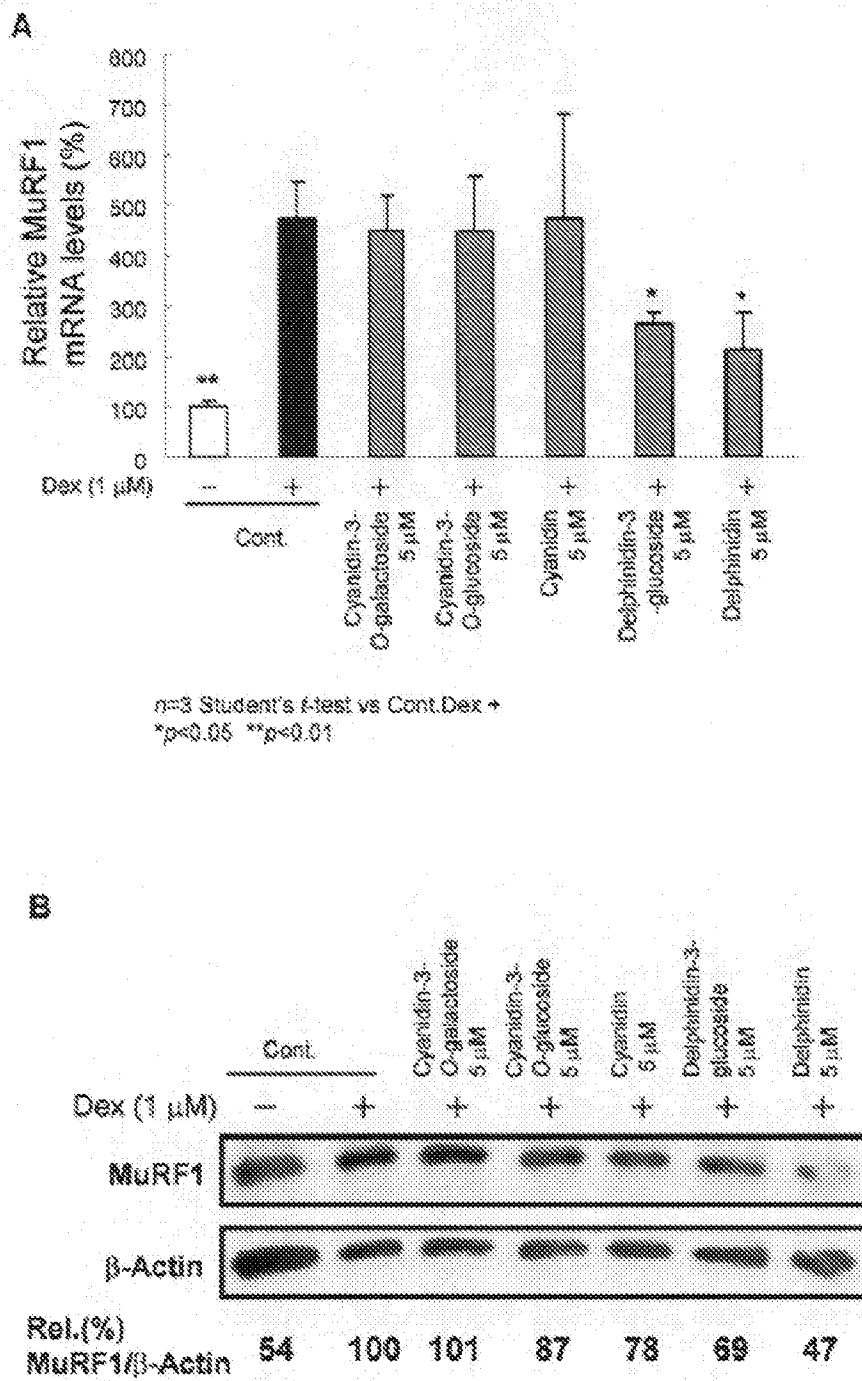
請求の範囲

- [請求項1] デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、エピガロカテキンガラート、Delphinidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside, Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Delphinidin-3-O- β -galactoside、Cyanidin-3-O- β -galactoside、Cyanidin-3- β -glucoside、Cyanidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -glucoside、Petunidin-3-O-(6-trans-p-coumaroyl)- β -galactoside、Petunidin-3- β -glucoside、メチル化カテキン、ケルセチン配糖体、ミリセチン配糖体、及びテオガリンから選択されるポリフェノールを含有する、筋萎縮阻害作用を有する組成物。
- [請求項2] デルフィニジン、デルフィニジングルコシド、及びエピガロカテキンガラートから 選択されるポリフェノールを含有する、請求項1に記載の筋萎縮阻害作用を有する組成物。
- [請求項3] 筋萎縮原因遺伝子の発現を抑制することにより、筋萎縮を阻害する作用を有する、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] デルフィニジン又はデルフィニジングルコシドを含有する、請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] 筋萎縮原因遺伝子がMuRF1である、請求項3又は4に記載の組成物。
- [請求項6] 組成物が食品、栄養補助食品、機能性食品又は医薬品である、請求項1から5のいずれかに記載の組成物。

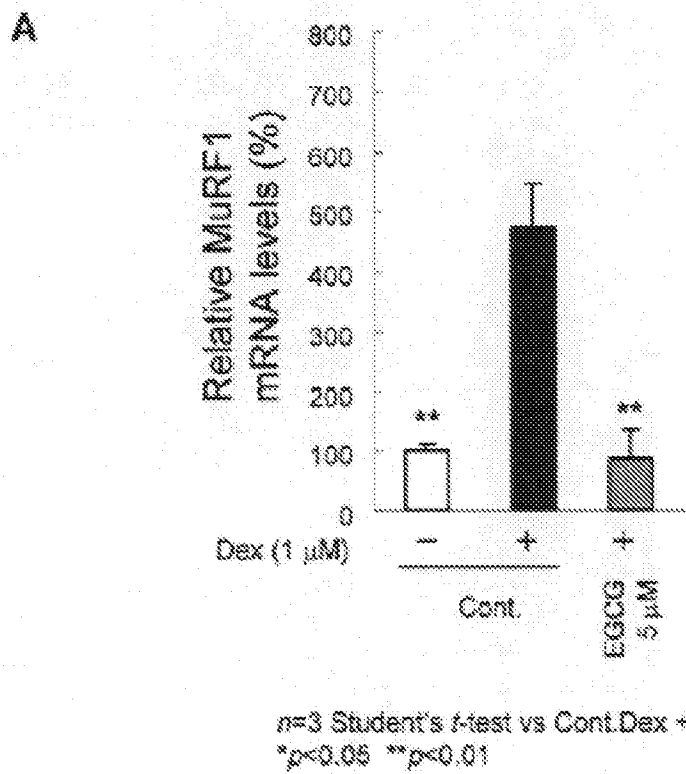
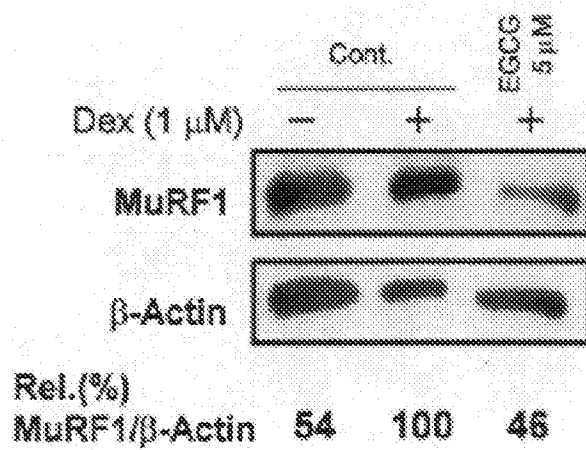
[Fig. 1]



[図2]



[図3]

**B**

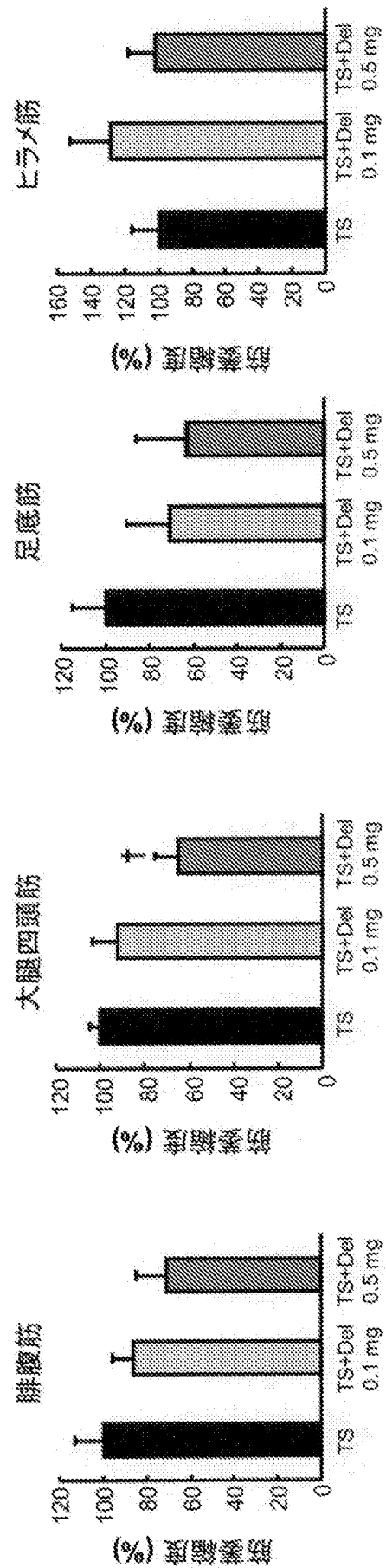
[図4]

A

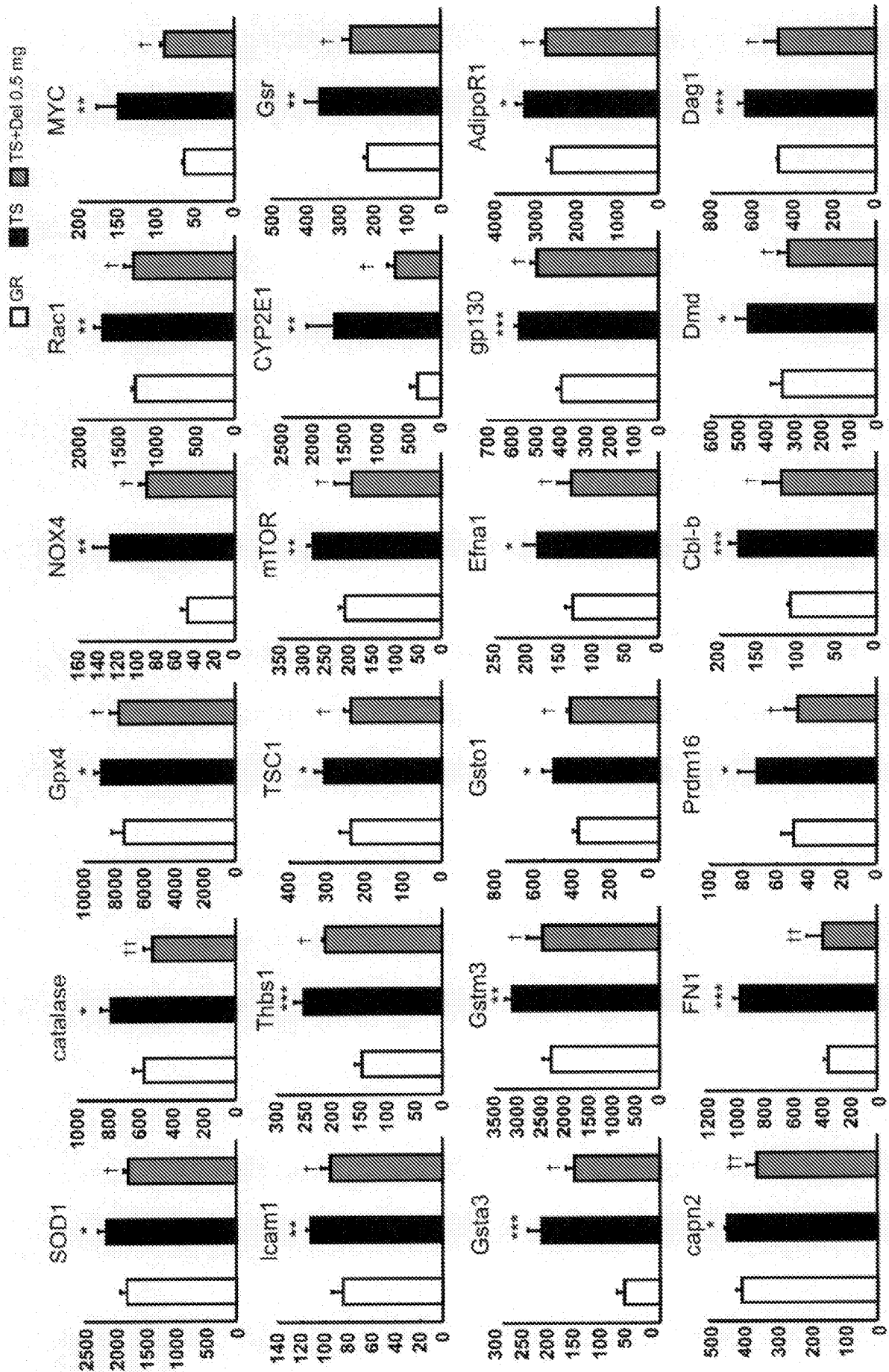
群	ヒラメ筋	足底筋	腓腹筋	大腿四頭筋
GR	0.64 ± 0.01	1.32 ± 0.01	10.5 ± 0.09	17.3 ± 0.10
TS	0.53 ± 0.02 ^{***}	1.16 ± 0.02 ^{***}	9.0 ± 0.20 ^{***}	15.3 ± 0.10 ^{***}
TS+Del 0.1 mg	0.49 ± 0.03	1.20 ± 0.03	9.2 ± 0.13	15.5 ± 0.22
TS+Del 0.5 mg	0.53 ± 0.04	1.22 ± 0.04	9.4 ± 0.20	16.2 ± 0.21 [†]

The values represent means ± S.E. n=6 ***p<0.001 vs. GR †p<0.05 vs. TS

B



[5]



The values represent means $\pm$ S.D. n=3. $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. GR † $p < 0.05$ ‡ $p < 0.01$ vs. TS

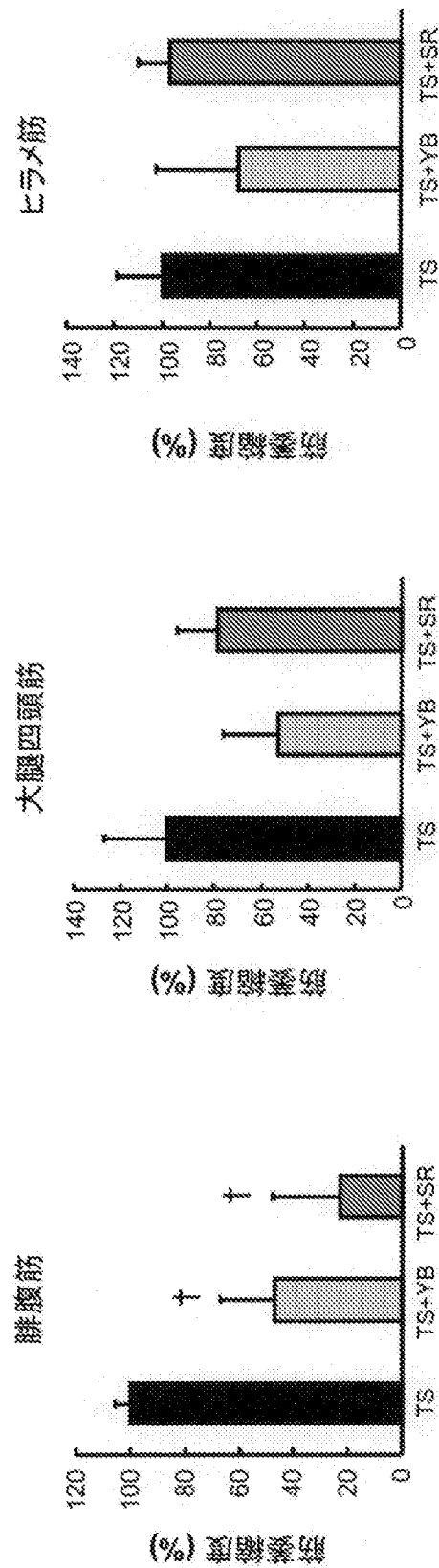
[図6]

A

群	ヒラメ筋	足底筋	腓腹筋	大腿四頭筋
GR	0.59 ± 0.02 ^{***}	1.16 ± 0.03	10.2 ± 0.25 ^{**}	15.8 ± 0.04 ^{***}
TS	0.47 ± 0.02	1.16 ± 0.04	9.0 ± 0.07	14.0 ± 0.51
TS+YB	0.51 ± 0.04	1.15 ± 0.06	9.6 ± 0.25 [†]	14.9 ± 0.44
TS+SR	0.47 ± 0.02	1.09 ± 0.06	9.9 ± 0.31 [†]	14.4 ± 0.33

The values represent means ± S.E. n=5 ^{**}p<0.01 ^{***}p<0.001 vs. GR [†]p<0.05 vs. TS

B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/054499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/353(2006.01)i, A23L1/30(2006.01)i, A61K31/7048(2006.01)i,
A61P21/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/353, A23L1/30, A61K31/7048, A61P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) ,
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Press Release, Cha Shin Hinshu 'Sanruju' Anthocyanin o Oku Fukumu Shin Type no Cha Hinshu o Ikusei, 20 November 2009 (20.11.2009)	1-6
X Y	ISMAEIL IBRAHIM HEMDAN Dalia et al., Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes, J Med Invest, 2009.02, Vol. 56, No. 1, 2, pp. 26-32	1-3, 5, 6 4
X Y	WO 2008/004340 A1 (KAO CORP.), 10 January 2008 (10.01.2008), claims; examples & JP 2008-13473 A & US 2009/0281174 A1 & EP 2036552 A1	1-3, 5, 6 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 March, 2011 (31.03.11)

Date of mailing of the international search report
12 April, 2011 (12.04.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/054499

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-089387 A (OTSUKA PHARMA CO., LTD.), 03 April 2001 (03.04.2001), claims; examples & WO 2001/021186 A1	1-6
Y	JP 2002-338464 A (KIKKOMAN CORP.), 27 November 2002 (27.11.2002), claims; examples (Family: none)	1-6
Y	JP 2006-328031 A (ASAHI BREWERIES LTD.), 07 December 2006 (07.12.2006), claims; examples & WO 2006/129569 A1	1-6
Y	ICHIYANAGI T et al., Comparisons of Anthocyanin Reactivity towards Hydroxyl Radical, Superoxide Anion and Singlet Oxygen, ITE Lett Batter New Technol Med, 2003, Vol. 4, No. 6, pp.788-793	1-6
Y	ICHIYANAGI T et al., Kinetic Comparisons of Anthocyanin Reactivities towards 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) (AAPH) Radicals, Hydrogen Peroxide and tert-Buthylhydroperoxide by Capillary Zone Electrophoresis, Chem Pharm Bull, 2004.04.01, Vol. 52, No. 4, pp. 434-438	1-6
Y	SEERAM N P et al., Inhibition of Lipid Peroxidation and Structure-Activity-Related Studies of the Dietary Constituents Anthocyanins, Anthocyanidins, and Catechins., J Agric Food Chem, 2002.09.11, Vol. 50, No. 19, pp. 5308-5312	1-6
P,X	Reia KOSAKA et al., "Anthocyanin-rui no Kokkakukin Saibo ni Okeru Kin Ishuku Gen'in Idenshi Hatsugen no Sogai Sayo", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2010 Nendo (Heisei 22 Nendo) Taikai Koen Yoshishu, 05 March 2010 (05.03. 2010), page 274, 4AKa06	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/353 (2006.01)i, A23L1/30 (2006.01)i, A61K31/7048 (2006.01)i, A61P21/00 (2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/353, A23L1/30, A61K31/7048, A61P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	プレスリリース 茶新品種「サンルージュ」 アントシアニンを多く含む新タイプの茶品種を育成, 2009.11.20	1-6
X	ISMAEIL IBRAHIM HEMDAN Dalia et al.,	1-3, 5, 6
Y	Polyphenols prevent clinorotation-induced expression of atrogenes in mouse C2C12 skeletal myotubes, J Med Invest, 2009.02, Vol. 56, No. 1,2, pp. 26-32	4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 1 . 0 3 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 2 . 0 4 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

原口 美和

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 8 4 4

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	WO 2008/004340 A1 (KAO CORP) 2008.01.10, 特許請求の範囲、実施例 & JP 2008-13473 A & US 2009/0281174 A1 & EP 2036552 A1	1-3, 5, 6 4
Y	JP 2001-089387 A (OTSUKA PHARMA CO LTD) 2001.04.03, 特許請求の範囲、実施例 & WO 2001/021186 A1	1-6
Y	JP 2002-338464 A (KIKKOMAN CORP) 2002.11.27, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2006-328031 A (ASAHI BREWERIES LTD) 2006.12.07, 特許請求の範囲、実施例 & WO 2006/129569 A1	1-6
Y	ICHIYANAGI T et al., Comparisons of Anthocyanin Reactivity towards Hydroxyl Radical, Superoxide Anion and Singlet Oxygen, ITE Lett Batter New Technol Med, 2003, Vol. 4, No. 6, pp.788-793	1-6
Y	ICHIYANAGI T et al., Kinetic Comparisons of Anthocyanin Reactivities towards 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) (AAPH) Radicals, Hydrogen Peroxide and tert-Buthylhydroperoxide by Capillary Zone Electrophoresis, Chem Pharm Bull, 2004.04.01, Vol. 52, No. 4, pp. 434-438	1-6
Y	SEERAM N P et al., Inhibition of Lipid Peroxidation and Structure-Activity-Related Studies of the Dietary Constituents Anthocyanins, Anthocyanidins, and Catechins., J Agric Food Chem, 2002.09.11, Vol. 50, No. 19, pp. 5308-5312	1-6
P, X	高坂玲亜 他, アントシアニン類の骨格筋細胞における筋萎縮原因遺伝子発現の阻 害作用, 日本農芸化学会 2010 年度 (平成 22 年度) 大会講演要旨集, 2010.03.05, p. 274, 4AKa06	1-6