

(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
2022年5月12日(12.05.2022)



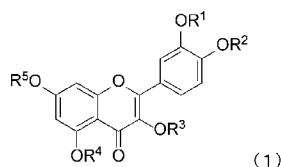
(10) 国際公開番号

WO 2022/097657 A1

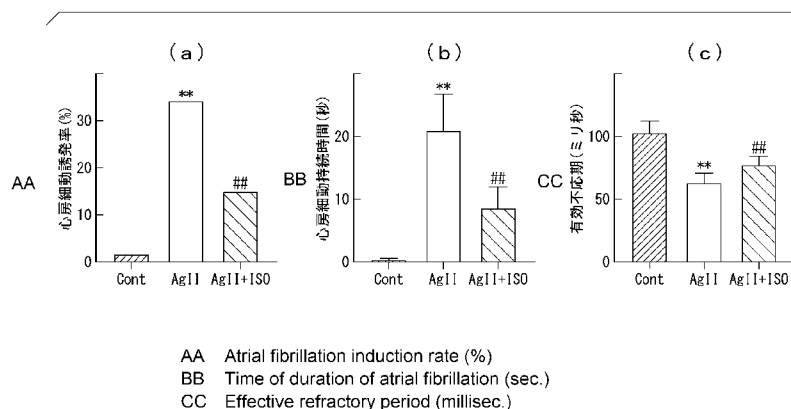
- (51) 国際特許分類:
A61K 31/353 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) A61P 9/06 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/040480
- (22) 国際出願日: 2021年11月4日(04.11.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2020-184117 2020年11月4日(04.11.2020) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人産業技術総合研究所(NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)
- [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞が関 1丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 磯田 博子(ISOEDA Hiroko); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
富永 健一(TOMINAGA Ken-ichi); 〒3058560 茨城県つくば市梅園1-1-1 中央第1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 西澤 和純, 外(NISHIZAWA Kazuyoshi et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC AGENT FOR ATRIAL FIBRILLATION, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 心房細動の予防又は治療剤及びその使用



[図3]



(57) Abstract: A prophylactic or therapeutic agent for atrial fibrillation, which contains a compound represented by formula (1) (in formula (1), R¹ to R⁵ independently represent a hydrogen atom or a methyl group, in which at least one of R¹ to R⁵ represents a methyl group) as an active ingredient; a pharmaceutical composition for preventing or treating atrial fibrillation, which comprises a compound represented by formula (1) and a pharmaceutically acceptable carrier; and a food composition for preventing or ameliorating atrial fibrillation, which contains

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

a compound represented by formula (1) as an active ingredient.

(57) 要約: 下記式(1)で表される化合物(式(1)中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも1つはメチル基である。)を有効成分とする、心房細動の予防又は治療剤; 下記式(1)で表される化合物と薬学的に許容される担体とを含有する、心房細動の予防又は治療用医薬組成物; 及び、下記式(1)で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防又は改善用食品組成物。

明 細 書

発明の名称：心房細動の予防又は治療剤及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、心房細動の予防又は治療剤及びその使用に関する。より詳細には、本発明は、心房細動の予防又は治療剤、心房細動の予防又は治療用医薬組成物、心房細動の予防又は改善用食品組成物及び心房細動の予防又は改善方法に関する。本願は、2020年11月4日に、日本に出願された特願2020-184117号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 心房細動は、心房内に流れる電気信号の乱れによって起きる不整脈の一種であり、心房が痙攣したように細かく震え、血液をうまく全身に送り出せなくなる疾患である。心房細動の治療薬としては、アミオダロン、ソタロール、アトロバスタチン等が知られている（例えば、非特許文献1、2を参照。）

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Bramah N Singh., et al., Amiodarone versus Sotalol for Atrial Fibrillation, N Engl J Med, 352, 1861-1872, 2005.

非特許文献2：Koichiro Kumagai, et al., The HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin prevents atrial fibrillation by inhibiting inflammation in a canine sterile pericarditis model. Cardiovasc Res, 62, 105-111, 2004.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかしながら、現在市場にある抗不整脈薬による心房細動予防効果には限界があり、半数以上の例が再発を繰り返すか、永続性心房細動に移行する。

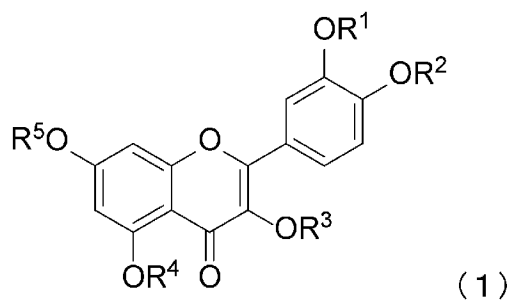
また、ステロイドホルモン等による心房細動の再発率の抑制の報告もあるが、様々な副作用が発現する可能性が高く、長期使用は見込めない。このように、心房細動に対する予防的な治療法（アップストリーム治療）は明確に確立されておらず、副作用の少ない薬物の開発が急務である。そこで、本発明は、心房細動を予防、改善又は治療する技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 下記式（1）で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防又は治療剤。

[化1]

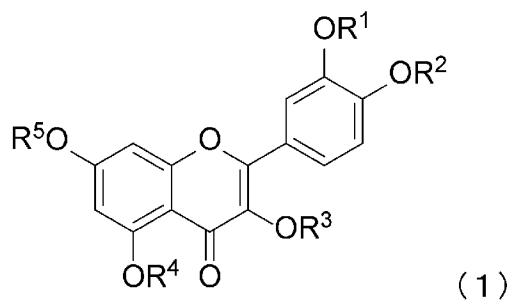


[式（1）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも1つはメチル基である。]

[2] [1] に記載の予防又は治療剤と薬学的に許容される担体とを含有する、心房細動の予防又は治療用医薬組成物。

[3] 下記式（1）で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防又は改善用食品組成物。

[化2]



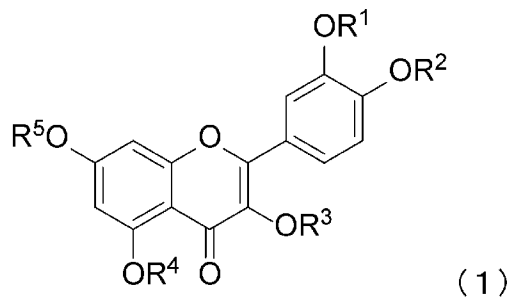
〔式（１）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも１つはメチル基である。〕

〔４〕機能性表示食品である、〔３〕に記載の心房細動の予防又は改善用食品組成物。

〔５〕特定保健用食品である、〔３〕に記載の心房細動の予防又は改善用食品組成物。

〔６〕対象に下記式（１）で表される化合物を摂取させる工程を含む、心房細動の予防又は改善方法（ヒトに対する医療行為を除く。）。

〔化３〕



〔式（１）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも１つはメチル基である。〕

発明の効果

〔0006〕 本発明により、心房細動を予防、改善又は治療する技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔0007〕〔図１〕図１（ａ）～（ｃ）は、実験例１における、各群のマウスへの薬物の投与スケジュールを示す図である。

〔図２〕図２は、実験例２における実験の様子を撮影したレントゲン写真である。

〔図３〕図３（ａ）は、実験例２で測定した各群のマウスの心房細動誘発率を示すグラフである。図３（ｂ）は、実験例２で測定した各群のマウスの心房細動持続時間を示すグラフである。図３（ｃ）は、実験例２で測定した各群の

マウスの有効不応期を示すグラフである。

[図4]図4 (a) ~ (c) は、実験例3で撮影した各群のマウスの心エコー図を示す代表的な写真である。図4 (d) は、各群のマウスの心エコー図に基づいて、心房経を測定した結果を示すグラフである。図4 (e) は、各群のマウスから心臓を摘出後、心房の重さを体重で除した値 (mg/g) を示すグラフである。

[図5]図5 (a) ~ (c) は、実験例4における各群のマウスの標本の組織化学染色の結果を示す代表的な顕微鏡写真である。図5 (d) は、各群のマウスの標本の組織化学染色の結果に基づいて、心房全体の面積に対する線維化領域が占める面積の割合 (%) を算出した結果を示すグラフである。

[図6]図6 (a) は、実験例5におけるウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。図6 (b) は、図6 (a) に基づいて、NF κ Bタンパク質の発現量を数値化したグラフである。図6 (c) は、図6 (a) に基づいて、TPRCタンパク質の発現量を数値化したグラフである。

[図7]図7 (a) ~ (c) は、実験例6において、マルチ電極アレイ (MEA) システムで測定された代表的な波形である。図7 (d) は、実験例6において、MEAシステムで測定された波形に基づいて、活動電位持続時間を数値化したグラフである。

[図8]図8 (a) は、実験例7における、心房筋細胞のCa²⁺ラインスキャンイメージングの結果を示す代表的な画像である。図8 (b) は、実験例7において、各群の心房筋細胞のCa²⁺ Sparks発生頻度を測定した結果を示すグラフである。

[図9]図9は、実験例8及び9における、ウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。

[図10]図10 (a) ~ (c) は、図9の結果を数値化したグラフである。

[図11]図11 (a) 及び (b) は、実験例11における定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。

[図12]図12は、実験例12における、HL-1細胞のCa²⁺ラインスキャン

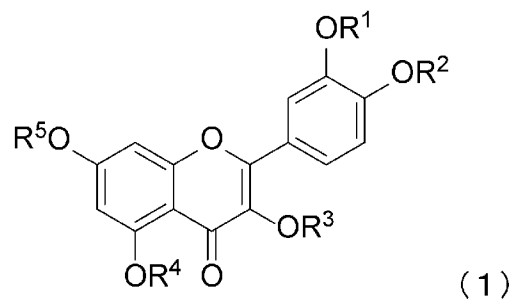
ンイメージングの結果を示す代表的な画像である。

発明を実施するための形態

[0008] [心房細動の予防又は治療剤]

1 実施形態において、本発明は、下記式（１）で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防剤又は心房細動の治療剤を提供する。

[0009] [化4]



[式（１）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも１つはメチル基である。]

[0010] 本明細書において、「有効成分とする」とは、上記式（１）で表される化合物の効能又は活性を達成するのに十分な量を含むことを意味する。あるいは、上記式（１）で表される化合物を主要な活性成分として含むことを意味する。

[0011] 実施例において後述するように、発明者らは、上記式（１）で表わされる化合物を投与することにより、心房細動を予防又は治療することができることを明らかにした。

[0012] また、実施例において後述するように、発明者らは、上記式（１）で表わされる化合物を投与することにより、高血圧状態のマウスの血圧が低下することを明らかにした。高血圧は心房細動の危険因子の一つである。したがって、上記式（１）で表わされる化合物を投与する対象は、一般的に高血圧と定義されている140mmHg以上の血圧を有する患者であってもよい。

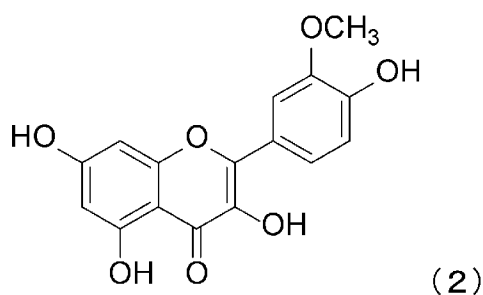
[0013] また、上記式（１）で表わされる化合物は、高血圧の予防又は治療剤であるということもできる。

[0014] 上記式（１）で表される化合物は、Ｏ－メチル化フラボノールとして知ら

れる一群の化合物である。Ｏ－メチル化フラボノールとしては、イソラムネチン、タマリキセチン、３－Ｏ－メチルケルセチン、アザレアチン、ラムネチン等が挙げられる。

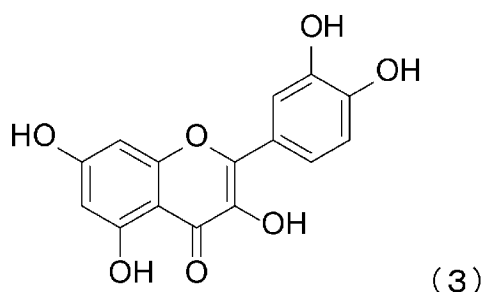
[0015] 上記式（１）で表される化合物のうち、 R^1 がメチル基であり、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 が水素原子である化合物は、イソラムネチンと呼ばれるポリフェノールの一種である。イソラムネチンの化学式を下記式（２）に示す。イソラムネチンは乾燥地植物等に含まれることが知られており、日本ではイチョウの葉やセリ科植物中に存在することが知られている。

[0016] [化5]



[0017] また、イソラムネチンは、玉ネギ外皮中に豊富に存在するケルセチンを原料として化学的に合成することができる。ケルセチンは、式（１）で表される化合物のうち、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 の全てが水素原子である化合物である。ケルセチンの化学式を下記式（３）に示す。

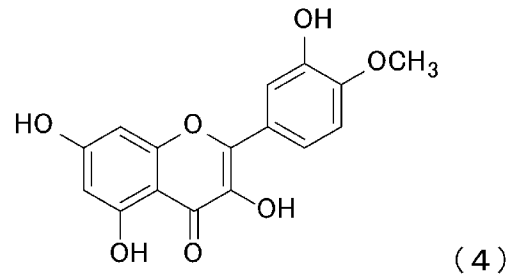
[0018] [化6]



[0019] 上記式（１）で表される化合物のうち、 R^2 がメチル基であり、 R^1 、 R^3 、 R^4 、 R^5 が水素原子である化合物は、タマリキセチンと呼ばれるポリフェノールの一種である。タマリキセチンの化学式を下記式（４）に示す。

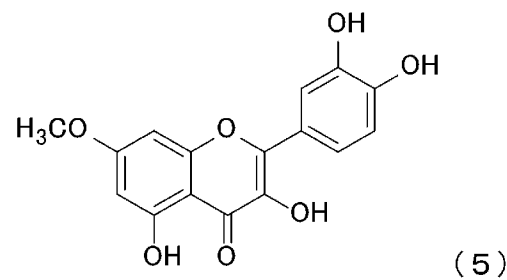
[0020]

[化7]



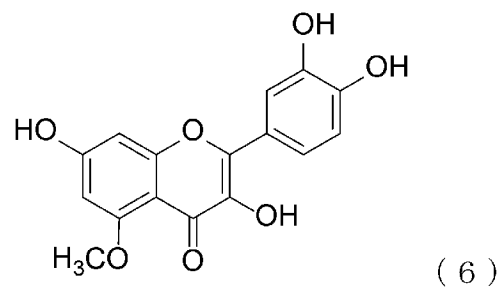
[0021] 上記式（１）で表される化合物のうち、 R^5 がメチル基であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 が水素原子である化合物は、ラムネチンと呼ばれるポリフェノールの一種である。ラムネチンの化学式を下記式（５）に示す。

[0022] [化8]



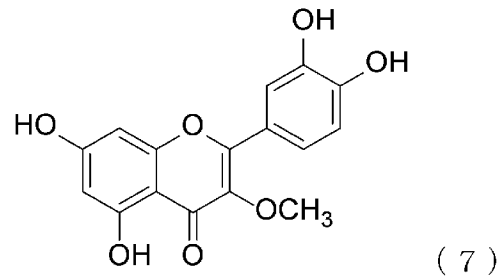
[0023] 上記式（１）で表される化合物のうち、 R^4 がメチル基であり、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^5 が水素原子である化合物は、アザレアチンと呼ばれるポリフェノールの一種である。アザレアチンの化学式を下記式（６）に示す。

[0024] [化9]



[0025] 上記式（１）で表される化合物のうち、 R^3 がメチル基であり、 R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 が水素原子である化合物は、３－Ｏ－メチルケルセチンと呼ばれるポリフェノールの一種である。３－Ｏ－メチルケルセチンの化学式を下記式（７）に示す。

[0026] [化10]



[0027] 本実施形態の予防又は治療剤は、これらのＯ－メチル化フラボノールを有効成分とするものであってもよい。これらのＯ－メチル化フラボノールは天然物から抽出されたものであってもよいし、天然に豊富に存在するケルセチンを原料として合成されたものであってもよいし、その他非天然物を原料として合成したものであってもよい。

[0028] ケルセチンは、イソラムネチンをはじめとするＯ－メチル化フラボノールと比較すると、心房細動を予防又は改善する効果が低い傾向にある。イソラムネチンをはじめとするＯ－メチル化フラボノールは、ケルセチンと比較して代謝されにくく、長時間血漿中に存在することにより、効果的かつ持続的に心房細動を予防又は改善することができる。

[0029] イソラムネチンをはじめとするＯ－メチル化フラボノールは現在までの研究において、大きな副作用は報告されていない。更に、イソラムネチンをはじめとするＯ－メチル化フラボノールは、心・血管系疾患以外に着目した実験においても、抗酸化作用、抗炎症作用、抗肥満作用、抗癌作用等の様々な作用を有することが報告されている。したがって、イソラムネチンをはじめとするＯ－メチル化フラボノールの投与は、心房細動等の心・血管系に対する効果のみならず、人体に様々な有益な効果を生み出すことができると考えられる。

[0030] [心房細動の予防又は治療用医薬組成物]

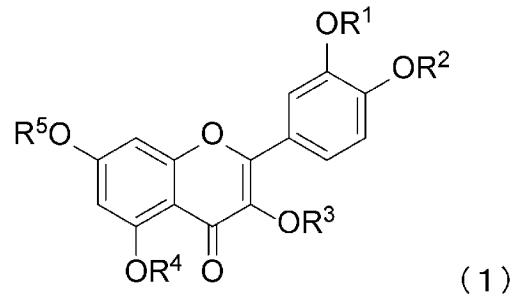
1 実施形態において、本発明は、上述した心房細動の予防又は治療剤と薬学的に許容される担体とを含有する、心房細動の予防又は治療用医薬組成物を提供する。

- [0031] 本実施形態の医薬組成物は、常法（例えば、日本薬局方記載の方法）にしたがって、例えば、タブレット剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等の形態で経口的に、あるいは、注射剤、坐剤、皮膚外用剤等の形態で非経口的に投与することができる。
- [0032] 薬学的に許容される担体としては、通常医薬組成物の製剤に用いられるものを特に制限なく用いることができる。より具体的には、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤；デンプン、結晶性セルロース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤；水、エタノール、グリセリン等の注射剤用溶剤；ゴム系粘着剤、シリコーン系粘着剤等の粘着剤等が挙げられる。
- [0033] 医薬組成物は添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン、マルチトール等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノール等の安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤等が挙げられる。
- [0034] 医薬組成物は、上記の担体及び添加剤を適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。医薬組成物は、例えば、1日当たり1回経口投与するように製剤化されていてもよい。
- [0035] 医薬組成物の投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、経口投与の場合には、例えば、投与単位形態あたり0.1～100mg/kg体重の有効成分（上記式（1）で表される化合物）を投与すればよい。また、非経口投与の場合には、例えば、投与単位形態あたり0.01～50mgの有効成分を投与すればよい。
- [0036] [心房細動の予防又は改善用食品組成物]

1実施形態において、本発明は、下記式（1）で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防又は改善用食品組成物を提供する。実施例におい

て後述するように、本実施形態の食品組成物を摂取することにより、心房細動を予防、改善又は治療することができる。

[0037] [化11]



[式(1)中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも1つはメチル基である。]

[0038] 本実施形態の食品組成物は、例えば、サプリメントの形態であってもよいし、ヨーグルトやゲル状食品等の半固形状の形態であってもよいし、飲料の形態であってもよいし、任意の調理済み食品の形態等であってもよい。サプリメントの形状としては、例えば、タブレット剤、カプセル剤等の形状が挙げられる。

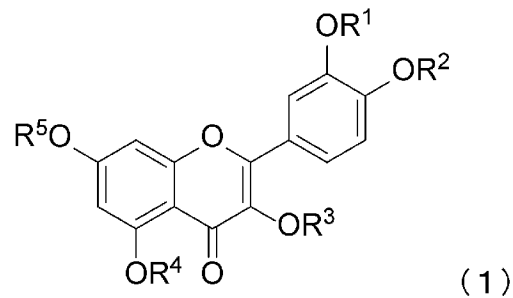
[0039] 本実施形態の食品組成物は、機能性表示食品であってもよい。「機能性表示食品」とは、科学的根拠を基に商品パッケージに機能性を表示するものとして、消費者庁に届け出られた食品を意味する。

[0040] 本実施形態の食品組成物は、特定保健用食品であってもよい。特定保健用食品とは、健康の維持増進に役立つことが科学的根拠に基づいて認められ、その効果の表示が許可されている食品を意味する。表示されている効果や安全性については国が審査を行い、食品ごとに消費者庁長官により許可される。実施例において後述するように、本実施形態の食品組成物は、心房細動の予防又は改善効果を有することが確認されている。

[0041] [心房細動の予防又は改善方法]

1 実施形態において、本発明は、対象に下記式(1)で表される化合物を摂取させる工程を含む、心房細動の予防又は改善方法(ヒトに対する医療行為を除く。)を提供する。

[0042] [化12]



[式(1)中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも1つはメチル基である。]

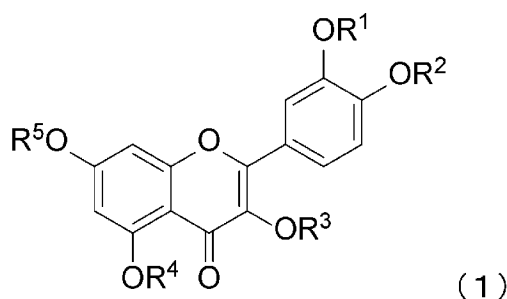
[0043] 本実施形態の方法において、対象としては心房細動患者又は患者が挙げられる。患者としては、特に限定されないが、例えば、イヌ、ネコ等の伴侶動物、ウシ等の家畜が挙げられる。ここで、医療行為とは、医師（医師の指示を受けた者を含む。）がヒトに対して治療を実施する行為を意味する。

[0044] 実施例において後述するように、対象に上記式(1)で表される化合物を摂取させることにより、心房細動を予防又は改善することができる。

[0045] [その他の実施形態]

1 実施形態において、本発明は、下記式(1)で表される化合物の有効量を、治療を必要とする患者に投与することを含む、心房細動の予防又は治療方法を提供する。

[0046] [化13]



[式(1)中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも1つはメチル基である。]

[0047] 1 実施形態において、本発明は、上記式(1)で表される化合物の有効量

を、治療を必要とする患者に投与することを含む、高血圧の予防又は治療方法を提供する。

[0048] 1実施形態において、本発明は、心房細動の予防又は治療に使用するための上記式(1)で表される化合物を提供する。

[0049] 1実施形態において、本発明は、高血圧の予防又は治療に使用するための上記式(1)で表される化合物を提供する。

[0050] 1実施形態において、本発明は、心房細動の予防又は治療剤を製造するための上記式(1)で表される化合物の使用を提供する。

[0051] 1実施形態において、本発明は、高血圧の予防又は治療剤を製造するための上記式(1)で表される化合物の使用を提供する。

実施例

[0052] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0053] [実験例1]

(動物の準備)

アンジオテンシンⅡの持続注入によるマウス心房細動モデルを用いて、イソラムネチン投与の影響を検討した。

[0054] C57BL/6マウス(オス、8週齢、チャールズリバー社)を、コントロール群(以下、「Cont群」という場合がある。)、アンジオテンシンⅡ投与群(以下、「AngⅡ群」という場合がある。)、アンジオテンシンⅡ及びイソラムネチン投与群(以下、「AngⅡ+ISO群」という場合がある。)の3つの群にランダムに割り当てた。

[0055] AngⅡ群及びAngⅡ+ISO群のマウスには、浸透圧ミニポンプ(型番「2002」、アルゼット社)を使用して、アンジオテンシンⅡ(1,000ng/kg/時間)を2週間継続して投与した。Cont群のマウスには、浸透圧ミニポンプに0.85%生理食塩水を注入した。

[0056] 浸透圧ミニポンプの埋め込みの1週間前から、AngⅡ+ISO群のマウスにイソラムネチン(5mg/kg)を3週間毎日腹腔内投与した。イソラ

ムネチンは、0.1%ジメチルスルホキシドと1%ポリプロピレングリコールを含む生理食塩水に懸濁し、1日0.3mLの一定量で投与した。

[0057] Cont群及びAgll群のマウスには、Agll+ISO群と同容量の溶液（0.1%ジメチルスルホキシド及び1%ポリプロピレングリコールを含む生理食塩水）を3週間毎日腹腔内投与した。図1（a）～（c）は、各群のマウスへの薬物の投与スケジュールを示す図である。図1（a）はCont群の薬物の投与スケジュールを示し、図1（b）はAgll群の薬物の投与スケジュールを示し、図1（c）はAgll+ISO群の薬物の投与スケジュールを示す。

[0058] イソラムネチンの投与開始前及び投与開始から3週間後に、各群のマウスの心エコーを行った。また、イソラムネチンの投与開始から3週間後に心房細動誘発実験を行った。心房細動誘発実験後、直ちに心臓を摘出して左心房を分離し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、組織化学染色を行った。組織化学染色に割り当てられなかったマウスの左心房は、さらなる分析のために液体窒素中で保存した。

[0059] [実験例2]

（心房細動誘発実験）

実験例1で用意した各群のマウスの右頸静脈を切断し、電極距離が2mmの2-Fr四極電極カテーテル（ユニークメディカル社）を右心房に挿入して電気生理学的検討を行い、心電図を測定した。図2は実験の様子を撮影したレントゲン写真である。

[0060] プログラム可能な刺激装置（型番「SEN-7203」、日本光電）を使用して、振幅6V、サイクル長20ミリ秒、パルス持続時間6ミリ秒、刺激時間30秒の心房バーストペーシングにより、心房細動を誘発した。各群のマウスで心房バーストペーシングを5回連続して行った。心房細動持続時間は、心房細動の開始と自発的終了の間の間隔として定義した。

[0061] また、プログラム可能な刺激装置（型番「SEN-7203」、日本光電）を使用して、拡張期刺激閾値の約2倍、パルス幅2ミリ秒で心房を定電圧

刺激し、心房の有効不応期（A E R P）を測定した。

[0062] A E R Pは、150ミリ秒の基本サイクル長で、連続した8つの基本刺激（S1×8）を行った後、5ミリ秒の単一の早期刺激（S2）を行って測定した。A E R Pは、キャプチャに失敗した最長のS1～S2間隔として定義した。

[0063] 図3（a）は、各群のマウスの心房細動誘発率を示すグラフである。心房細動誘発率（%）は、下記式（F1）により算出した。

心房細動誘発率（%）＝心房細動が発生した回数／心房バーストペーシングを行った回数×100 …（F1）

[0064] 図3（b）は、各群のマウスの心房細動持続時間を示すグラフである。図3（c）は、各群のマウスの有効不応期を示すグラフである。

[0065] 図3（a）～（c）中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「AngII」はアンジオテンシンII投与群の結果であることを示し、「AngII+ISO」はアンジオテンシンII及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。また、「**」はコントロール群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「#」はアンジオテンシンII投与群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「##」はアンジオテンシンII投与群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。

[0066] その結果、アンジオテンシンIIの投与により心房細動の誘発率が有意に上昇し、イソラムネチンの投与により心房細動の誘発率が有意に抑制されたことが明らかとなった。また、アンジオテンシンIIの投与により心房細動の持続時間が有意に延長し、イソラムネチンの投与により心房細動の持続時間が有意に短縮したことが明らかとなった。また、アンジオテンシンIIの投与により有効不応期が有意に短縮し、イソラムネチンの投与により有効不応期が有意に回復したことが明らかとなった。

[0067] 以上の結果は、イソラムネチンの投与により、心房細動を予防、改善又は治療できることを示す。

[0068] [実験例3]

(心房肥大の検討)

実験例1で用意した各群のマウスの心エコー検査を行い、イソラムネチンの投与が心房肥大に与える影響を検討した。心エコー検査は、ドップラー心エコー検査システム（型番「V e v o 2100」、ビジュアルソニックス社）を使用して行った。

[0069] まず、各群のマウスを1%イソフルランで麻酔した。続いて、傍胸骨短軸及び傍胸骨長軸2D心エコー図を乳頭筋のレベルで取得し、Bモード図で心房経を測定した。

[0070] 図4(a)～(c)は、各群のマウスの心エコー図を示す代表的な写真である。また、図4(d)は、各群のマウスの心エコー図に基づいて、心房経を測定した結果を示すグラフである。また、図4(e)は、各群のマウスから心臓を摘出後、心房の重さを体重で除した値(mg/g)を示すグラフである。

[0071] 図4(a)～(e)中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「AngII」はアンジオテンシンII投与群の結果であることを示し、「AngII+ISO」はアンジオテンシンII及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。また、図4(a)～(c)中、「LV」は左心室を示し、「Ao」は大動脈を示し、「LA」は左心房を示す。また、図4(d)及び(e)中、「*」はコントロール群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「**」はコントロール群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「#」はアンジオテンシンII投与群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0072] その結果、アンジオテンシンIIの投与により心房経が有意に延長し、イソラムネチンの投与により心房経が有意に短縮したことが明らかとなった。また、アンジオテンシンIIの投与により心房の重さが有意に増加し、イソラムネチンの投与により心房の重さが有意に減少したことが明らかとなった。

[0073] 以上の結果は、イソラムネチンの投与により、アンジオテンシンⅠⅠの投与による心房の肥大化を抑制できることを示す。

[0074] [実験例 4]

(組織化学染色)

実験例 1 で調製した、各群のマウスの左心房の 4 %パラホルムアルデヒド固定標本の切片を、マッソントリクローム染色及びヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡で観察した。

[0075] 図 5 (a) ~ (c) は、各群のマウスの標本の代表的な顕微鏡写真である。スケールバーは 50 μ m である。また、図 5 (d) は、各群のマウスの標本の組織化学染色の結果に基づいて、心房全体の面積に対する線維化領域が占める面積の割合 (%) を算出した結果を示すグラフである。

[0076] 図 5 (a) ~ (d) 中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「AngⅠⅠ」はアンジオテンシンⅠⅠ投与群の結果であることを示し、「AngⅠⅠ+ISO」はアンジオテンシンⅠⅠ及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。また、図 5 (d) 中、「**」はコントロール群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「#」はアンジオテンシンⅠⅠ投与群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0077] その結果、アンジオテンシンⅠⅠの投与により、心房全体の面積に対する線維化領域が占める面積の割合 (%) が有意に増加し、イソラムネチンの投与により上記割合が有意に減少したことが明らかとなった。

[0078] この結果は、イソラムネチンの投与により、アンジオテンシンⅠⅠの投与による心房の線維化を抑制できることを示す。

[0079] [実験例 5]

(ウエスタンブロッティング 1)

実験例 1 で調製した、各群のマウスの左心房からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにより、炎症に関連するタンパク質、心筋肥大及び線維化に関連するタンパク質の発現量を検討した。

[0080] 炎症に関連するタンパク質として NF- κ B タンパク質を検出した。また、

心筋肥大及び線維化に関連するタンパク質として、TPRC6タンパク質を検出した。また、ローディングコントロールとして β アクチンタンパク質を検出した。

[0081] 図6(a)はウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。また、図6(b)は、図6(a)に基づいて、NF κ Bタンパク質の発現量を数値化したグラフである。また、図6(c)は、図6(a)に基づいて、TPRC6タンパク質の発現量を数値化したグラフである。

[0082] 図6(a)～(c)中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「AngII」はアンジオテンシンII投与群の結果であることを示し、「AngII+ISO」はアンジオテンシンII及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。また、図6(b)及び(c)中、「*」はコントロール群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「**」はコントロール群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「#」はアンジオテンシンII投与群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0083] その結果、アンジオテンシンIIの投与により、心臓における炎症、肥大及び線維化に関連するタンパク質の発現量が有意に増加し、イソラムネチンの投与により上記発現量が有意に減少したことが明らかとなった。

[0084] この結果は、イソラムネチンの投与により、アンジオテンシンIIの投与による心臓の炎症、肥大及び線維化を抑制できることを示す。

[0085] [実験例6]

(培養細胞を用いた検討)

マウス心房筋由来細胞株であるHL-1細胞を用いて、インビトロにおける検討を行った。

[0086] 6ウェルのマルチ電極アレイ(MEA)ディッシュ(型番「60-6well MEA」、マルチチャンネルシステムズ社)の表面を、 $5 \mu\text{g/mL}$ フィブロネクチンを含む0.02%(w/v)ゼラチンの溶液でプレコートした。

- [0087] 続いて、HL-1細胞を播種し、100 U/mLペニシリン、100 μ g/mLストレプトマイシン、100 μ Mノルエピネフリン、30 mM α -アスコルビン酸、2 mM α -グルタミン、10% FBSを添加したClaycomb培地で、5% CO₂、37℃、加湿下で2日間培養した。
- [0088] 続いて、HL-1細胞を、コントロール群（以下、「Cont群」という場合がある。）、アンジオテンシンII投与群（以下、「AngII群」という場合がある。）、アンジオテンシンII及びイソラムネチン投与群（以下、「AngII+ISO群」という場合がある。）の3つの群に分けた。
- [0089] AngII群の細胞には、培地にアンジオテンシンII 1 μ Mを添加した。AngII群+ISO群の細胞には、培地にアンジオテンシンII 1 μ M及びイソラムネチン10 μ Mを添加した。続いて、24時間後、細胞密度が約80%コンフルエントになった時点で実験を行った。
- [0090] 各群のMEAディッシュを37℃に設定されたチャンバーに入れ、MEA 2100システム（マルチチャンネルシステムズ社）及びMC-Rackソフトウェア（マルチチャンネルシステムズ社）を使用して、各群のHL-1細胞に±7500 mVのバイポーラ刺激を3 Hzで30回印加し、その波形から活動電位持続時間（APD）を測定した。
- [0091] 図7（a）～（c）は、MEAシステムで測定された代表的な波形である。図7（d）は、MEAシステムで測定された波形に基づいて、活動電位持続時間を数値化したグラフである。
- [0092] 図7（a）～（d）中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「AngII」はアンジオテンシンII投与群の結果であることを示し、「AngII+ISO」はアンジオテンシンII及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。また、図7（b）中、円で囲んだ領域は、遅延後脱分極（DAD）の波形を示す。また、図7（d）中、「**」はコントロール群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「##」はアンジオテンシンII投与群に対して $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。

[0093] その結果、アンジオテンシンⅠⅠの投与により、HL-1細胞の活動電位持続時間が有意に延長し、イソラムネチンの投与により上記活動電位持続時間の延長が有意に回復したことが明らかとなった。

[0094] また、アンジオテンシンⅠⅠの投与により、心房細動を誘発する因子として知られている、遅延後脱分極（DAD）が観察されたが、イソラムネチンの投与によりDADが消失した。

[0095] 以上の結果は、イソラムネチンの投与により、心房細動を予防、改善又は治療できることを更に支持するものである。

[0096] [実験例7]

（単離心房筋細胞を用いた Ca^{2+} イメージング）

実験例1で調製した、Cont群、AgⅠⅠ群及びAgⅠⅠ+ISO群の各群のマウスの心臓から、ランゲンドルフ灌流心実験法を用いて、心房筋細胞を単離した。

[0097] 続いて、細胞内カルシウムイオン測定試薬であるFluo-4-AMをTyrode bufferに溶解し、単離した心房筋細胞に10分間負荷した。続いて、細胞を1.8mMの Ca^{2+} を含むTyrode bufferで洗浄した。続いて、細胞を1.8mMの Ca^{2+} を含むTyrode buffer中に維持した状態で、共焦点 Ca^{2+} イメージングを行った。

[0098] Ca^{2+} ラインスキャンイメージング（1.82ms/line）は、Zeiss LSM 800共焦点顕微鏡（Zeiss社）を用いて、単一の細胞に焦点を当てて行った。

[0099] ベースラインが安定した後、イソプロテレノール（1 μ M）を細胞に添加した。続いて、 Ca^{2+} Sparks発生頻度を、ImageJ softwareのplugin softであるSpark masterを使用して評価した。

[0100] 図8（a）は、 Ca^{2+} ラインスキャンイメージングを実施した際の各群の心房筋細胞の代表的な画像である。また、図8（b）は、各群の Ca^{2+} Sparks発生頻度（Sparks/100 μ m/s）を測定した結果を示す

グラフである。

[0101] 図8 (a) 及び (b) 中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「Ang II」はアンジオテンシン II 投与群の結果であることを示し、「Ang II + ISO」はアンジオテンシン II 及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。また、図8 (b) 中、グラフの縦軸は Ca^{2+} Sparks 発生頻度を示し、「*」はコントロール群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示し、「#」はアンジオテンシン II 投与群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0102] その結果、アンジオテンシン II 投与によって Ca^{2+} Sparks 発生頻度が有意に増加し、イソラムネチン投与によって Ca^{2+} Sparks 発生頻度が有意に減少したことが明らかとなった。

[0103] この結果は、イソラムネチン投与によって、アンジオテンシン II 誘発性のタイプ2リアノジン受容体 (RyR2) からの Ca^{2+} の漏れが抑制されたことを示す。

[0104] [実験例8]

(ウエスタンブロッティング2)

タイプ2リアノジン受容体 (RyR2) はカルシウムハンドリングに重要な分子である。実験例1で調製した、各群のマウスの左心房からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにより、RyR2の活性に最も寄与している分子である、CAMK II のタンパク発現を検出した。ローディングコントロールとして β アクチンタンパク質を検出した。なお、CAMK II は、活性酸素等によって活性型のoxidized-CAMK II へ変換されることが知られている。

[0105] 図9は、ウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。また、図10 (a) ~ (c) は、図9の結果を数値化したグラフである。図9及び図10 (a) ~ (c) 中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「Ang II」はアンジオテンシン II 投与群の結果であることを示し、「Ang II + ISO」はアンジオテンシン II 及びイソラムネチン投与群の

結果であることを示す。

[0106] その結果、アンジオテンシンⅡの投与により、カルシウムハンドリングに関連するタンパク質である *oxidized-CAMKⅡ* (*ox-CAMKⅡ*) の発現量が有意に増加し、イソラムネチンの投与により上記発現量が有意に減少したことが明らかとなった。

[0107] この結果は、イソラムネチンの投与により、アンジオテンシンⅡの投与によるカルシウムハンドリングの異常を調節し、電気的リモデリングを調節できることを示す。

[0108] [実験例 9]

(ウエスタンブロッティング 3)

MAPK 経路の活性は、組織、細胞の炎症、線維化、肥大を引き起こすことが知られている。実験例 1 で調製した、各群のマウスの左心房からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロッティングにより、MAPK 経路の活性に寄与する分子である、JNK、ERK のタンパク発現を検出した。また、ローディングコントロールとして β アクチンタンパク質を検出した。なお、JNK、ERK は、リン酸化されることで、活性型になることが知られている。

[0109] 図 9 は、ウエスタンブロッティングの結果を示す写真である。また、図 10 (a) ~ (c) は、図 9 の結果を数値化したグラフである。図 9 及び図 10 (a) ~ (c) 中、「Cont」、「AgⅡ」、「AgⅡ+ISO」は上述した通りである。また、p-JNK、p-ERK は、リン酸化 JNK、リン酸化 ERK を示す。

[0110] その結果、アンジオテンシンⅡの投与により、組織の構造学的異常に関連するタンパク質の発現量が有意に増加し、イソラムネチンの投与により上記発現量が有意に減少したことが明らかとなった。

[0111] この結果は、イソラムネチンの投与により、アンジオテンシンⅡの投与による構造学的異常を抑制し、構造的リモデリングを抑制できることを示す。

[0112] [実験例 10]

(血圧に及ぼす影響の検討)

実験例 1 における実験開始から 3 週間後に、Non-Invasive Blood Pressure System (Kent Scientific 社) を用いてマウスの尾の血圧を測定した。

[0113] その結果、コントロール群のマウスの尾の血圧は 150 mmHg 程度であった。また、アンジオテンシン II 投与群のマウスの尾の血圧は 200 mmHg 程度であった。一方、アンジオテンシン II 及びイソラムネチン投与群のマウスの尾の血圧は 180 mmHg 程度であった。

[0114] 以上の結果は、イソラムネチンの投与により、アンジオテンシン II の投与による血圧上昇が抑制されたことを示す。

[0115] [実験例 1 1]

(イソラムネチン誘導体の検討)

マウス心房筋由来細胞株である HL-1 細胞を用いた定量的 RT-PCR により、細胞・組織の炎症、線維化、肥大に関わる Tgf β 1 遺伝子、及び、線維化のマーカーである α 1 遺伝子の発現に、イソラムネチン誘導体の投与が与える影響を検討した。

[0116] まず、HL-1 細胞を 6 ウェルプレートに播種し、コントロール群（以下、「Cont 群」という場合がある。）、アンジオテンシン II 投与群（以下、「Ang II 群」という場合がある。）、アンジオテンシン II 及びイソラムネチン誘導体投与群（以下、「Ang II + ISO 誘導体群」という場合がある。）に分けた。

[0117] 続いて、細胞の播種から 23 時間後に、Ang II + ISO 誘導体群の培地にイソラムネチン誘導体（イソラムネチン、3-O-メチルケルセチン、タマリキセチン、ラムネチン、アザレアチン、各 10 μ M）をそれぞれ添加した。

[0118] 続いて、細胞の播種から 24 時間後に、Ang II 群及び Ang II + ISO 誘導体群の培地にアンジオテンシン II（1 μ M）を添加し、更に 24 時間培養した。

[0119] 続いて、各群の細胞を回収し、それぞれ、cDNAを抽出し、定量的RT-PCRを行った。定量的RT-PCRの内在性コントロールとして、18SリボソームRNAを使用した。

[0120] 図11(a)及び(b)は、定量的RT-PCRの結果を示すグラフである。図11(a)はTgfb1遺伝子の結果を示し、図11(b)はcol1a1遺伝子の結果を示す。図11(a)及び(b)中、「Cont」はコントロール群の結果であることを示し、「AngII」はアンジオテンシンIIを示し、「ISO」はイソラムネチンを示し、「O-Methy」は3-O-メチルケルセチンを示し、「Tama」はタマリキセチンを示し、「Rham」はラムネチンを示し、「Aza」はアザレアチンを示す。また、「*」はアンジオテンシンII投与群に対して $p < 0.05$ で有意差が存在することを示す。

[0121] その結果、Tgfb1遺伝子については、3-O-メチルケルセチン、タマリキセチン、アザレアチンで、イソラムネチンと同様の発現量の有意な減少が確認された。Col1a1遺伝子についても、イソラムネチンと同様の発現量の減少傾向が確認された。この結果は、イソラムネチン以外のO-メチル化ケルセチンも、イソラムネチンと同様に心房組織の構造的リモデリングの抑制機能を有することを示唆している。

[0122] [実験例12]

(HL-1細胞を用いた Ca^{2+} イメージング)

マウス心房筋由来細胞株であるHL-1細胞をglass bottom dishに播種した。続いて、HL-1細胞を、コントロール群（以下、「Cont群」という場合がある。）、アンジオテンシンII投与群（以下、「AngII群」という場合がある。）、アンジオテンシンII及びイソラムネチン投与群（以下、「AngII+ISO誘導体群」という場合がある。）に分けた。

[0123] 続いて、細胞の播種から24時間後に、AngII+ISO誘導体群の培地にイソラムネチン（ $10\mu M$ ）を添加した。また、細胞の播種から24時間

後に、A g l l 群及びA g l l + I S O 誘導体群の培地にアンジオテンシン I I (1 μ M) を添加し、更に1時間培養した。

[0124] 続いて、細胞内カルシウムイオン測定試薬であるF l u o 4 - A M を T y r o d e b u f f e r に溶解し、H L - 1 細胞に10分間負荷した。続いて、細胞を1.8 mM のC a ²⁺を含むT y r o d e b u f f e r で洗浄した。続いて、細胞を1.8 mM のC a ²⁺を含むT y r o d e b u f f e r 中に維持した状態で、共焦点C a ²⁺イメージングを行った。

[0125] C a ²⁺ラインスキャンイメージング (1.82 ms / l i n e) は、Z e i s s L S M 800 共焦点顕微鏡 (Z e i s s 社) を用いて、単一の細胞に焦点を当てて行った。

[0126] 図12は、C a ²⁺ラインスキャンイメージングを実施した際の各群の細胞の代表的な画像である。図12中、「C o n t」はコントロール群の結果であることを示し、「A g l l」はアンジオテンシン I I 投与群の結果であることを示し、「A g l l + I S O」はアンジオテンシン I I 及びイソラムネチン投与群の結果であることを示す。

[0127] その結果、アンジオテンシン I I 投与により不規則になった波形が、イソラムネチンの投与により規則的な波形に変化したことが明らかとなった。この結果は、イソラムネチンが、急性期の心房細動に対する治療効果を有することを示す。

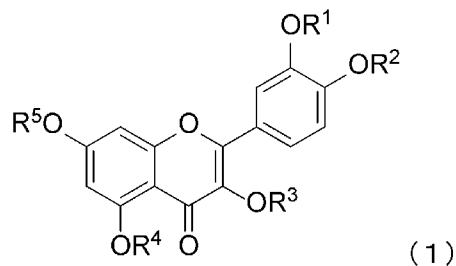
産業上の利用可能性

[0128] 本発明により、心房細動を予防、改善又は治療する技術を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（１）で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防又は治療剤。

[化1]

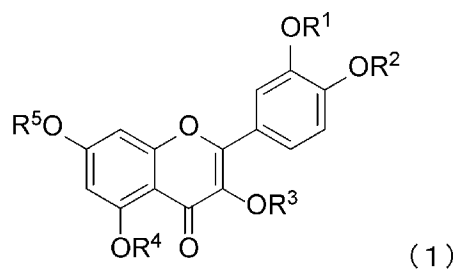


[式（１）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも１つはメチル基である。]

[請求項2] 請求項１に記載の予防又は治療剤と薬学的に許容される担体とを含有する、心房細動の予防又は治療用医薬組成物。

[請求項3] 下記式（１）で表される化合物を有効成分とする、心房細動の予防又は改善用食品組成物。

[化2]



[式（１）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも１つはメチル基である。]

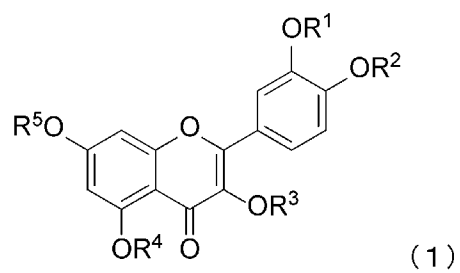
[請求項4] 機能性表示食品である、請求項３に記載の心房細動の予防又は改善用食品組成物。

[請求項5] 特定保健用食品である、請求項３に記載の心房細動の予防又は改善用食品組成物。

[請求項6] 対象に下記式（１）で表される化合物を摂取させる工程を含む、心

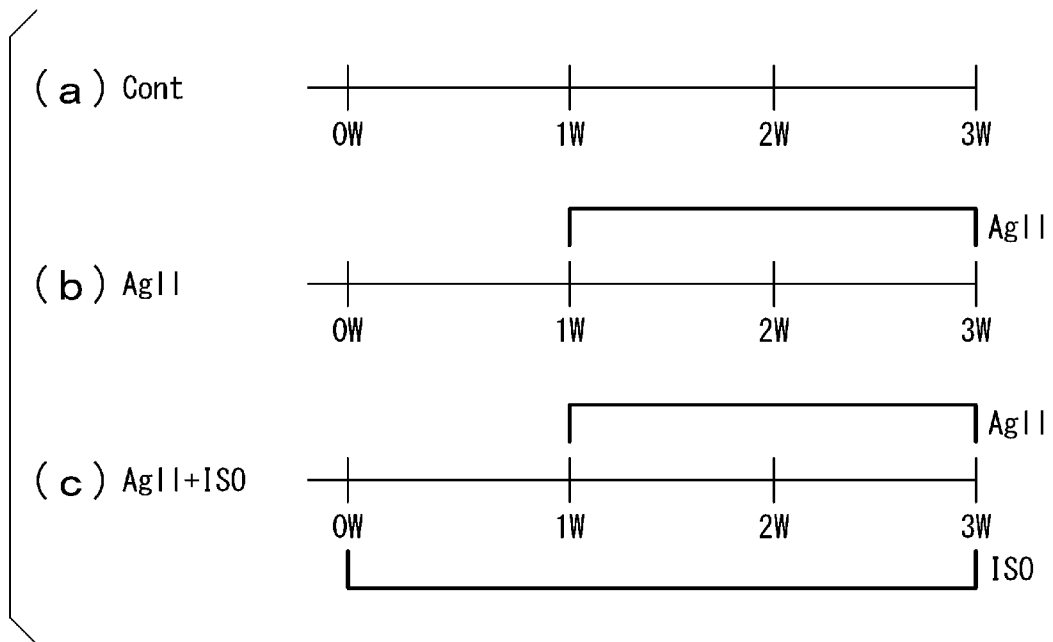
房細動の予防又は改善方法（ヒトに対する医療行為を除く。）。

[化3]

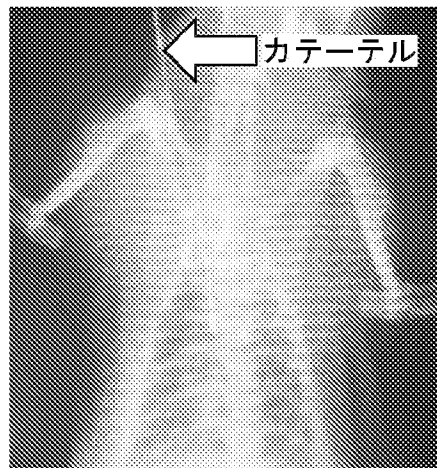


[式（１）中、 $R^1 \sim R^5$ は、それぞれ独立に水素原子又はメチル基を表し、 $R^1 \sim R^5$ のうち少なくとも１つはメチル基である。]

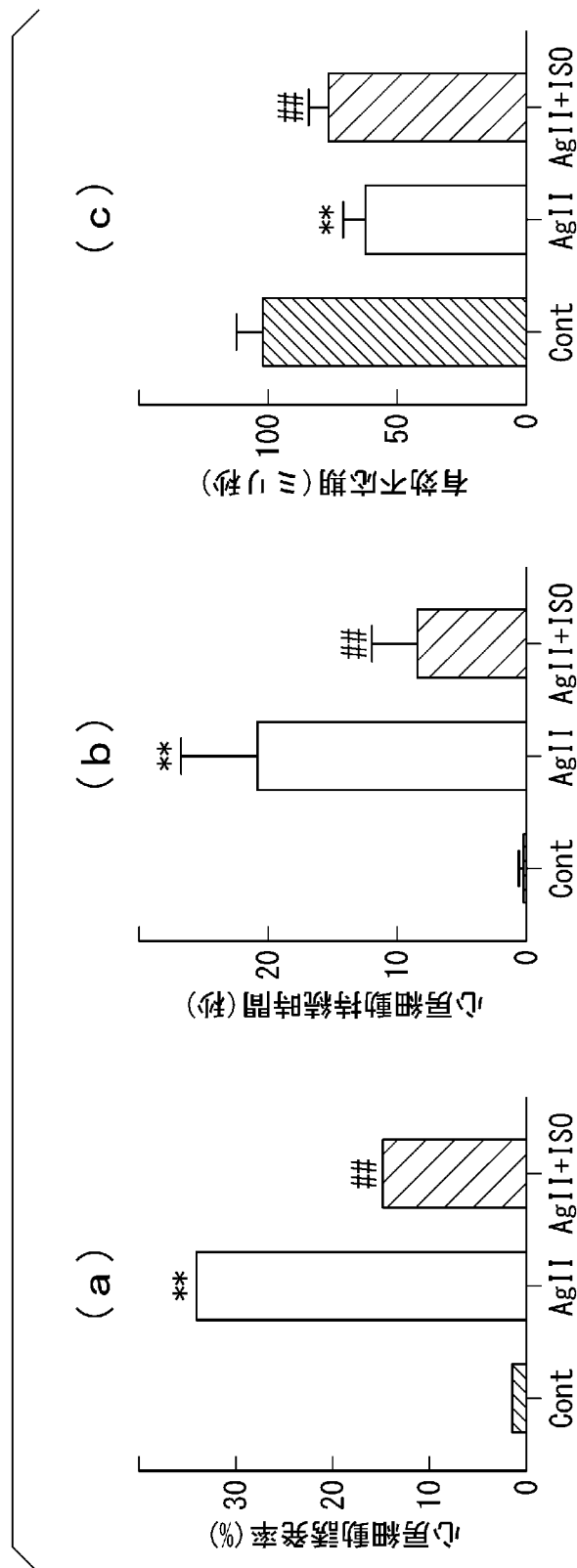
[図1]



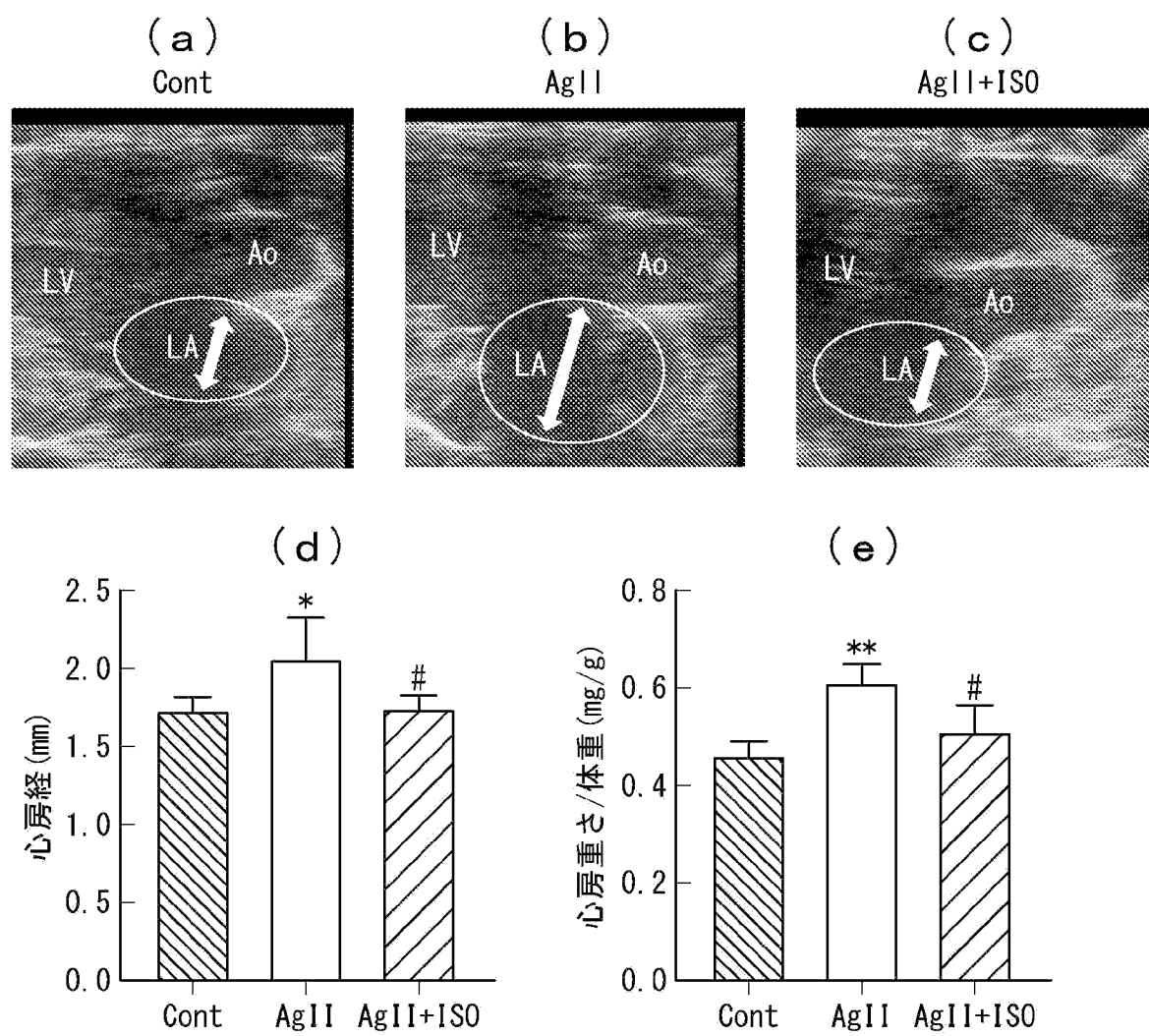
[図2]



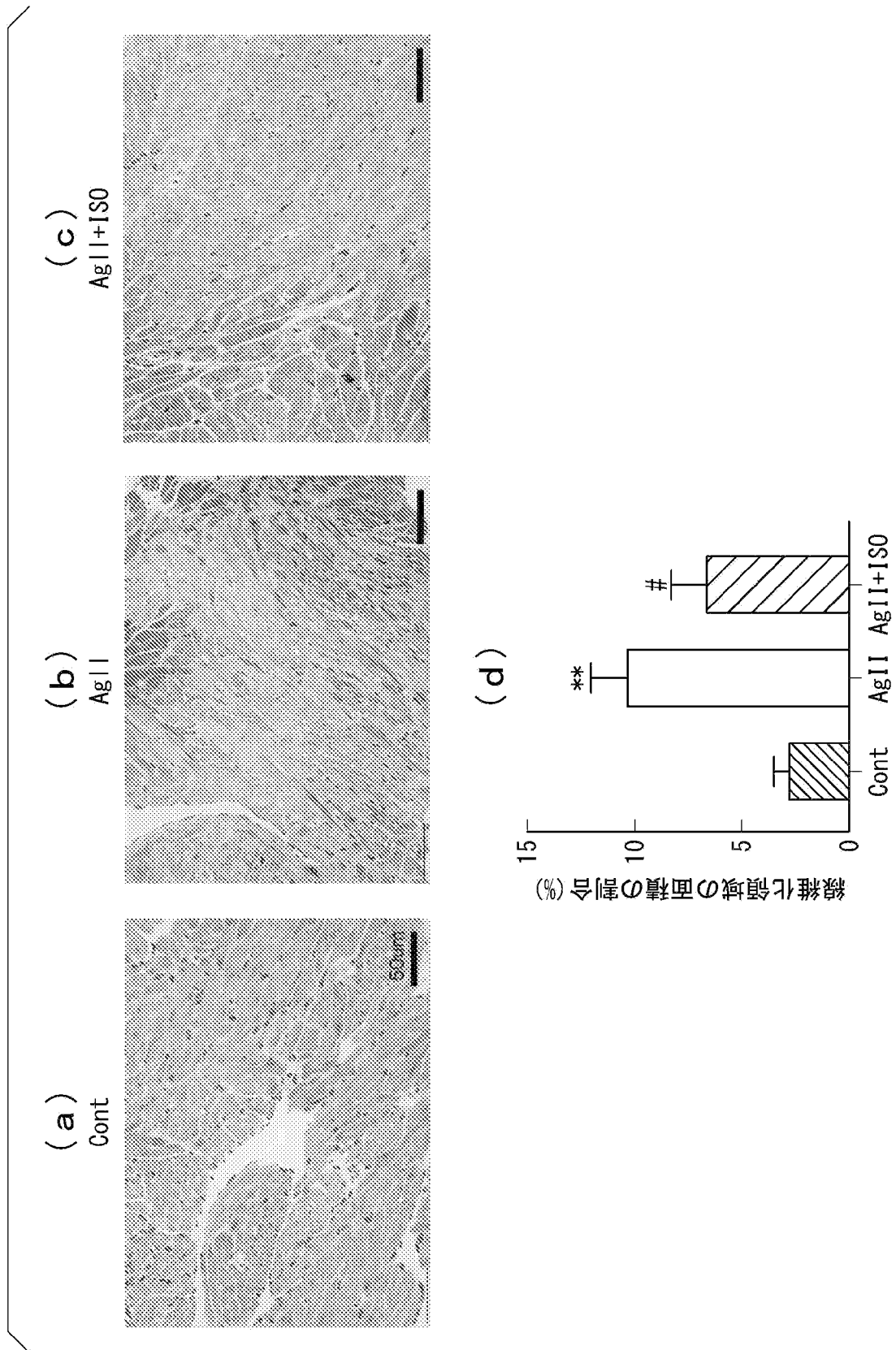
[図3]



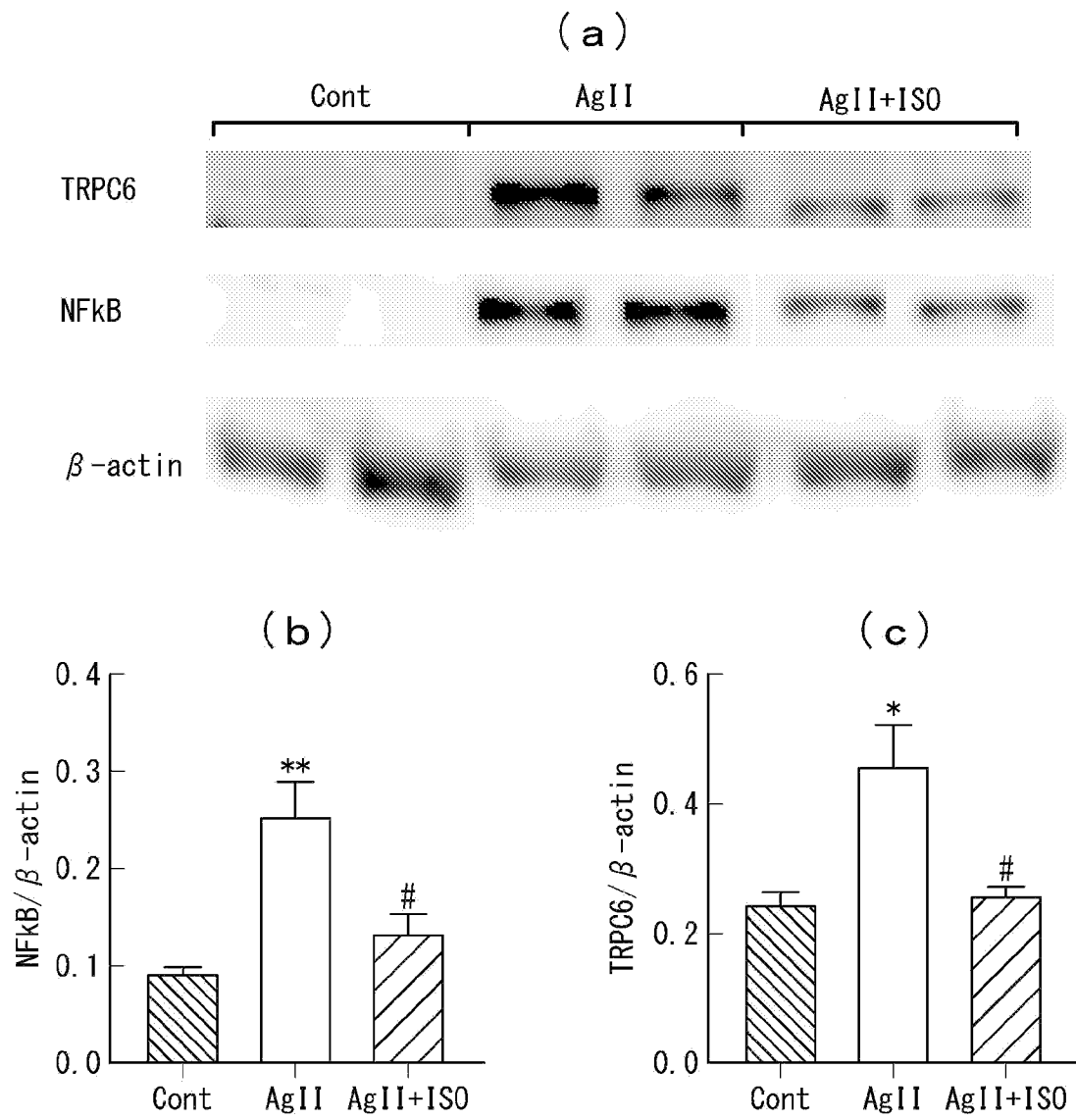
[図4]



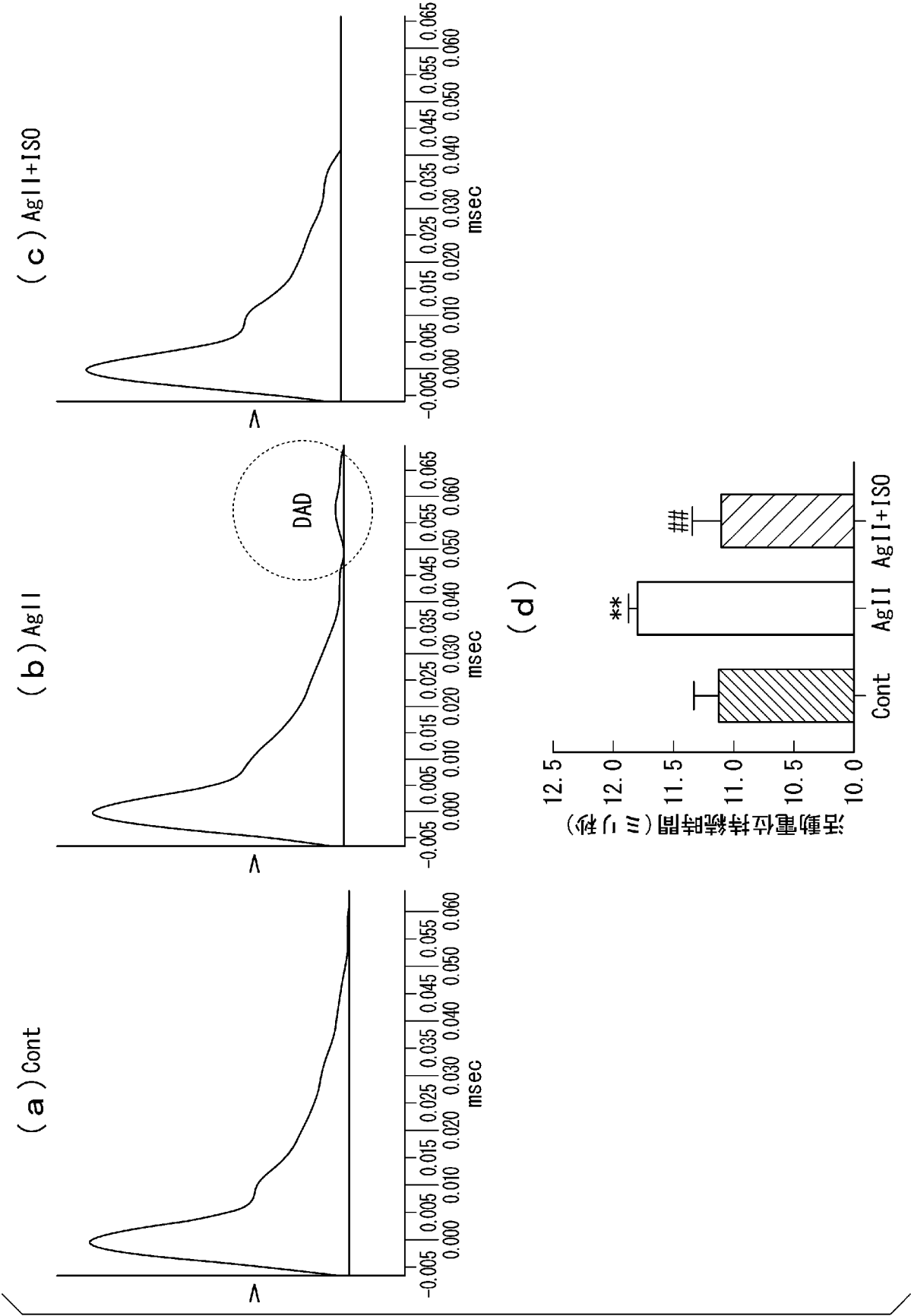
[図5]



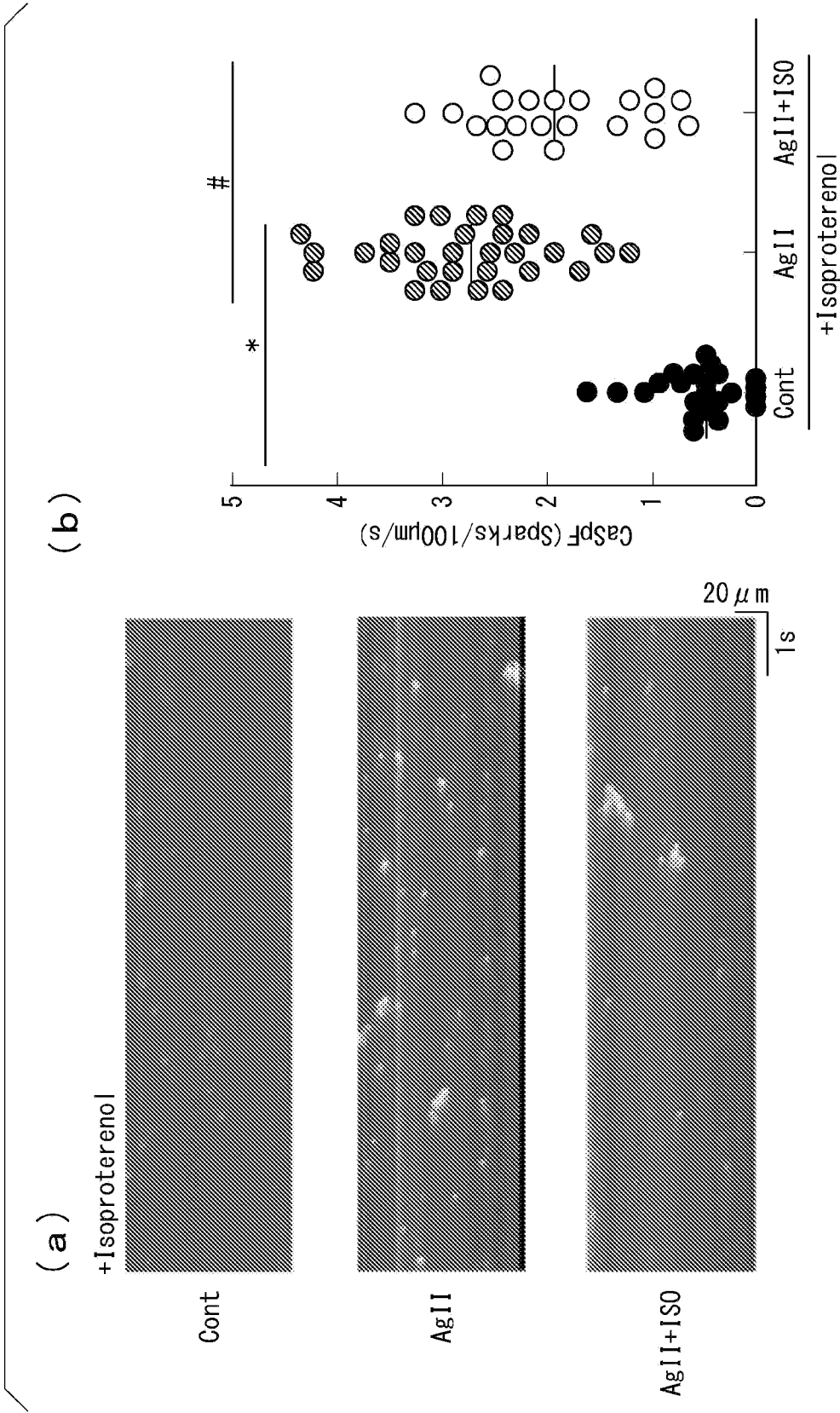
[図6]



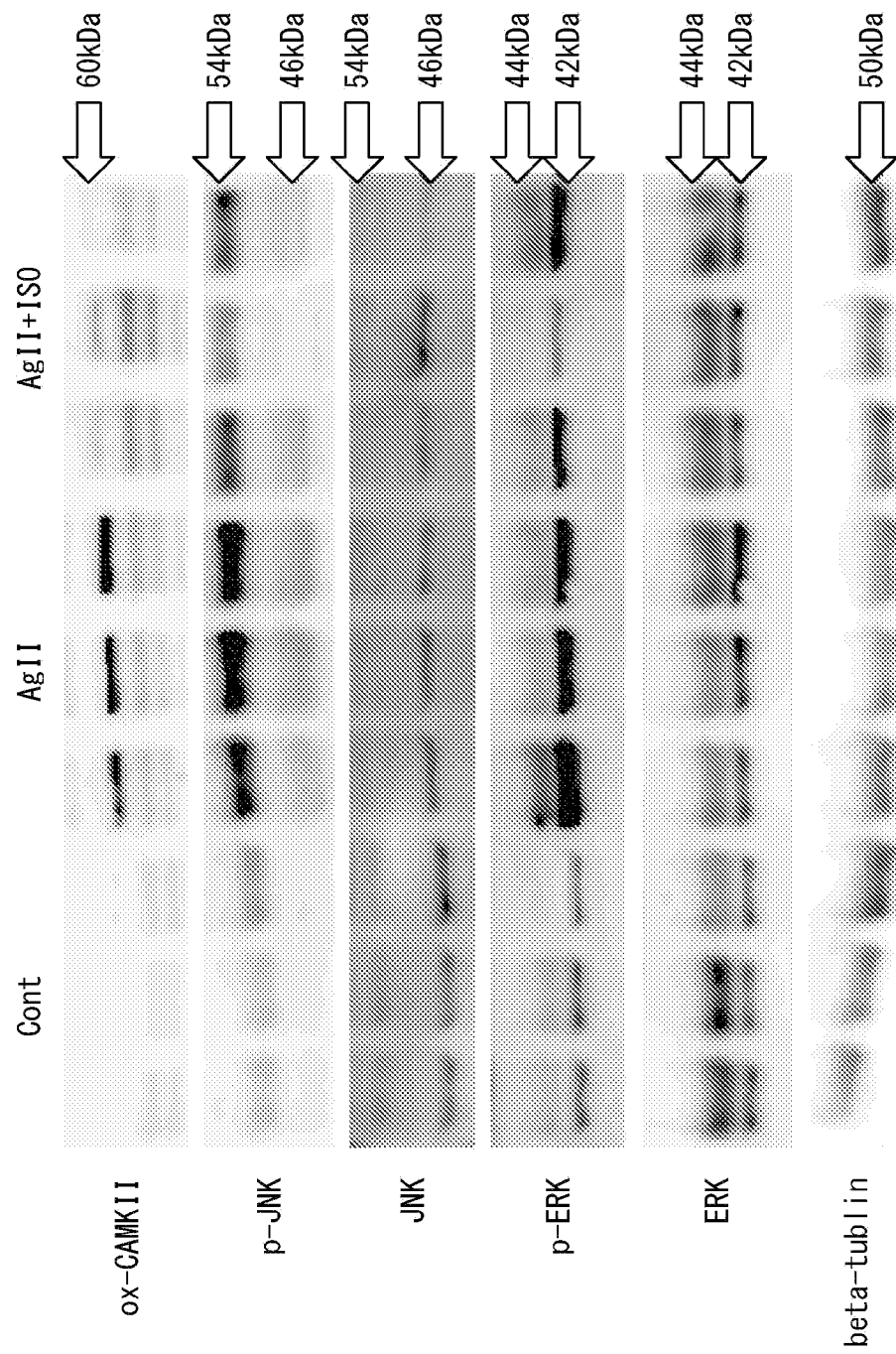
[図7]



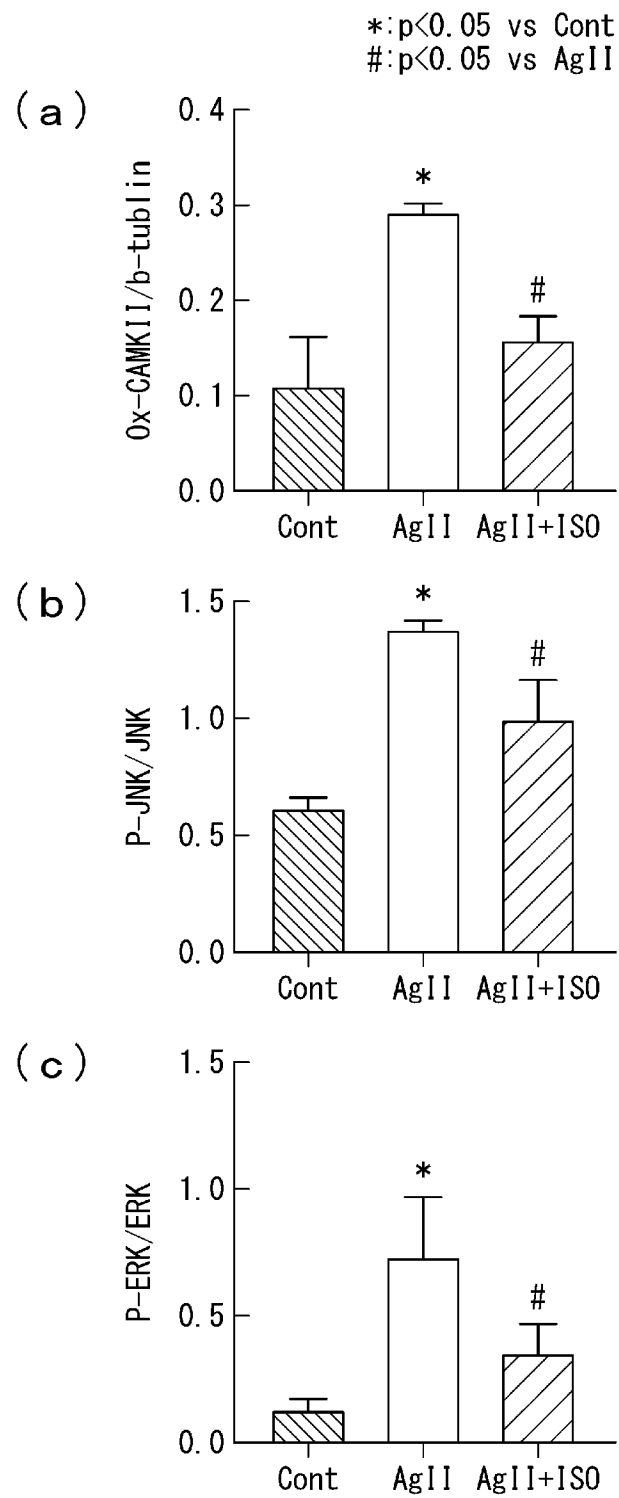
[図8]



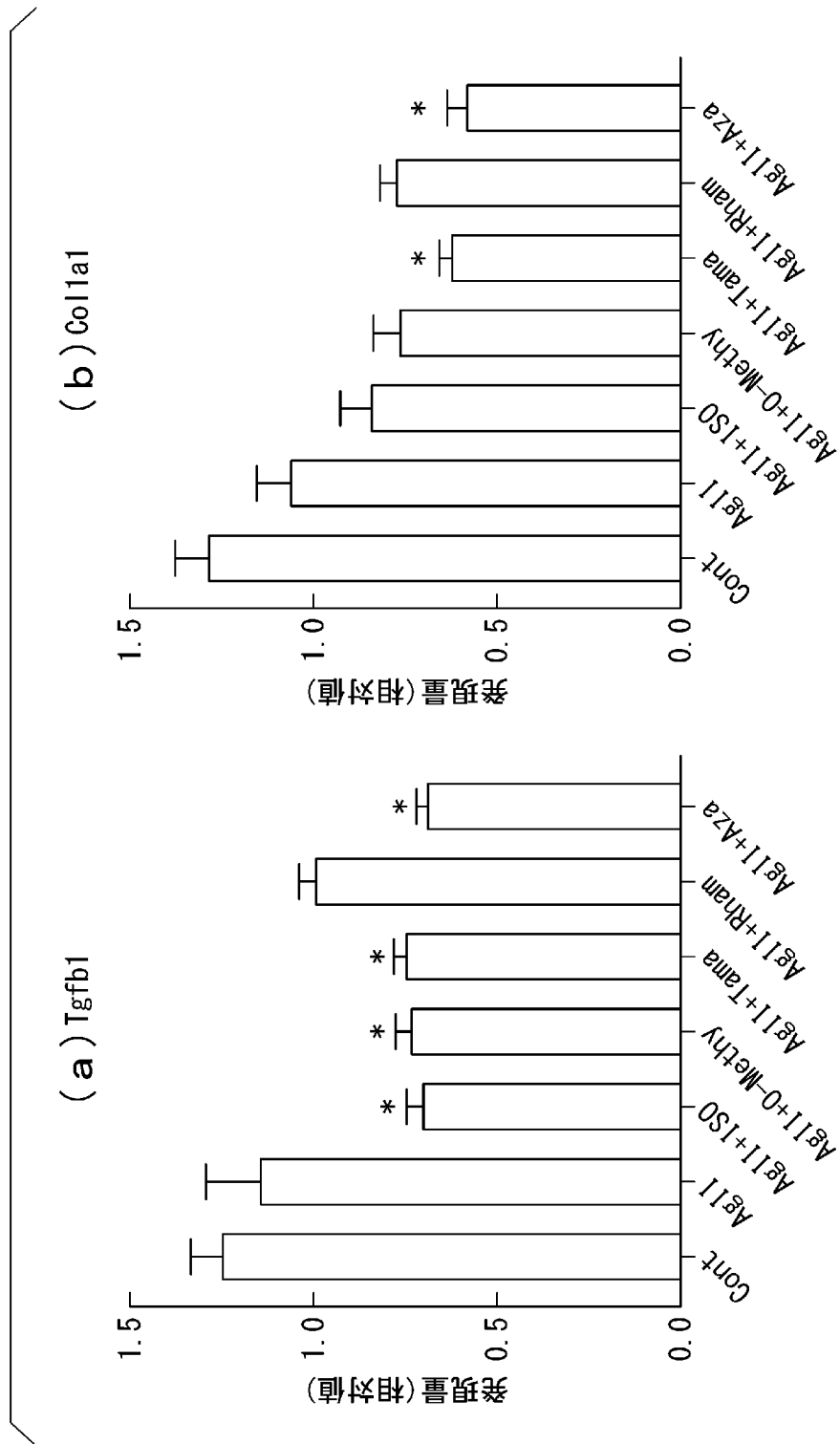
[図9]



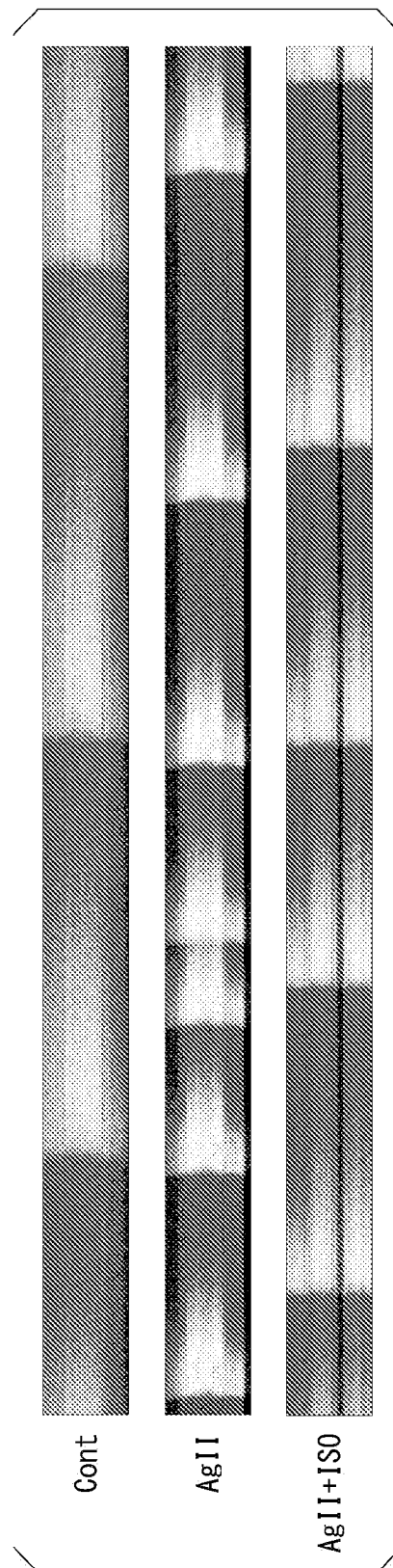
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/040480

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K 31/353**(2006.01)i; **A23L 33/10**(2016.01)i; **A23L 33/105**(2016.01)i; **A61P 9/06**(2006.01)i

FI: A61K31/353; A61P9/06; A23L33/10; A23L33/105

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; A23L33/10; A23L33/105; A61P9/06

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

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

Caplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AONUMA K. et al. Effects of Isorhamnetin in Human Amniotic Epithelial Stem Cells in vitro and Its Cardioprotective Effects in vivo. <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i> 8 (29 September 2020), Article 578197 abstract, results, discussion	1-6
Y	CUSPIDI C. et al. Angiotensin II receptor blockers and cardiovascular protection: Focus on left ventricular hypertrophy regression and atrial fibrillation prevention. <i>Vascular Health and Risk Management</i> 4(1) (2008), 67-73 abstract, introduction, conclusion	1-6
A	LIU Y. et al. Effects of the natural flavone trimethylapigenin on cardiac potassium currents. <i>Biochemical Pharmacology</i> 84 (2012), 498-506 abstract, results: 3.1, discussion	1-6
P, X	AONUMA K. et al. Isorhamnetin Reverses Angiotensin Ii-induced Atrial Fibrillation Vulnerability Through Electrophysiological and Structural Reverse Remodeling in Mice. <i>Circulation</i> 142(suppl_3) (12 November 2020), A15127 < https://doi.org/10.1161/circ.142.suppl_3.15127 > abstract	1-6

☐ 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

17 November 2021

Date of mailing of the international search report

30 November 2021

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
 Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 31/353(2006.01)i; A23L 33/10(2016.01)i; A23L 33/105(2016.01)i; A61P 9/06(2006.01)i FI: A61K31/353; A61P9/06; A23L33/10; A23L33/105										
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（IPC）） A61K31/353; A23L33/10; A23L33/105; A61P9/06 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 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） CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2021年									
日本国実用新案登録公報	1996-2021年									
日本国登録実用新案公報	1994-2021年									
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								
Y	AONUMA K. et al., "Effects of Isorhamnetin in Human Amniotic Epithelial Stem Cells in vitro and Its Cardioprotective Effects in vivo", Frontiers in Cell and Developmental Biology 8 (2020.09.29), Article 578197 Abstract, RESULTS, DISCUSSION	1-6								
Y	CUSPIDI C. et al., "Angiotensin II receptor blockers and cardiovascular protection: Focus on left ventricular hypertrophy regression and atrial fibrillation prevention", Vascular Health and Risk Management 4(1) (2008), 67-73 Abstract, Introduction, Conclusion	1-6								
A	LIU Y. et al., "Effects of the natural flavone trimethylapigenin on cardiac potassium currents", Biochemical Pharmacology 84 (2012), 498-506 ABSTRACT, Results:3.1, Discussion	1-6								
P, X	AONUMA K. et al., "Isorhamnetin Reverses Angiotensin II-induced Atrial Fibrillation Vulnerability Through Electrophysiological and Structural Reverse Remodeling in Mice", Circulation 142(suppl_3) (2020.11.12), A15127 < https://doi.org/10.1161/circ.142.suppl_3.15127 > Abstract	1-6								
☐ 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抵触するものではなく、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 17.11.2021		国際調査報告の発送日 30.11.2021								
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 小川 知宏 4C 3344 電話番号 03-3581-1101 内線 3439								