

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6869367号
(P6869367)

(45) 発行日 令和3年5月12日 (2021.5.12)

(24) 登録日 令和3年4月15日 (2021.4.15)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 35/616 (2015.01)

A 6 1 K 35/616

A 6 1 P 27/02 (2006.01)

A 6 1 P 27/02

A 6 1 K 31/7048 (2006.01)

A 6 1 K 31/7048

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 31/198 (2006.01)

A 6 1 K 31/198

請求項の数 30 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-554462 (P2019-554462)
 (86) (22) 出願日 平成29年12月18日 (2017.12.18)
 (65) 公表番号 特表2020-502277 (P2020-502277A)
 (43) 公表日 令和2年1月23日 (2020.1.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/014957
 (87) 国際公開番号 W02018/117572
 (87) 国際公開日 平成30年6月28日 (2018.6.28)
 審査請求日 令和1年6月17日 (2019.6.17)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0173715
 (32) 優先日 平成28年12月19日 (2016.12.19)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 10-2017-0174313
 (32) 優先日 平成29年12月18日 (2017.12.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

(73) 特許権者 519219690
 アルトレゲン カンパニー リミテッド
 大韓民国、16954、キョンギド、ヨン
 インシ、キフング、フンドク1ロ、13、
 (フンドク アイティー バレー、ヨンド
 クトン) #エー2112
 (74) 代理人 110001612
 きさらぎ国際特許業務法人
 (72) 発明者 リー、ユンヒ
 大韓民国、54909、チョラブクド、チ
 ヨンジュシ、トクチング、ウア3ギル、(
 ウアンドン3ガ) 38-11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ナマコ抽出物を有効成分とするブルッフ膜機能の低下関連病気の予防および治療用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ナマコ抽出物または分画物を有効成分として含むブルッフ膜 (Bruch's membrane) 機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物であって前記ブルッフ膜機能の低下関連疾患は、加齢黄斑変性 (AMD)、ソーズビー眼底ジストロフィー (Sorsby's fundus dystrophy)、ML (Malattia Levintanese)、スターガルト病 (Stargardt disease)、ベスト卵黄状黄斑ジストロフィー (Best's vitelliform retinal dystrophy) および DHRD (Doynes' honeycomb retinal dystrophy) よりなる群から選ばれるものである、ブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項2】

前記有効成分は、ブルッフ膜の輸送機能を改善させることを特徴とする請求項1に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項3】

前記ブルッフ膜の水理伝導率 (hydraulic conductivity) を改善させることによって、輸送機能を改善させることを特徴とする請求項2に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項4】

前記ブルッフ膜の物質拡散 (diffusion) 機能を改善させることによって、輸

送機能を改善させることを特徴とする請求項 2 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 5】

前記ブルッフ膜に結合されているか閉じ込められていたタンパク質または脂質を除去することによって、輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 2 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 6】

前記有効成分は、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 1 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

10

【請求項 7】

前記有効成分は、ブルッフ膜に結合されるか沈着された HMW1 (high molecular weight complexes 1)、HMW2 (high molecular weight complexes 2) または脂質成分を除去することによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 6 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 8】

前記有効成分は、ブルッフ膜のマトリックスから pro-MMP2 (pro-matrix metalloproteinases 2)、pro-MMP9 (pro-matrix metalloproteinases 9)、活性型 MMP2 (active matrix metalloproteinases 2) および活性型 MMP9 (active matrix metalloproteinases 9) を分泌させることによってブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 6 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

20

【請求項 9】

前記有効成分は、網膜上皮細胞 (RPE, retinal pigment epithelium) から活性型 MMP 分泌を活性化させることによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 6 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

30

【請求項 10】

前記有効成分は、フロンドシド A (Frondoside A) を含むことを特徴とする請求項 1 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 11】

前記組成物は、フロンドシド A をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 12】

前記組成物は、アミノ酸、抗酸化物質、ミネラル、金属物質、ルテイン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンよりなる群から選ばれる一つ以上の組成物をさらに含むことを特徴とする請求項 1 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

40

【請求項 13】

ナマコ抽出物または分画物を有効成分として含むブルッフ膜 (Bruch's membrane) 機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物であって前記ブルッフ膜機能の低下関連疾患は、加齢黄斑変性 (AMD)、ソーズビー眼底ジストロフィー (Sorsby's fundus dystrophy)、ML (Malattia Levintanese)、スターガルト病 (Stargardt disease)、ベスト卵黄状黄斑ジストロフィー (Best's vitelliform retinal dystrophy) および DHRD (Doyme's honeyco

50

mb retinal dystrophy)よりなる群から選ばれるものである、ブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 1 4】

前記有効成分は、ブルッフ膜の輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 1 3 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 1 5】

前記ブルッフ膜の水理伝導率 (hydraulic conductivity) を改善させることによって、輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 1 4 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 1 6】

前記ブルッフ膜の物質拡散 (diffusion) 機能を改善させることによって、輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 1 4 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 1 7】

前記ブルッフ膜に結合されているか閉じ込められていたタンパク質または脂質を除去することによって、輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 1 4 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 1 8】

前記有効成分は、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 1 3 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 1 9】

前記有効成分は、ブルッフ膜に結合されるか沈着された H M W 1、H M W 2 または脂質成分を除去することによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 1 8 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 2 0】

前記有効成分は、ブルッフ膜のマトリックスから p r o - M M P 2、p r o - M M P 9、活性型 M M P 2 および活性型 M M P 9 を分泌させることによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 1 8 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 2 1】

前記有効成分は、R P E から活性型 M M P 分泌を活性化させることによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることを特徴とする請求項 1 8 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 2 2】

前記有効成分は、フロンドシド A を含むことを特徴とする請求項 1 3 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 2 3】

前記組成物は、フロンドシド A をさらに含むことを特徴とする請求項 1 3 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 2 4】

前記組成物は、アミノ酸、抗酸化物質、ミネラル、金属物質、ルテイン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンよりなる群から選ばれる一つ以上の組成物をさらに含むことを特徴とする請求項 1 3 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 2 5】

フロンドシド A (F r o n d o s i d e A)、その異性体、その水和物 (h y d r a t e)、またはその塩を有効成分として含むブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物であって前記ブルッフ膜機能の低下関連疾患は、加齢黄斑変性

10

20

30

40

50

(AMD)、ソーズビー眼底ジストロフィー(Sorsby's fundus dystrophy)、ML(Malattia Levintanese)、スターガルト病(Stargardt disease)、ベスト卵黄状黄斑ジストロフィー(Best's vitelliform retinal dystrophy)およびDHRD(Doyne's honeycomb retinal dystrophy)よりなる群から選ばれるものである、予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 26】

前記有効成分は、ナマコに由来することを特徴とする請求項 25 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 27】

前記有効成分は、ブルッフ膜に結合されているか閉じ込められていたPro-MMP9またはホスファチジルコリンを除去することによって、ブルッフ膜の輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 25 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物。

【請求項 28】

フロンドシドA(Frondoside A)、その異性体、その水和物(hydrate)、またはその塩を有効成分として含むブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物であって前記ブルッフ膜機能の低下関連疾患は、加齢黄斑変性(AMD)、ソーズビー眼底ジストロフィー(Sorsby's fundus dystrophy)、ML(Malattia Levintanese)、スターガルト病(Stargardt disease)、ベスト卵黄状黄斑ジストロフィー(Best's vitelliform retinal dystrophy)およびDHRD(Doyne's honeycomb retinal dystrophy)よりなる群から選ばれるものである、ブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 29】

前記フロンドシドAは、ナマコに由来することを特徴とする請求項 28 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【請求項 30】

前記有効成分は、ブルッフ膜に結合されているか閉じ込められていたPro-MMP9またはホスファチジルコリンを除去することによって、ブルッフ膜の輸送機能を改善させることを特徴とする請求項 28 に記載のブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ナマコ抽出物を有効成分とするブルッフ膜機能の低下関連病気の予防および治療用組成物に関し、より具体的には、目のブルッフ膜を再生させ、輸送機能を改善させる効果を有するナマコ抽出物を含むブルッフ膜機能の低下と関連した病気の予防および治療用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ナマコは、棘皮動物ナマコ綱に属するナマコ類の総称であって、人參のようにサポニンなどの薬効成分が多量含有されているので、海の人參と呼ばれる最高の補陽食品である。ナマコは、中国をはじめとする東洋で古くから津液を補う薬であって、糖尿病、喘息などに卓越した効果を示し、夏に温度の上昇によって汗を多く流して気力喪失と虚脱状態に陥ったとき、気力を取り戻すことができる薬として知られている。また、ナマコは、身体の一部が切断されたとき、3ヶ月ぶりに切断部位が原状復帰され、内臓が除去されても、1ヶ月ぶりに新しい内臓が生じる驚くべき復元力があるので、漢方と民間療法では、ナマコが人体の単核細胞とマクロファージの貪食能力を高めて、免疫機能を旺盛にし、傷の治療に

10

20

30

40

50

効果があるものと知られている。

【0003】

ナマコは、子供の発育食品、老人の強壮食品、病後の回復食品、妊婦の貧血予防食品、排便促進食品などに活用されており、また、脂肪と糖分が少量含有されているので、ダイエット食品としても関心を集めているが、ナマコ抽出物の目機能改善に関する研究は、皆無であるのが現状である。

【0004】

視細胞は、網膜に存在する光を感知する細胞であって、視角過程で情報を脳に伝送して物体を認識できるようにする。視細胞は、身体で最も新陳代謝が活発な部分であって、効果的な栄養素の伝達と老廃物の除去が必須である。必須脂肪酸と光、高濃度の酸素が豊富に存在する環境の特性上、相当部分遊離基 (free radical) による損傷を受ける。このような場合、網膜上皮細胞 (RPE, retinal pigment epithelium) を利用して損傷した視細胞の外節 (outer segments) を持続的に再生することができるようにする。

10

【0005】

視細胞とRPEは、脈絡膜 (choroid) の血液循環を通じて栄養素を供給される。血液から供給された栄養素が脈絡膜の毛細血管から分泌されると、RPEと視細胞に到達する前に、先に細胞外基質であるブルッフ膜 (Bruch's membrane) を必ず通過しなければならない。サイズが小さいブドウ糖、酸素、アミノ酸などのような栄養素は、単純受動拡散によりブルッフ膜を通過し、ビタミン、微量元素 (trace metal)、脂質は、運搬タンパク質 (carrier protein) に結合した後、ブルッフ膜を通過してRPEで分離される。反対に、視細胞とRPEで生成された老廃物は、ブルッフ膜を通過して脈絡膜で除去される。老廃物は、大概毒性があるので、ブルッフ膜を損傷させる可能性があり、また、炎症反応を開始させることがある。したがって、ブルッフ膜の効率的な物質輸送能力は、正常な視力維持と視細胞の生存に必須条件であると見ることができる (図1)。

20

【0006】

老化によってブルッフ膜の厚さが2~3倍増加し、これによって、栄養素と老廃物が交換される拡散傾き (diffusion gradients) を減少させて、ブルッフ膜で物質の拡散が難しくなる。これに伴い、脂質と蛋白脂質複合体 (proteo-lipid complexes) とRPEで捨てられた老廃物が膜に沈着され、コラーゲンの交差結合 (cross-linking) が増加し、変性コラーゲンの量が増加する。それだけでなく、ブドウ糖化 (glycosylation) により生じるタンパク質と脂質の糖化物質 (AGE; advanced protein glycation end-products, ALE; advanced lipid glycation end-products) が多くなり (Handa et al. 1999)、損傷したり重合された蛋白複合物の沈着も増加して、結局のところ、膜の輸送能力に妨害を与えるようになり (Holz et al. 1994)、栄養素の伝達と老廃物の除去機能に悪影響を及ぼす (図2)。

30

【0007】

上記のような老化による変化は、老化が主な発病原因である加齢黄斑変性 (AMD, age-related macular degeneration) の場合には、その程度が格別に深刻な状態で現れるようになり、ブルッフ膜の輸送能力の低下は、結果的にRPEと視細胞を死に追い込むようにして失明するようになる (図3)。

40

【0008】

臨床的に老人人口のブルッフ膜の老化は、ビタミンAの再生が十分に行われないので、暗所閾値 (scotopic thresholds) が低下すると報告されたことがあり (Steinmetz et al. 1993; Owsley et al. 2001)、現在、一部の国家では、ビタミンAに金属 (metal) と抗酸化物質を添加して処方されているが、この方法には、二つの問題点がある。第一に、特定の栄養素だけが添加さ

50

れるので、その他の必須栄養素は、依然として不足した状態で存在するという問題であり、第二に、輸送機能が低下したブルッフ膜内に金属を添加するようになると、ブルッフ膜内に金属の濃度が高くなり、継続して膜に沈着され、これによる損傷は、さらに大きくなるしかないということである。また、10年以上進行されている米国の黄斑変性臨床試験であるAREDS (age-related eye disease study) によれば、まだビタミンとミネラル添加物から構成された組成物の効果が立証されていない (Kassof et al. 2001)。

【0009】

理想的な解決策は、ブルッフ膜の輸送能力を円滑にして、血しょうに存在するすべての必要な栄養分を供給され得るようにすることである。

10

【0010】

本出願の発明者らは、加齢黄斑変性を含んで老化による目機能低下の根本原因を解決できる治療方法を開発するために鋭意努力した結果、ナマコ抽出物のブルッフ膜輸送能力の改善およびブルッフ膜の再生効果を発掘し、これを利用してブルッフ膜機能の低下による病気の予防および治療用組成物として使用することができることを確認することによって、本発明を完成した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

参考先行文献

20

【非特許文献1】[1] Birkedal-Hansen H, Moore WG, Boddan MK, Windsor LJ, Birkendal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. (1993) Matrix metalloproteinases: a review. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4:197-250.

【非特許文献2】[2] Handa JT, Verzijl N, Matsunaga H, Aotaki-Keen A, Luttj G, te Koppelle JM, Miyata T and Hjelmeland LM. Increase in the advanced glycation end-product pentosidine in Bruch's membrane with age. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999; 40:775-779.

30

【非特許文献3】[3] Holz FG, Sherai DA, Pauleikhoff D and Bird AC. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. Arch. Ophthalmol. 1994; 112:402-406.

【非特許文献4】[4] Hussain AA, Lee Y, Zhang JJ, Marshall J. (2011) Disturbed matrix metalloproteinase activity of Bruch's membrane in age-related macular degeneration (AMD). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 52:4459-66.

40

【非特許文献5】[5] Hussain AA, Starita C, Hodgetts A, Marshall J. (2010) Macromolecular characteristics of ageing human Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration (AMD). Exp. Eye Res. 90:703-710.

【非特許文献6】[6] Hussain AA, Lee Y, Marshall J. (2010) High molecular weight gelatinase species of human Bruch's membrane: composition

50

ional analyses and age-related changes. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51:2363-71.

【非特許文献7】[7] Hussain AA, Starita C, and Marshall J. (2004) Chapter IV. Transport characteristics of ageing human Bruch's membrane: Implications for AMD. In: Focus on Macular Degeneration Research, (Editor O.R. Ioseliani). Pages 59-113. Nova Science Publishers, Inc. New York.

【非特許文献8】[8] Hussain AA, Rowe L, Marshall J. (2002) Age-related alterations in the diffusional transport of amino acids across the human Bruch's-choroid complex. Journal of the Optical Society of America, A, Optics, Image Science, & Vision. 19(1):166-72.

【非特許文献9】[9] Karwatowski WSS, Jefferies TE, Duance VC, Albon J, Bailey AJ & Easty DL. Preparation of Bruch's membrane and analysis of the age related changes in the structural collagens. (1995) Brit. J. Ophthalmol. 79:944-952.

【非特許文献10】[10] Kassof A, Kassoff J, Buehler J, et al., A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report No. 8. Arch Ophthalmol. 2001;119:1417-36.

【非特許文献11】[11] Kumar A, El-Osta A, Hussain AA, Marshall J. (2010) Increased sequestration of matrix metalloproteinases in ageing human Bruch's membrane: implications for ECM turnover. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 51:2664-70.

【非特許文献12】[12] Moore DJ and Clover GM. The effect of age on the macromolecular permeability of human Bruch's membrane. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001;42:2970-2975.

【非特許文献13】[13] Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. (1995). Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruch's membrane. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36(7):1290-7.

【非特許文献14】[14] Owsley C, Jackson GR, White M, Feist R and Edwards D. Delays in rod mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. Ophthalmol. 2001;108:1196-1202.

【非特許文献15】[15] Owsley C, McGwin G, Jackson G

10

20

30

40

50

R, Heinburger DC, Piyathilake CJ, Klein R, White MF, Kallies K. Effect of short term, high-dose retinol on dark adaptation in a ge and age-related maculopathy. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006; 47(4): 1310-8.

【非特許文献16】[16] Ramratten RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PGH and de Jong PTVM. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris and the choroid in ageing. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1994; 35: 2857-2864.

10

【非特許文献17】[17] Starita C, Hussain AA, Pagliarini S, Marshall J. (1996) Hydrodynamics of ageing Bruch's membrane: implications for macular disease. Exp. Eye Res. 62(5): 565-72.

【非特許文献18】[18] Steinmetz RL, Haimovici R, Jubb C, Fitzke FW, Bird A. Symptomatic abnormalities of dark adaptation in patients with age-related Bruch's membrane change. Br. J. Ophthalmol. 1993; 77: 549-554.

20

【非特許文献19】[19] Hussain AA, Lee Y (2016) unpublished data

【非特許文献20】[20] Lee Y, Hussain AA, Seok J, Kim S, Marshall J. (2015). Modulating the Transport Characteristics of Bruch's Membrane With Steroidal Glycosides and its Relevance to Age-Related Macular Degeneration (AMD). Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 56(13): 8403-18.

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明の目的は、ナマコ抽出物または分画物を有効成分として含むブルッフ膜 (Bruch's membrane) 機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学組成物を提供することにある。

【0013】

本発明の他の目的は、ナマコ抽出物または分画物を有効成分として含むブルッフ膜 (Bruch's membrane) 機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用健康機能食品組成物を提供することにある。

40

【0014】

本発明のさらに他の目的は、フロンドシドA (Frondoside A)、その異性体、その水和物 (hydrate)、またはその塩を有効成分として含むブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学的組成物を提供することにある。

【0015】

本発明のさらに他の目的は、フロンドシドA (Frondoside A)、その異性体、その水和物 (hydrate)、またはその塩を有効成分として含むブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0016】

50

本発明は、上述した問題点を解決するためのものであって、ナマコ抽出物または分画物を有効成分として含むブルッフ膜 (Bruch's membrane) 機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用薬学組成物を提供する。

【0017】

本発明で使用される用語「ナマコ」は、棘皮動物門 (Phylum Echinodermata) ナマコ綱 (Class Holothuroidea) に属する海洋無脊椎動物を意味し、樹手目 (Order Dendrochirotea) に属するジイガセキンコ、リボトラペザ、Sclerodactyla multipes、キンコ、イシワタナマコなど、楯手目 (Order Aspidochirotida) に属するアカナマコ、フジナマコ、ジャノメナマコ、リュウキュウフジナマコなど、無足目 (Order Apodida) に属するイカリナマコ、ムラサキクルマナマコなど、隠足目 (Order Molpadida) に属するシロナマコ、イモナマコなどを含むことができるが、これらに限定されない。前記ナマコは、健康増進と強壮剤、妊娠中の女性と身体が虚弱な女性のための用途、高血圧、動脈硬化、糖尿患者と肥満患者の健康食品として推奨されているが、目の老化と関連した病気に対する効果は、知られていない。

【0018】

本発明で使用される用語「抽出物」は、ナマコの抽出処理により得られる抽出液、ナマコを乾燥して得られる乾燥物、前記抽出液の希釈液や濃縮液、前記抽出液を乾燥して得られる乾燥物、前記抽出液の粗精製物や精製物、またはこれらの混合物など、抽出液自体および抽出液を利用して形成可能なすべての剤形の抽出物を含む。本発明の前記抽出物または分画物は、好ましくは、抽出後に液体形態で 사용할ことができる。

【0019】

本発明の前記ナマコ抽出物において、前記ナマコを抽出する方法は、特に制限されず、当該技術分野における通常的に使用する方法により抽出することができる。前記抽出方法の非制限的な例としては、熱水抽出法、超音波抽出法、濾過法、還流抽出法などが挙げられ、これらは、単独で行われたり、2種以上の方法を併用して行われ得る。

【0020】

本発明で前記ナマコを抽出するのに使用される抽出溶媒の種類は、特に制限されず、当該技術分野において公知となった任意の溶媒を使用することができる。前記抽出溶媒の非制限的な例としては、水、アルコールまたはこれらの混合溶媒などが挙げられ、アルコールを溶媒として使用する場合には、好ましくはC1～C4のアルコール、より好ましくはC1～C2の低級アルコール、さらに好ましくは80%エタノール水溶液を使用することができるが、これらに限定されない。本発明のナマコ抽出物は、好ましくは水またはエタノール抽出物であってもよい。

【0021】

本発明で前記ナマコを熱水抽出方法で抽出する場合には、1回～5回反復抽出することが好ましく、3回反復抽出することがより好ましいが、これに限定しない。前記抽出溶媒は、乾燥したナマコの重量対比0.1倍～100倍添加することができ、0.3倍～5倍添加することが好ましい。抽出温度は、20～130であることが好ましいが、これに限定しない。また、抽出時間は、30分～48時間であることが好ましいが、これに限定しない。

【0022】

本発明の前記ナマコ抽出物を製造する方法において、前記減圧濃縮は、真空減圧濃縮機または真空回転蒸発機を利用することが好ましいが、これに限定しない。また、乾燥は、減圧乾燥、真空乾燥、沸騰乾燥、噴霧乾燥または凍結乾燥することが好ましいが、これらに限定しない。

【0023】

本発明の前記ナマコ乾燥物を製造する方法は、自然乾燥、熱風乾燥、凍結乾燥方法などを使用することができるが、ナマコの水分を除去するために、当該技術分野において公知となった任意の方法であれば、これらに限定されない。

【 0 0 2 4 】

本発明の前記ナマコ抽出または乾燥方法において、ナマコの外皮と内臓をまるごと抽出または乾燥させることができ、ナマコの外皮と内臓を分離してそれぞれ抽出または乾燥させることができ、外皮と内臓抽出物または乾燥物をそれぞれ使用することもでき、混合して使用することもできる。

【 0 0 2 5 】

本発明の具体的な一実施例によれば、乾燥したナマコを粉碎してナマコ粉末を製造し、これに抽出溶媒として70%エタノールを添加した後、約3～6時間の間抽出し、真空状態でエタノールを除去して、抽出物を収得した。

【 0 0 2 6 】

本発明で使用される用語「分画物」とは、多様な構成成分を含む混合物から特定の成分または特定の成分グループを分離するために分画を行って得られた結果物を意味する。

【 0 0 2 7 】

本発明で前記分画物を得る分画方法は、特に限定されず、当該技術分野において通常的に使用する方法により行われ得る。前記分画方法の非限定的な例としては、ナマコを抽出して得られた抽出物に所定の溶媒を処理して前記抽出物から分画物を得る方法が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

本発明で前記分画物を得るのに使用される分画溶媒の種類は、特に限定されず、当該技術分野において公知となった任意の溶媒を使用することができる。前記分画溶媒の非限定的な例としては、水、アルコールなどの極性溶媒；ヘキサン、エチルアセテート、クロロホルム、ジクロロメタンなどの非極性溶媒などが挙げられる。これらは、単独で使用されたり、2種以上混合して使用することができる。前記分画溶媒のうちアルコールを使用する場合には、好ましくはC1～C4のアルコールを使用することができる。

【 0 0 2 9 】

本発明の有効成分は、ブルッフ膜の輸送機能を改善させることによって、ブルッフ膜機能の低下と関連した病気の発病を予防したり、病気の進行を遅延させたり、治療する効果がある。

【 0 0 3 0 】

本発明の有効成分は、ブルッフ膜の水理伝導率(hydraulic conductivity)を改善させたり、ブルッフ膜の物質拡散(diffusion)機能を改善させたり、前記ブルッフ膜に結合されているか閉じ込められていたタンパク質または脂質を除去することによって、輸送機能を改善させることができる。

【 0 0 3 1 】

本発明の有効成分は、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることによって、ブルッフ膜機能の低下と関連した病気の発病を予防したり、病気の進行を遅延させたり、治療することができる。

【 0 0 3 2 】

本発明の有効成分は、ブルッフ膜に結合されるか沈着されたHMW(high molecular weight complex)または脂質成分を除去することによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることができる。

【 0 0 3 3 】

また、本発明の有効成分は、ブルッフ膜のマトリックスからpro-MMP2、pro-MMP9、活性型MMP2および活性型MMP9を分泌させることによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることができる。

【 0 0 3 4 】

また、本発明の有効成分は、網膜上皮細胞(RPE)から活性型MMP分泌を活性化させることによって、ブルッフ膜を再生させ、ブルッフ膜の機能を向上させることができる。

【 0 0 3 5 】

このように本発明のナマコ抽出物組成物は、ブルッフ膜に重合されてブルッフ膜を老化さ

10

20

30

40

50

せ、その機能を喪失させる物質を分解し、ブルッフ膜のマトリックスに閉じ込められているか結合されたタンパク質や脂質のような栄養物質と老廃物を分泌して、目に栄養を供給し、老廃物を排出するのに助けになる。また、ブルッフ膜のMMPを分泌して酵素の機能を回復することができるようにすることによって、ブルッフ膜の機能を再生させるのに関与し、目の水理伝導率と物質の拡散度を増加させることによって、結局のところ、網膜の老化を予防すると共に、網膜の機能を再生させて、老化による網膜機能の喪失を予防、遅延および治療する効果があるものである。

【0036】

本発明で使用される用語「予防」または「遅延」とは、本発明の前記組成物を個体に投与してブルッフ膜の機能低下によって発生する病気の発病を抑制させたり遅延させるすべての行為を意味する。

10

【0037】

本発明で使用される用語「治療」とは、本発明の前記組成物を個体に投与してブルッフ膜の機能低下によって発生する病気の症状を好転させたり有利にするすべての行為を意味する。

【0038】

本発明で使用される用語「改善」は、治療される状態に関連したパラメーター、例えば症状の程度を少なくとも減少させるすべての行為を意味する。

【0039】

本発明の前記薬学的組成物において、前記ナマコ抽出物またはその分画物は、前記薬学的組成物の全体重量を基準として好ましくは0.1重量%~99.99重量%で含有され得、より好ましくは10重量%~99.99重量%で含有され得、さらに好ましくは50重量%~99.99重量%で含有され得る。前記範囲内で、前記ナマコ抽出物またはその分画物によるブルッフ膜の輸送機能の改善、ブルッフ膜の再生およびブルッフ膜機能の改善効果が十分に発揮されて、本発明の目的を達成するのにさらに適合となる利点がある。

20

【0040】

本発明の前記薬学的組成物は、前記ナマコ抽出物またはその分画物を有効成分として含有することに加えて、薬学的に許容可能な担体をさらに含むことができる。

【0041】

本発明で、前記「薬学的に許容可能」であるというのは、これを投与時に生物体を刺激することなく、投与される化合物の生物学的活性および特性を阻害しない、薬学分野において通常的に使用されることを意味する。

30

【0042】

本発明の前記薬学的組成物は、前記担体と共に製剤化されて、食品、医薬品、飼料添加剤、飲用水添加剤などに活用され得る。本発明で、前記担体の種類は、特に限定されず、当該技術分野において通常的に使用される担体であれば、いずれのものでも使用することができる。前記担体の非限定的な例としては、食塩水、滅菌水、リンガー液、緩衝食塩水、アルブミン注射溶液、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、マルトデキストリン、グリセロール、エタノールなどが挙げられる。これらは、単独で使用したり、2種以上を混合して使用することができる。

40

【0043】

また、本発明の前記薬学的組成物は、必要な場合、賦形剤、希釈剤、抗酸化剤、緩衝液または静菌剤などその他薬学的に許容可能な添加剤を添加して使用することができ、充填剤、増量剤、湿潤剤、崩解剤、分散剤、界面活性剤、結合剤または潤滑剤などを付加的に添加して使用することができる。

【0044】

本発明の前記薬学的組成物は、経口投与または非経口投与のための適合した多様な剤形で製剤化されて使用することができる。前記経口投与用製剤の非制限的な例としては、トローチ剤(troches)、ロゼンジ(lozenge)、錠剤、水溶性懸濁液、油性

50

懸濁液、調製粉末、顆粒、エマルジョン、ハードカプセル、ソフトカプセル、シロップまたはエリキシル剤などが挙げられる。

【0045】

本発明の前記薬学的組成物を経口投与用に製剤化するために、ラクトース、サッカロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アミロペクチン (Amylopectin)、セルロース (Cellulose) またはゼラチン (Gelatin) 等のような結合剤；リン酸二カルシウム (Dicalcium phosphate) 等のような賦形剤；とうもろこしデンプンまたはさつまいもデンプン等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウム (Magnesium stearate)、スステアリン酸カルシウム (Calcium stearate)、ステアリルフマル酸ナトリウム (Sodium stearyl fumarate) またはポリエチレングリコールワックス (Polyethylene glycol wax) 等のような潤滑油などを使用することができ、甘味剤、芳香剤、シロップ剤等も使用することができる。

10

【0046】

ひいては、カプセル剤の場合には、前記言及した物質の他にも脂肪油のような液体担体などをさらに使用することができる。

【0047】

前記非経口用製剤の非制限的な例としては、注射液、坐剤、呼吸器吸入用粉末、スプレー用エアロゾル剤、軟膏、塗布用パウダー、オイル、クリームなどが挙げられる。

【0048】

本発明の前記薬学的組成物を非経口投与用に製剤化するために、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳剤、凍結乾燥製剤、外用剤などを使用することができ、前記非水性溶剤、懸濁剤としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブオイルのような植物性油、エチルオレートのような注射可能なエステルなどを使用することができる。

20

【0049】

また、より具体的に本発明の前記薬学的組成物を注射液で製剤化する場合、本発明の前記組成物を安定剤または緩衝剤と共に水で混合して溶液または懸濁液で製造し、これをアンプル (ampoule) またはバイアル (vial) の単位投与用で製剤化することができる。また、本発明の前記薬学的組成物をエアロゾル剤で製剤化する場合、水分散された濃縮物または湿潤粉末が分散されるように推進剤などが添加剤と共に配合することができる。

30

【0050】

また、本発明の前記薬学的組成物を軟膏、クリームなどで製剤化する場合には、動物性油、植物性油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、シリカ、タルク、酸化亜鉛などを担体として使用して製剤化することができる。

【0051】

本発明の前記薬学的組成物の薬学的有効量、有効投与量は、前記薬学的組成物の製剤化方法、投与方式、投与時間および／または投与経路などによって多様になり得、前記薬学的組成物の投与により達成しようとする反応の種類と程度、投与対象となる個体の種類、年齢、体重、一般的な健康状態、病気の症状や程度、性別、食事、排泄、該当個体に同時または異時に共に使用される薬物やその他組成物の成分などを含む様々な因子および医薬分野においてよく知られた類似因子によって多様になり得、当該技術分野において通常の知識を有する者は、目的とする治療に効果的な投与量を容易に決定し、処方することができる。

40

【0052】

本発明の前記薬学的組成物のより好ましい効果のための投与量は、好ましくは1日0.01mg/kg～1,000mg/kg、より好ましくは1mg/kg～500mg/kgであってもよい。本発明の前記薬学的組成物の投与は、1日に1回投与され得、数回に分

50

けて投与され得る。したがって、前記投与量は、いかなる点においても本発明の範囲を限定するものではない。

【0053】

本発明の前記薬学的組成物の投与経路および投与方式は、それぞれ独立的であってもよく、その方式において特に限定されず、目的とする該当部位に前記薬学的組成物が到達できる限り、任意の投与経路および投与方式に従うことができる。前記薬学的組成物は、経口投与または非経口投与方式で投与することができる。

【0054】

前記非経口投与する方法としては、例えば静脈内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、経皮投与または皮下投与などを利用することができ、前記組成物を疾患部位に塗布したり、噴霧、吸入する方法も利用することができるが、これらに限定されない。

10

【0055】

本発明の前記薬学的組成物は、好ましくは経口投与または注射投与され得る。

【0056】

本発明の組成物は、ブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療効果を高めるために、フロンドシドA (Frondoside A) をさらに含むことができる。

【0057】

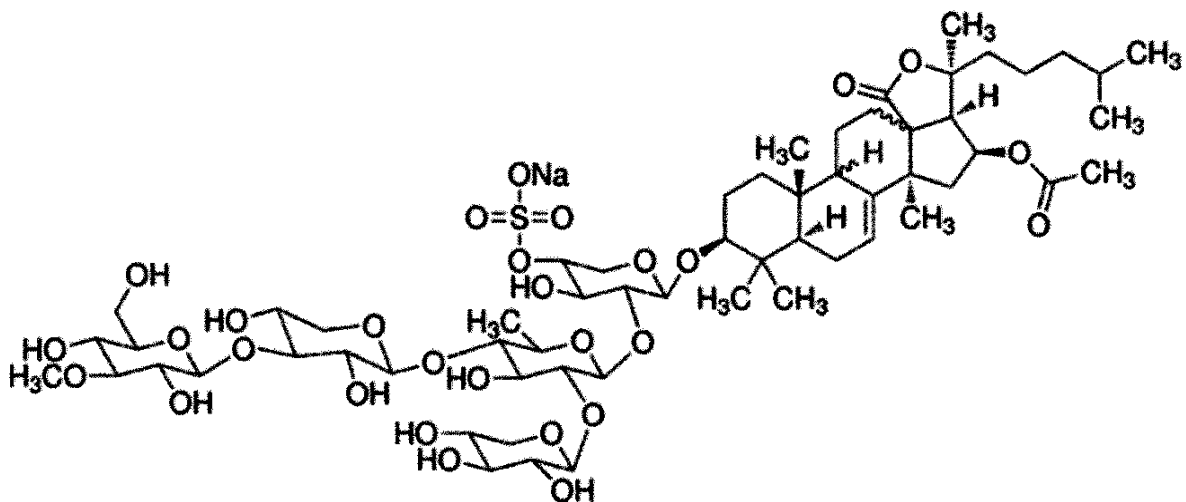
本発明で「フロンドシドA」または「Frondoside A」は、下記〔化学式〕で表されるサポニン化合物であって、本発明のナマコに含まれたものと知られている。CAS番号は、127367-76-4 (anhydrous) であり、化学式は、 $C_{60}H_{96}O_{29}SNa$ である。本発明では、フロンドシドAが、ブルッフ膜の水理伝導率の改善、MMP分泌および脂質分泌を通じてブルッフ膜の輸送機能の改善、ブルッフ膜の再生および機能向上に関与することを確認し、これを通じて、フロンドシドAがブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延、治療および改善の新規用途を確認した。

20

【0058】

〔化学式〕

【化1】



30

40

【0059】

本発明の組成物は、ブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療効果を高めるために、アミノ酸、抗酸化物質、ミネラル、金属物質、ルテイン、アスタキサンチンおよびゼアキサンチンよりなる群から選ばれる一つ以上の組成物をさらに含むことができる。

【0060】

本発明で前記ブルッフ膜機能の低下関連疾患は、加齢黄斑変性 (AMD)、ソーズビー眼底ジストロフィー (Sorsby's fundus dystrophy)、ML (Malattia Levintanese)、スターガルト病 (Stargardt disease)、ベスト卵黄状黄斑ジストロフィー (Best's vitelliform)

50

rm retinal dystrophy)または、DHRD(Doyne's honeycomb retinal dystrophy)であってもよいが、これらに限定されない。

【0061】

また、本発明は、前記ナマコ抽出物を有効成分として含むブルッフ膜(Bruch's membrane)機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療用健康機能食品組成物を提供する。

【0062】

本発明の前記健康機能食品組成物において、前記ナマコ抽出物またはその分画物、およびその効能などは、本発明の前記薬学的組成物と関連して前記で説明したものと同一である。

10

【0063】

本発明の前記健康機能食品組成物を食品添加物として使用する場合、前記組成物をそのまま添加したり、他の食品または食品成分と共に使用することができ、通常の方法によって適切に使用することができる。

【0064】

前記食品の種類は、特に限定されず、通常の意味における食品を全て含む。前記物質を添加できる食品の非制限的な例としては、肉類、ソーセージ、パン、チョコレート、キャンディ類、スナック類、菓子類、ピザ、ラーメン、その他麺類、ガム類、アイスクリーム類を含む酪農製品、各種スープ、飲料、お茶、ドリンク剤、アルコール飲料およびビタミン複合剤などが挙げられる。

20

【0065】

本発明の前記健康機能食品組成物が飲料組成物である場合、通常の飲料のように様々な香味剤または天然炭水化物などを追加成分として含有することができる。前記天然炭水化物の非制限的な例として、ブドウ糖、果糖のようなモノサッカライド；マルトース、スクロースのようなジサッカライド；デキストリン、シクロデキストリンのような天然甘味剤；サッカリン、アスパルタムのような合成甘味剤などが挙げられる。前記添加される追加成分の比率は、当業者の選択によって適切に決定され得る。

【0066】

前記の他に本発明の健康機能食品組成物は、様々な栄養剤、ビタミン、電解質、風味剤、着色剤、ペクチン酸およびその塩、アルギン酸およびその塩、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、炭酸飲料に使用される炭酸化剤などを含有することができる。その他に本発明の健康機能食品組成物は、天然果物ジュース、果物飲料または野菜飲料などの製造のための果肉を含有することができる。このような成分は、独立して使用するか、2以上を組み合わせ使用することができる。このような添加物の比率も、当業者によって適切に選択され得る。

30

【0067】

また、本発明は、フロンドシドA(Frondoside A)、その異性体、その水和物(hydrate)、またはその塩を有効成分として含むブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および治療/改善用薬学的組成物を提供する。

40

【0068】

また、本発明は、フロンドシドA(Frondoside A)、その異性体、その水和物(hydrate)、またはその塩を有効成分として含むブルッフ膜機能の低下関連疾患の予防、遅延および改善用健康機能食品組成物を提供する。

【発明の効果】

【0069】

本発明による組成物は、ブルッフ膜の輸送機能を改善させ、ブルッフ膜の再生を促進させることによって、目の老化過程を遅らせたり取り戻す効果があるので、老化によるブルッフ膜の機能低下によって発生する加齢黄斑変性(AMD)、ソーズビー眼底ジストロフィー(Sorsby's fundus dystrophy)、ML(Mallattia

50

Levintanese)、スターガルト病(Stargardt disease)、ベスト卵黄状黄斑ジストロフィー(Best's vitelliform retinal dystrophy)またはDHRD(Doyne's honeycomb retinal dystrophy)のような病気の予防および治療に優れている。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1は、ヒトの網膜の断面イメージと可視光変調(phototransduction)の構成要素を図式化した図である。

【図2】図2は、老化によるブルッフ膜の構造的変化を示すグラフであって、老化によって(A)ブルッフ膜の厚さが2~3倍増加し、(B)損傷したり変性したコラーゲンの蓄積量が増加し、(C)コレステロールエステルのような主な脂質物質が幾何級数的に増加し、(D)遊離状態のチオール(thiol)基が減少して、タンパク質の凝集(aggregation)を起こす。

10

【図3】図3は、老化によるブルッフ膜の変化と黄斑変性患者での急激な変化を示す図である。

【図4】図4は、ブルッフ膜の老化と再生役割をするMMP作用機序および黄斑変性患者での異常なMMP作用機序を示すものである。

【図5】図5は、一般人と黄斑変性患者の老化によるヒトのブルッフ膜の水理伝導率変化を示す結果である。

【図6】図6は、一般人と黄斑変性患者の老化によるヒトのブルッフ膜の拡散度の変化を示す結果である。

20

【図7】図7は、本願発明のナマコ抽出物のブルッフ膜の輸送機能の改善効果を示す結果である。

【図8】図8は、本願発明のナマコ抽出物のブルッフ膜から脂質分泌効果を示す用量反応曲線である。

【図9】図9は、ヒトのブルッフ膜から自由なMMP酵素を除去した結果である。

【図10】図10は、本願発明のナマコ抽出物を利用してヒトのブルッフ膜に結合されたMMP酵素の除去効果を示す結果である。

【図11】図11は、本願発明のナマコ抽出物を利用してヒトのブルッフ膜に結合されたHMW2の除去効果を示す結果である。

30

【図12】図12は、ナマコ濃縮液をシリカゲルカラムを用いて分離して採取した分画物のサポニンをTLCで確認した結果である。

【図13】図13は、前記図12の分画物のうち類似した構成成分からなる分画物どうしを5個のグループに分類してTLCで示す結果である(Std、ナマコ粉末全体; F1~F5、ナマコ粉末の分画物)。

【図14】図14は、前記図13の5個の分画物の水理伝導率の改善効果を示す結果である。

【図15】図15は、各分画物に含まれたサポニンの種類を比較した結果である。(A)は、ナマコ分画物それぞれに存在するサポニンの種類を確認した結果であり、(B)は、Frondoside Aと全体ナマコ抽出物に存在するサポニンを比較した結果である(SC、ナマコ全体; FA、Frondoside A; F1~F5、ナマコ分画物)。

40

【図16】図16は、ヒトのブルッフ膜をナマコ分画物(F1~F5)と培養させた後、ブルッフ膜からMMP酵素分泌を確認した結果である(FCS、fetal calf serum; C、対照群; F1~F5、それぞれの分画物と共に培養したブルッフ膜; それぞれn=3)

【図17】図17は、ナマコ分画物の培養後に分泌される脂質の変化を分析した結果である(ChE、コレステロールエステル; TG、トリグリセリド; Ch、コレステロール; PC、ホスファチジルコリン)。

【図18】図18は、フロンドシドAの水理伝導率の改善効果を確認した結果である。

【図19】図19は、フロンドシドAのブルッフ膜内MMP除去効果を確認した結果であ

50

る。

【図20】図20は、フロンドシドAのブルッフ膜内脂質除去効果を確認した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0071】

以下では、本発明をより詳細に説明する。

【0072】

老化によって現れるブルッフ膜輸送機能の退行性変化は、老人に視力障害を起し、ひどい場合、失明につながる加齢黄斑変性 (AMD; Age-related macular degeneration) の原因となる。

10

【0073】

多数の研究結果を通じて、老化は、ブルッフ膜の物質輸送能力と老廃物除去過程に深刻な悪影響を与えると明らかにされ (Hussain et al., 2002; 2004; 2010; Starita et al., 1996; Moore et al., 1995; Moore and Clover, 2001)、老化によって厚さが増加するブルッフ膜に蓄積された老廃物は、脂質および変性したタンパク質からなると知られている。また、ブルッフ膜に存在する老廃物蓄積の根本原因は、MMP (matrix metalloproteinases、基質金属タンパク質分解酵素、以下、MMPという) と呼ばれるタンパク質分解酵素が、ブルッフ膜の再生に関する役割を十分に行わないためであることが明らかにされた。

20

【0074】

MMP (matrix metalloproteinases) は、タンパク質分解酵素であって、RPEからブルッフ膜に不活性化状態である前駆体 (pro-form) の形態で分泌される。この前駆体で小さいペプチドが除去されることによって、活性化した形態である活性MMP2と活性MMP9となる。活性化したMMP2およびMMP9酵素は、活性化過程を通じて細胞外基質を構成する大概の物質を分解することができ、損傷した構成物質を除去し、新しい物質に交替する。このような膜の再生作用機序を通じてブルッフ膜の構造と機能が健康な状態に維持され得るように役割をする。しかしながら、ブルッフ膜の老化によって活性化した形態のMMP2およびMMP9の量が減少することが明らかにされ、黄斑変性患者のブルッフ膜では、活性化したMMP2およびMMP9の量が、類似した年齢帯の平均に比べて約60%減少した (Hussain et al., 2011)。

30

【0075】

具体的に、老化によるMMPの作用機序は、図4に示した。前駆体形態であるpro-MMP2およびpro-MMP9は、ブルッフ膜でHMW1、HMW2と呼ばれる高分子化合物 (HMW; high molecular weight complexes) を形成する。また、この物質は、他のpro-MMP2およびpro-MMP9分子と結合されて、さらに大きい形態の高分子物質になるが、これを大型高分子基質金属タンパク質分解酵素化合物 (LMC, large macromolecular complexes) という (Kumar et al., Hussain et al., 2010)。

。老化によって前記のような高分子物質の合成が増加すると、高分子化合物がマトリック

ス内に閉じ込められているか結合された状態で存在するようになり、pro-MMPと活性型MMPも、膜に閉じ込められて使用できなくなる。したがって、ブルッフ膜の再生に必要な自由な状態のMMP量が減少するので、膜の分解および再生が正常に行われず、結果的に、相当量の老廃物が積もって、膜の輸送能力の低下につながる。

40

【0076】

老化によるブルッフ膜の輸送機能の変化を確認するために、1歳から96歳の範囲の56名の正常なヒトの目と11名の黄斑変性患者の目を対象として中心視力を担当する黄斑 (macular) 部位と周辺 (peripheral) 部位を区分してその影響を評価した。

50

【0077】

まず、老廃物の輸送能力を確認するために、寄贈を受けた目から分離したブルッフ膜の水理伝導率 (hydraulic conductivity) を測定した。分離したブルッフ膜は、開放型ウッシングチャンバー (Ussing chamber) に載置して、静水圧 (hydrostatic pressure) 下の流体の定量変化を測定して、水理伝導率の変化を計算した (図5B、C)。その結果、黄斑部位の流体輸送能力は、老化が進行されるに伴い、幾何級数的に減少し、毎16年ごとに輸送能力が半分に減少したことが分かった (図5D)。図5Dのデータは、Y軸をセミログプロット (semi-log plot) を使用して指数関数型崩壊 (exponential decay) を線形に転換して示した。視細胞の機能を維持するために、ブルッフ膜は、最小限の水理伝導率の機能が要求されるが、これを機能停止 (Failure) 線で表示した。輸送機能がこの以下に低下する場合には、RPEの下部に流体 (fluid) が蓄積されて、RPE剥離現象が起こるようになり、上部にある視細胞の死につながる。黄斑変性患者の約12~20%にこのような症状が現れる。普通、正常なヒトの場合には、一生の間この線が機能停止閾値点 (failure threshold) 以下に低下しないが、一般的な老人人口のうちでも、この機能停止閾値点と交差する場合があり、この場合、異常な夜間視力のような深刻な問題が現れる。黄斑変性患者は、黄斑部位が病気特性上、非常に毀損された状態であるので、黄斑部位だけを独立して測定することが不可能である。周辺部位の水理伝導率も、黄斑部位と類似した様相で幾何級数的に減少し、機能の半減期が約22年であることが示された (図5E)。11名の黄斑変性患者の周辺部位を測定した水理伝導率は、いずれも、平均回帰線以下に示されることを確認 (図5Eの黒色円、赤色円を参照) することができ、これは、黄斑部位でなく、周辺部においても物質輸送機能の減少が深刻な状態に進行されることを示している。

【0078】

次に、ブルッフ膜の栄養素輸送能力を確認するために、タンパク質拡散度 (diffusion) 実験を行った。具体的に、一般的なウッシングチャンバー (Ussing chamber) を使用してFITC-dextran (MW 23kDa) がブルッフ膜を通過する拡散度を実験した (図6B、C)。デキストラン (dextran) は、ビタミンA、微量元素 (trace metals)、脂質などの物質輸送に役割をする大概の運搬タンパク質 (carrier protein) と類似したサイズの物質として選択された。ブルッフ膜の老化によって黄斑部位を通過するタンパク質サイズの物質の拡散度が急激に落ちること (図6D) を確認することができた。これによって、血しょうには、正常水準のビタミンや抗酸化物質が存在するにも関わらず、黄斑部位には、これら物質の欠乏現象が観察される。周辺部位の場合、黄斑部位に比べて拡散度の減少程度が遅く示されるが (図6E)、黄斑変性患者の場合には、非常に急激に減少することを確認することができた (図6Eの黒色円、赤色円を参照)。このように周辺部位の減少程度と比較して、黄斑変性患者の黄斑部位の機能を測定することができる場合、その程度は、周辺部位に比べて格別に速くて且つ急激に進行され得る可能性が大きいことを確認することができる。このような拡散輸送の減少は、栄養分の供給および有害老廃物の除去を妨害して、結局のところ、RPEおよび視細胞の損傷および死滅の危険を増加させて失明の原因となる。

【0079】

以下、実施例を通じて本発明をより詳細に説明する。これらの実施例は、ただ本発明を例示するためのものであって、本発明の範囲がこれらの実施例により限定されるものと解すべきものではないことは、当業界において通常の知識を有する者にとって自明だろう。

【0080】

実施例1. ナマコ抽出物の製造

乾燥したナマコを粉砕機を使用してナマコ粉末を製造し、これに70%エタノールを添加した後、約3~6時間の間抽出した。真空状態でエタノールを除去して、本発明の実施例に使用するナマコ抽出物を製造した。

【0081】

実施例 2 . ナマコ抽出物を利用したブルッフ膜の水理伝導率の改善効果

前記実施例 1 で製造したナマコ抽出物のブルッフ膜の水理伝導率に対する効果を確認するために、14 名の眼球寄贈者 (52 ~ 84 歳) の目を使用して実験した。具体的に、寄贈を受けたヒトの目から分離したブルッフ膜を 24 時間の間 2 . 5 % のナマコ抽出物と共に培養し、対照群として Tris - HCl を使用した。

【0082】

その結果を図 7 に示し、ナマコ抽出物がブルッフ膜の水理伝導率を 2 . 3 倍増加させたことが分かった (図 7 A、 $p < 0 . 001$)。ナマコ抽出物の水理伝導率の改善効果は、ブルッフ膜を約 20 ~ 25 年ほど若くする効果と同じである。水理伝導率のこのような改善効果によって機能停止閾値点 (failure) に達しないようにするので、黄斑変性の

10

【0083】

また、ナマコ抽出物の用量によるブルッフ膜の輸送機能の改善効果を調べてみるために、69 歳 ~ 84 歳の範囲の 4 名の目から分離したブルッフ膜を測定して、水理伝導率の改善に対する用量反応曲線で示した。具体的に、開放型ウッシングチャンバー (open-type Ussing chamber) にブルッフ膜を載置した後、チューブを通じて静水圧 (hydrostatic pressure) 下で Tris - HCl バッファーを通過させ、一定時間後に通過した溶液を採取して、流体輸送 (fluid transport) を測定した。対照群には、Tris - HCl だけを使用し、実験群は、0 ~ 10 % の濃度別ナマコ抽出物进行处理し、24 時間の間培養した後に、再び流体輸送を測定した ([13] Moore DJ, Hussain AA, Marshall J. (1995). Age-related variation in the hydraulic conductivity of Bruchmembrane. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36 (7): 1290 - 7. [17] Starita C, Hussain AA, Pagliarini S, Marshall J. (1996) Hydrodynamics of ageing Bruchmembrane: implications for macular disease. Exp. Eye Res. 62 (5): 565 - 72. 参考)

20

【0084】

その結果、図 7 に示されたナマコ抽出物の用量反応曲線によれば、ナマコ抽出物の用量が増加するに伴って膜に対する水理伝導率が改善され、飽和状態で水理伝導率がナマコ抽出物を添加しなかったときに比べて、3 . 2 倍増加したことが分かり (図 7 B)、これは、老化による減少曲線の水理伝導率の機能を約 33 歳改善させる効果と同じである (図 7 C)。

30

【0085】

したがって、ナマコ抽出物は、老化が進行される多様な年齢帯のブルッフ膜の輸送機能の改善に重大な影響を与えることができることを確認した。

【0086】

実施例 3 . ナマコ抽出物を利用したブルッフ膜の脂質老廃物の除去効果

ブルッフ膜の脂質老廃物の主な構成成分は、コレステロールエステル (cholesterol esters)、コレステロール、トリグリセリド (triglyceride)、リン脂質 (phospholipids) である。ナマコ抽出物がブルッフ膜に積まれている脂質抽出物の除去効果があることを確認するために、用量反応 (dose-response) 実験を行った。具体的に 4 名のヒトの目から分離したブルッフ膜 (50 歳 ~ 82 歳) を Tris - HCl バッファーに混ぜて均質化した。ホモジネート (homogenate) は、遠心分離を行って上澄み液と脂質老廃物が含まれているペレット (pellet) に分離した。ペレットは、Tris - HCl バッファーを再び混ぜて、24 時間の間 37 インキュベーターで 0 ~ 2 . 5 % 濃度のナマコ抽出物と共に培養した。培養が終わった後に、試料を遠心分離して、ペレットから上澄み液として分泌された脂質の量を薄層クロマトグラフィー (Thin Layer Chromatography ,

40

50

TLC)方法で定量した。

【0087】

その結果、多様な種類の脂質の分泌データと反応力学(kinetics)が現れた。図8に示されたように、コレステロールエステル、コレステロールおよびトリグリセリドの分泌は、双曲線動力学(hyperbolic kinetics)を示し、ホスファチジルコリン(phosphatidyl choline)の分泌は、シグモイド動力学(sigmoid kinetics)形態を示し、ナマコ抽出物と共に培養したとき、ブルッフ膜に沈着されていた脂質老廃物を分散させ、膜から分泌されることを確認した。

【0088】

実施例4．ナマコ抽出物を利用したブルッフ膜のMMP酵素分泌効果

ブルッフ膜のMMP酵素は、自由な形態や膜に結合された形態で存在する。ナマコ抽出物がブルッフ膜からMMP酵素を除去できるかを確認するために、まず、分離したブルッフ膜で膜に結合されたMMPを確認した。

【0089】

分離したブルッフ膜をウッシングチャンバーに載置してTris-HClバッファーを貫流すると、自由なMMPがブルッフ膜の水理伝導率によって約6～12時間の間ゆっくり膜から分泌される(図9A)。膜から自由な形態のMMPが分泌されたら、ブルッフ膜をチャンバーから分離した後、膜に残っているMMPをSDSバッファーを使用して抽出した。溶解性があるか、自由に存在するMMP物質の場合には、貫流5～12時間の間に大概ゆっくり分泌された(図9B)。しかしながら、ブルッフ膜に存在する大概のMMPは、膜に結合されているか閉じ込められた状態で存在し、5～12時間の貫流後にも除去されずに、膜に残っていることを確認することができる。

【0090】

このように膜に結合されているか閉じ込められた状態であるMMPがナマコ抽出物により除去され得るかを調べるために、73歳、79歳の寄贈者の目から分離したブルッフ膜を12時間の間Tris-HClとの貫流を通じて自由な状態のMMP酵素を先に分泌させて除去した。その後、2.5%濃度のナマコ抽出物と共に貫流した結果、図10に示されたように、膜に結合されていたMMPが分泌されることを確認することができた。

【0091】

ブルッフ膜を塞いでいたHMW1とHMW2を膜から除去できるので、ブルッフ膜の輸送能力を助けることができ、また、活性化した状態のMMPの分泌は、異常なタンパク質を分解する効果があるので、ブルッフ膜の老化を取り戻すのに肯定的な影響を与えることができるものと期待される。

【0092】

実施例5．ナマコ抽出物を利用したヒトの目のブルッフ膜のペレットに存在するMMP酵素の分泌効果

ナマコ抽出物のブルッフ膜からMMP酵素の分泌効果を確認するために、75歳の寄贈者の二つの眼球から分離したヒトの目のブルッフ膜を利用した。試料に使用されたブルッフ膜のペレットには、MMP酵素が膜に閉じ込められているか結合された形態で存在した。一定体積のペレットを対照群としてTris-HClバッファーと培養し、実験群として2.5%ナマコ抽出物と培養した。37℃で24時間の間培養した後に、上澄み液として分泌されたMMPの量とペレットに結合された状態で存在するMMPを測定するために遠心分離を行った。

【0093】

その結果、対照群では、HMW2の化合物がほとんど分泌されず、大概ペレット内に残っていたが、ナマコ抽出物と培養したブルッフ膜は、膜に結合されていた大概のHMW2が上澄み液として分泌されたことを確認することができた(図11)。これは、膜を塞いでいたHMW2を除去することによって、膜の流れを良くして、ブルッフ膜の輸送能力を改善させることができることを意味する。また、ナマコ抽出物の培養は、活性化した状態のHMW1と前駆体状態のpro-MMP2およびpro-MMP9を膜から分泌させて、

10

20

30

40

50

ブルッフ膜にある老廃物を除去することによって、輸送機能の改善に肯定的影響を与えることができることを確認した。

【0094】

実施例6．ナマコ粉末の分画物を利用したヒトのブルッフ膜の水理伝導率の改善効果

乾燥したナマコを粉碎機を使用してナマコ粉末を製造し、1.5gのナマコ粉末を15mlのメタノールに溶かした後に溶媒を蒸発させた後、3mlのCMW(chloroform: methanol: H₂O = 50: 30: 6)溶媒を入れて、ナマコ濃縮液を製造した。製造されたナマコ濃縮液中0.8mlをシリカゲル(silica gel)カラムを通じて分離した。カラムは、前記と同じCMW溶媒を使用し、分画物は、20分一回ずつ(約2ml)総34個を採取した。それぞれの分画物は、溶媒を蒸発させた後、2000μlのメタノールに溶かし、それぞれ5μlずつの溶液を取ってTLC(thin layer chromatography)でサポニンの量を定量した(図12)。その結果、図12および下記表1で示されたように、類似した構成成分からなる分画物を5個のグループ(F1~F5)に分け、それぞれの分画物のグループに対してTLCを行った(図13)。5個の分画物内に入っているサポニンの量を同一にするために、CMW溶媒で希釈して、分画物別のサポニンを250μg/mlの濃度で標準化した。

【0095】

【表1】

分画物の種類	分画物No.	サポニンの量 (mg)
F1	11、12、13	6.1
F2	14、15、16、17	11.4
F3	18、19、20	7.7
F4	21、22、23、24、25	19.7
F5	26、27、28	17.5
総サポニンの量		62.4

【0096】

ナマコ粉末の分画物別にブルッフ膜の水理伝導率の改善効果を確認するために、寄贈を受けたヒト(78歳、82歳)の目から分離したブルッフ膜を前記実施例2で記述した水理伝導率の実験方法と同一に測定した。

【0097】

その結果、下記表2および図14に示されたように、F3の分画物が統計学的に有意に改善効果があり(p<0.001)、F2、F4、F5も、対照群に対して水理伝導率が増加する傾向を示した。

【0098】

【表2】

分画物	水理伝導率の改善程度 (fold change、分画物培養の前後比較) Mean±SD (n)	Significance
対照群 (Trisバッファー)	1.1±0.08 (5)	
F1	1.03±0.01 (3)	NS
F2	1.16±0.06 (3)	NS
F3	1.39±0.11 (3)	P<0.001
F4	1.15±0.05 (3)	NS
F5	1.19±0.05 (3)	NS

【0099】

実施例7．ナマコ粉末の分画物に存在する活性物質の確認

前記実施例6においてブルッフ膜の水理伝導率の改善に最も良い効果を示したF3分画に特異的な物質を確認するために、それぞれの分画物に存在するサポニンの種類を比較分析した。

【0100】

図15で、F3に存在し、F1およびF2にはないサポニンを矢印(→)で表示し、この物質は、F4およびF5にも微量存在することが示された。全体ナマコ試料の分離結果(SC)の同一位置でも、この物質を確認することができ、これは、従来ナマコのサポニンとして知られたフロンドシドA(Frondoside A, FA)であることが分かった。

【0101】

実施例8．ナマコ分画物のMMP分泌効果

前記ナマコ分画物がブルッフ膜からMMPを分泌させる効果を確認するために、65～76歳の間の患者から寄贈を受けた目からブルッフ膜を分離した。具体的に、直径8mmの円形状のブルッフ膜を36個準備し、総18個の試験管に円形状の組織(Trephine)を2個ずつ入れ、試験管3個ずつ一つのグループとして総6個のグループに分けて実験した(対照群、F1、F2、F3、F4、F5)。ナマコ分画物は、サポニンの量を上記のように250μg/mlと同一に調整し、24時間培養後、50μlの培養液でザイモグラフィ(zymography)を実施して、MMP分泌を確認した。対照群は、ナマコ分画物の代わりにTrisバッファーと共に培養した。残りの培養液は、CM溶液(chloroform:methanol=2:1, v/v)を入れて、下記実施例9で分泌された脂質の量を分析するのに使用した。

【0102】

その結果、図16に示されたように、Trisバッファーと培養した対照群と分画物F1の場合、HMW2とPro-MMP9、微量のHMW1が分泌されたが、pro-MMP2は、観察されなかった。分画物F3は、対照群と比較したとき、Pro-MMP2が追加に分泌され、分画物F4とF5は、HMW2、HMW1、Pro-MMP2を膜で分泌すると共に、Pro-MMP9の分泌量も顕著に増加することを確認することができた。これから分画物F3は、Pro-MMP2分泌量を増加させ、分画物F4およびF5は、ブルッフ膜に結合されていた大概のMMP酵素の種類を分泌させることが分かった。

【0103】

実施例9．ナマコ分画物の脂質変化効果

前記実施例8のように、ブルッフ膜をそれぞれのナマコ分画物と24時間の間培養させた後に、0.95mlの培養液をCM溶液(chloroform:methanol=2:1, v/v)を利用して脂質成分を抽出した。溶媒を蒸発させた後、50μlのCM溶液を入れ、それぞれの試料で30μlずつTLCプレートに点滴して、存在する脂質の種類を分析した。

【0104】

その結果、図17に示されたように、対照群と分画物F1の場合、ホスファチジルコリン(Phosphatidyl Choline, PC)は分泌されず、コレステロールエステル(Cholesterol ester, ChE)とトリグリセリド(Triglycerides, TG)が分泌され、微量のコレステロール(Cholesterol, Ch)が分泌された。一方、分画物F3は、コレステロールエステルとトリグリセリド、コレステロールの分泌に効果を示し、他の種類の脂質UL-1とUL-3の除去にも効果があった。分画物F4とF5は、対照群と比較したとき、脂質の除去に微々たる効果を示した。

【0105】

実施例10．フロンドシドA(Frondoside A)のヒトのブルッフ膜に対する水理伝導率の改善効果

前記実施例7で確認した単一サポニンフロンドシドAを利用してヒトのブルッフ膜で物質輸送能力の改善効果があるかを確認した。具体的に、寄贈を受けた68歳、79歳患者のブルッフ膜を利用して前記実施例と同じ方法でフロンドシドA溶液167μg/mlの水理伝導率の変化を測定した。対照群としては、Trisバッファーを利用した。その結果、下記表3および図18に示されたように、フロンドシドAの水理伝導率の改善効果が、

対照群に比べて1.6倍以上優れていることが分かった。

【0106】

【表3】

	Fold-change Mean $\pm$ SD (n)
対照群 (Tris buffer only)	0.97 $\pm$ 0.16 (4)
フロンドシドA (167 μ g/ml)	1.65 $\pm$ 0.2 (3) ***

【0107】

実施例11. フロンドシドA (Frondoside A) のMMP分泌効果

前記実施例10において水理伝導率の測定時に、30時間の間培養した溶液を利用してザイモグラフィ (zymography) を実施した。具体的に、対照群であるTrisバッファー溶液とフロンドシドA溶液 (167 μ g/ml) を30時間の間ブルッフ膜と培養し、その溶液中50 μ lとSDSサンプルバッファー50 μ lを混合した後、このうち30 μ lをゼリにローディングして、ヒトのブルッフ膜から分泌されるMMP酵素を測定した。

10

【0108】

その結果、図19に示されたように、対照群であるTrisバッファーと培養したときは、MMPがほとんど分泌されないのに対し、フロンドシドAと培養した場合は、膜に結合されていた膨大な量のPro-MMP9が分泌されることを確認することができた。これから、フロンドシドAが様々な種類のMMPの中から選択的にPro-MMP9と結合して、これをブルッフ膜から除去することができることが分かった。

20

【0109】

実施例12. フロンドシドA (Frondoside A) の脂質除去効果

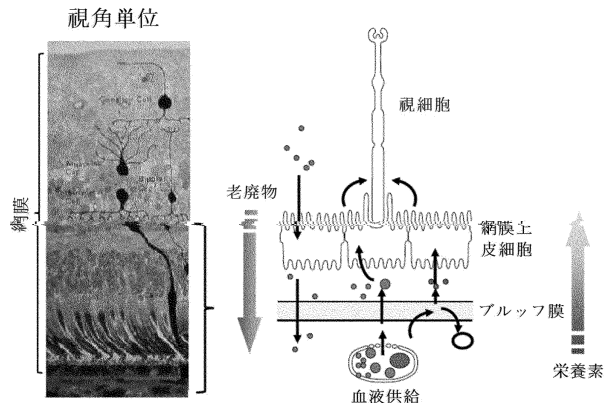
フロンドシドAの脂質除去効果を確認するために、前記実施例10で水理伝導率を測定した後に、直径6mmのサイズのブルッフ膜を切り出して、CM溶液 (chloroform: methanol = 2:1) で脂質を抽出し、溶媒を蒸発させた。さらに50 μ lのCM溶液を入れ、このうち40 μ lをシリカゲルTLCプレートに点滴して、脂質の種類と量を分析した。

【0110】

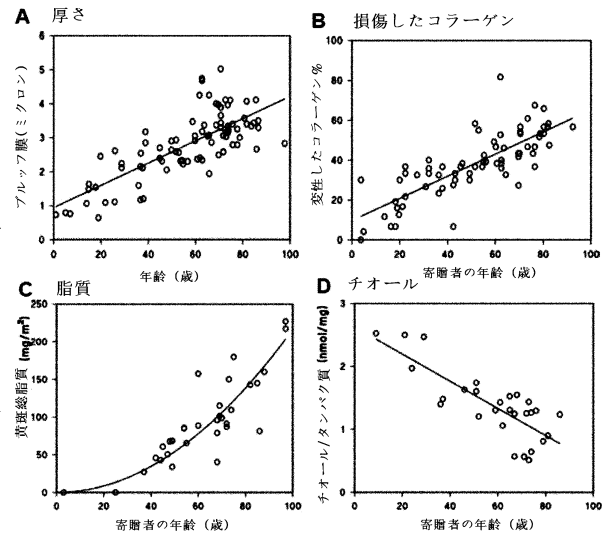
その結果、図20に示されたように、フロンドシドAと共に培養した場合、コレステロールエステル、トリグリセリド、コレステロールの除去には影響を与えなかったが、ブルッフ膜のホスファチジルコリンの除去効果があることを確認することができた。

30

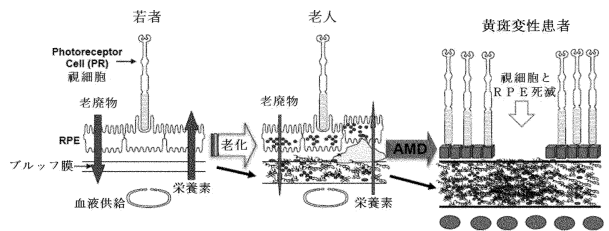
【図 1】



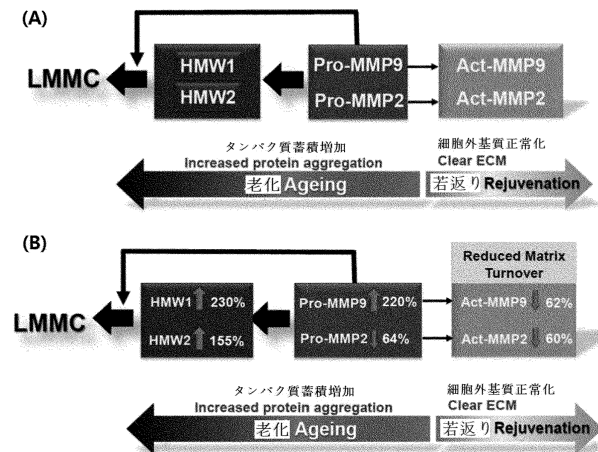
【図 2】



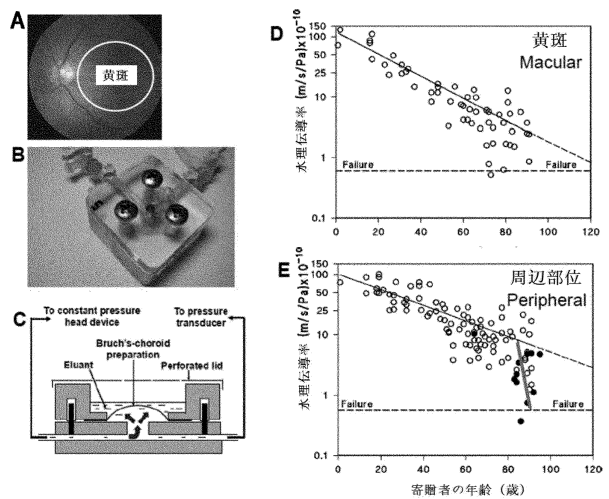
【図 3】



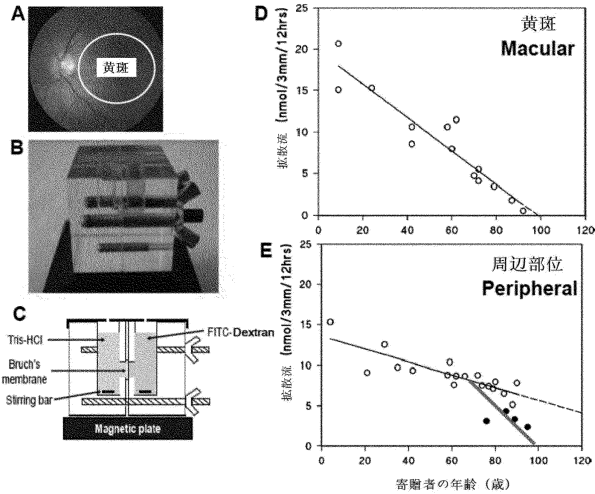
【図 4】



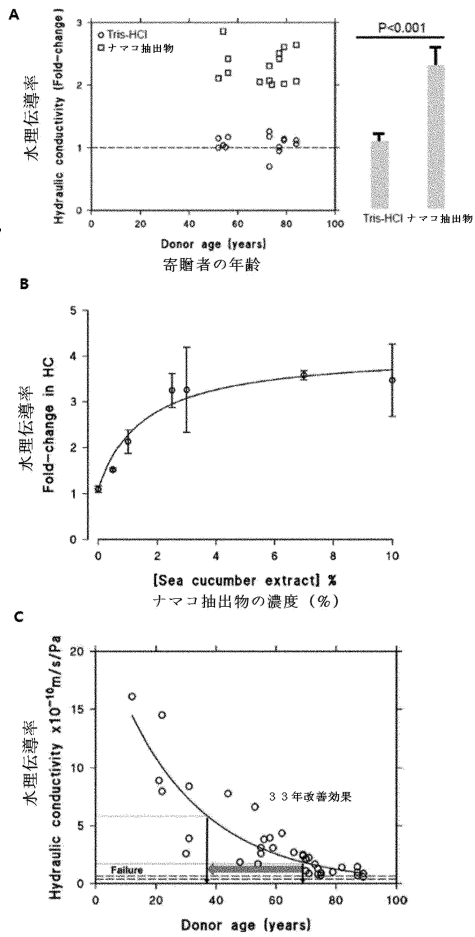
【図 5】



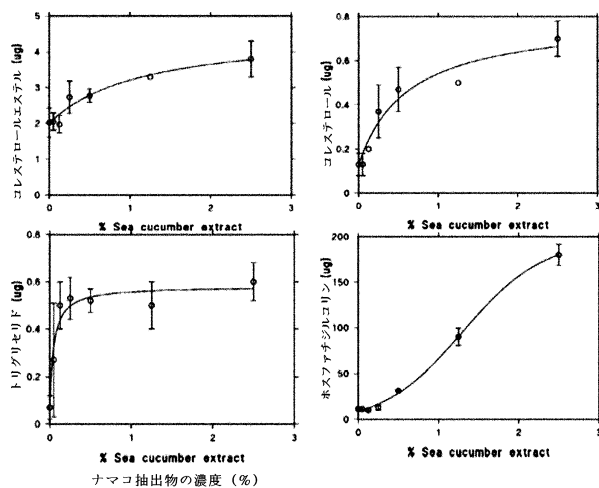
【図 6】



【図 7】



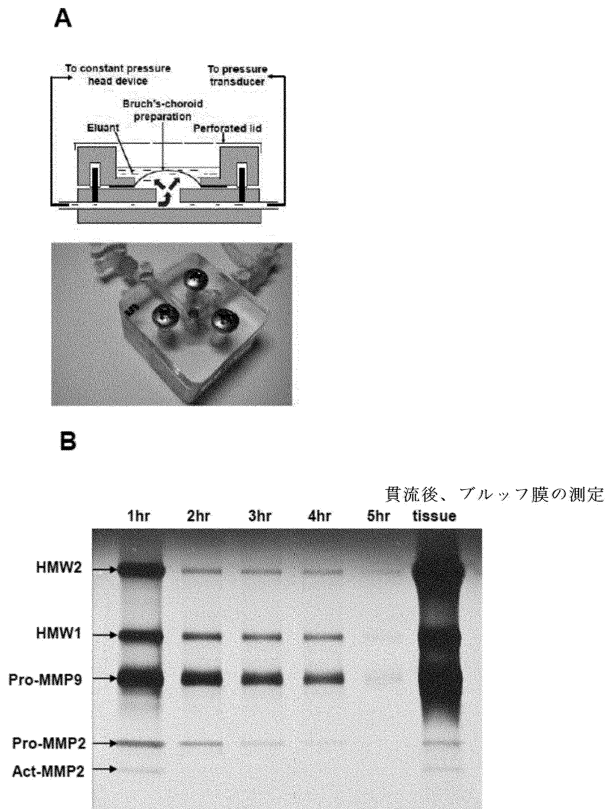
【図 8】



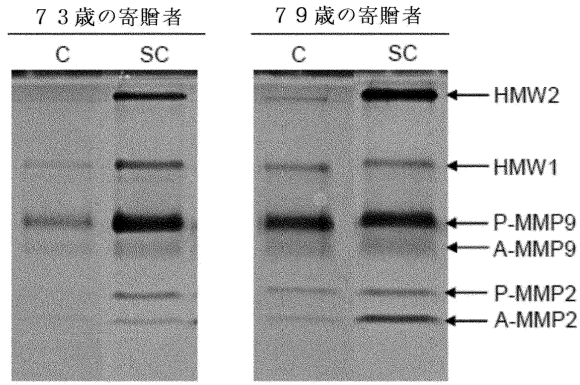
曲線あてはめ 動態パラメーター

	Fitted function	Kinetic parameters
コレステロールエステル	双曲線	Km = 1.2%; Vm = 4.6ug
コレステロール	双曲線	Km = 0.62%; Vm = 0.9ug
トリグリセリド	双曲線	Km = 0.05%; Vm = 0.58ug
ホスファチジルコリン	シグモイド	X-50 = 1.3%; Vm = 197ug

【図 9】

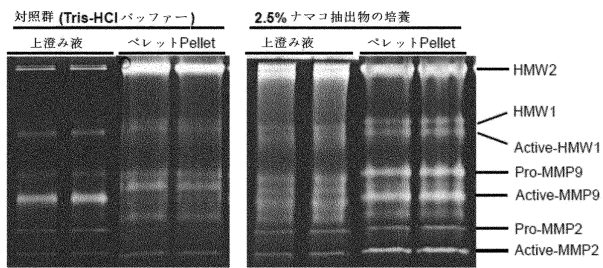


【図 10】

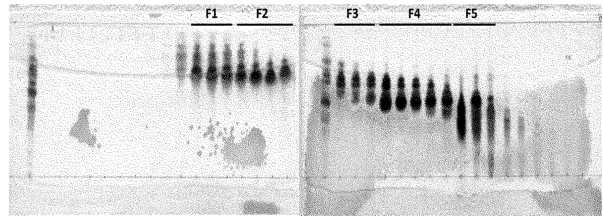


ブルッフ膜, C: Control; SC: 2.5% ナマコ抽出物

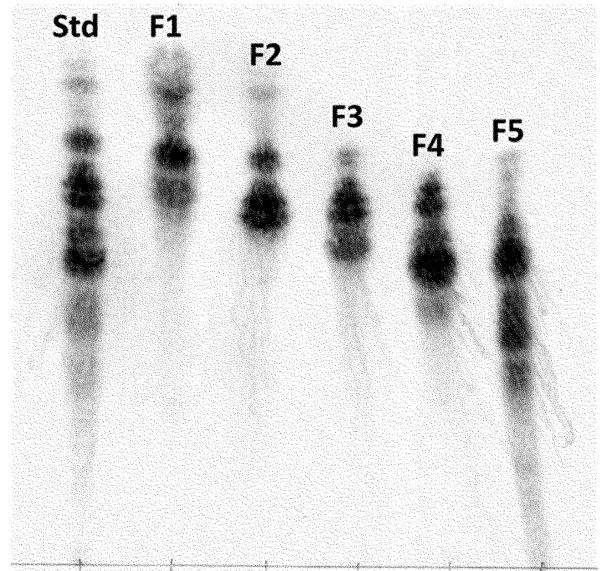
【図 11】



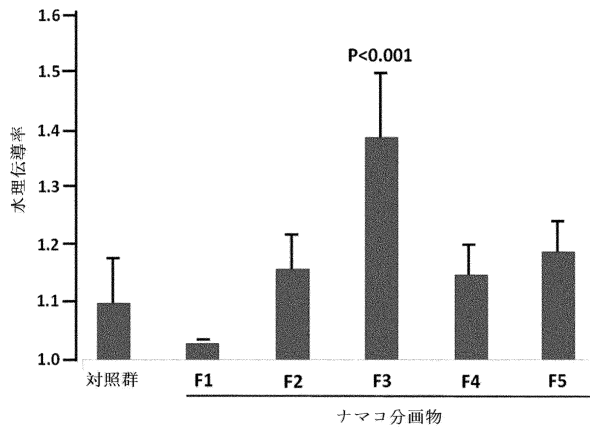
【図 12】



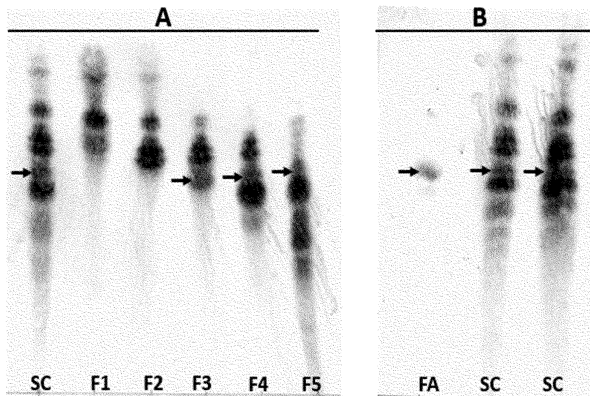
【図 13】



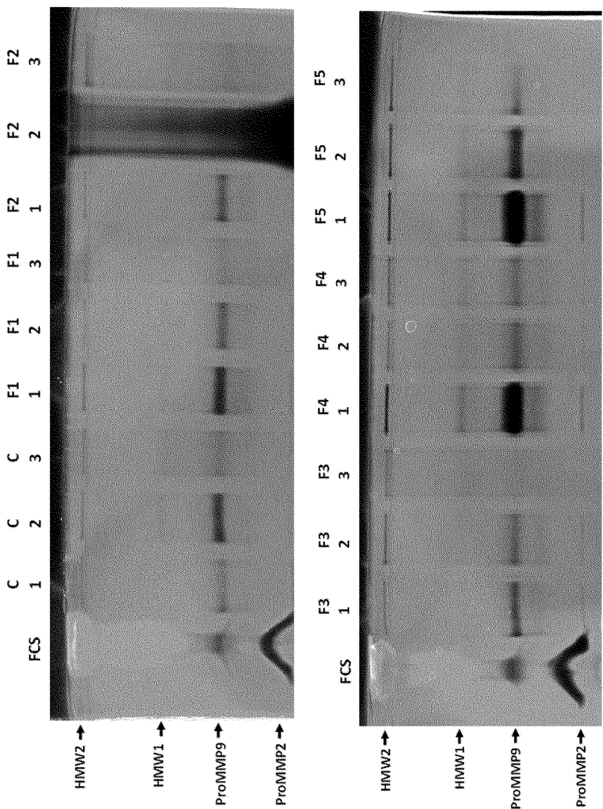
【図 14】



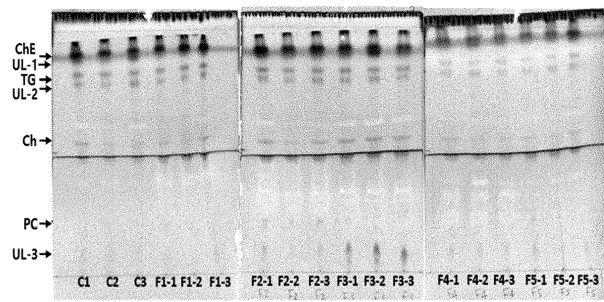
【図 15】



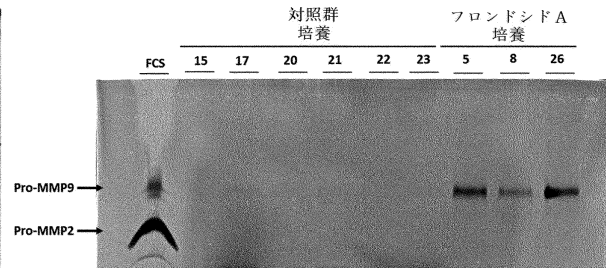
【図 16】



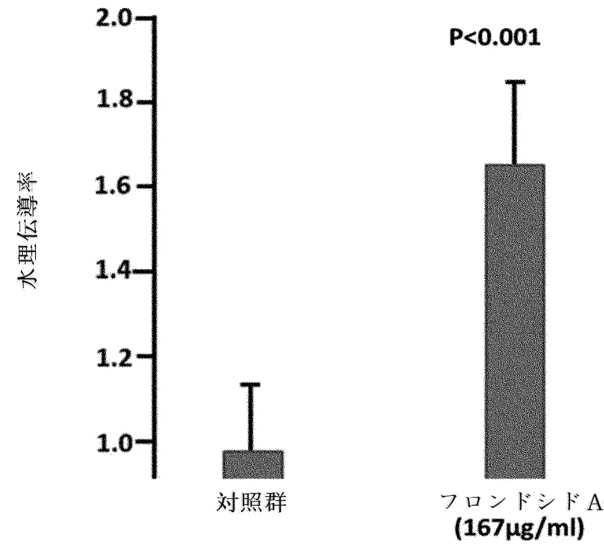
【図 17】



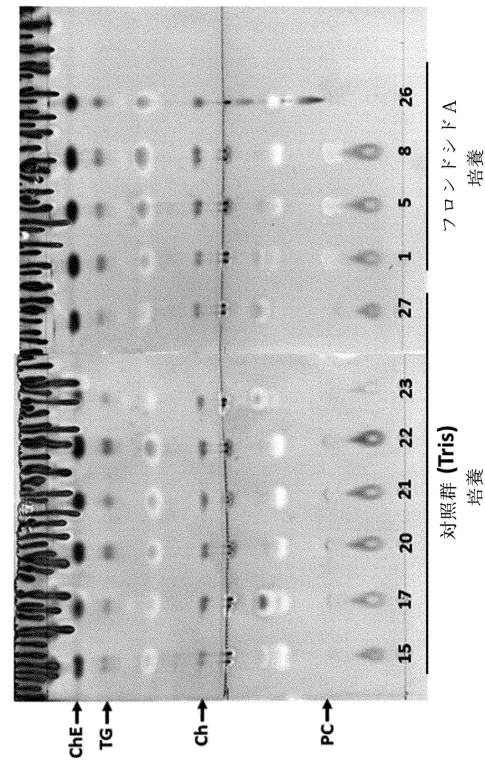
【図 19】



【図 18】



【図 20】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/047 (2006.01)		A 6 1 K 31/047
A 6 1 K 33/00 (2006.01)		A 6 1 K 33/00
A 6 1 K 31/122 (2006.01)		A 6 1 K 31/122
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00
A 2 3 L 33/10 (2016.01)		A 2 3 L 33/10

(72)発明者 フセイン, アリ
イギリス国、グレーター・ロンドン エスダブリュ4 7アールエル、ロンドン、ファーンデール
・ロード、101

(72)発明者 キム, デボング
大韓民国、05501、ソウル、ソンパグ、オリムピクロ、99、(チャムシル・エルエス、チャ
ムシルドン) #166-1302

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 中国特許出願公開第1318388(CN, A)
中国特許出願公開第106109499(CN, A)
中国特許出願公開第103271934(CN, A)
中国特許出願公開第104491476(CN, A)
国際公開第2000/029009(WO, A1)
Progress in Retinal and Eye Research, 2010年, Vol.29, pp.1-18

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 35/
A 2 3 L 33/
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPI
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)