

(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3月24日(24.03.2022)



(10) 国際公開番号
WO 2022/059775 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/7034 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 31/665 (2006.01) *A61P 25/14* (2006.01)
A61K 31/7032 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01)

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).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/034285

添付公開書類:

(22) 国際出願日: 2021年9月17日(17.09.2021)

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(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 2020-156459 2020年9月17日(17.09.2020) JP

(71) 出願人: 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K.K.) [JP/JP]; 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目13番9号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中上 夕子 (NAKAGAMI Yuko); 〒1058518 東京都港区芝大門一丁目13番9号 昭和電工株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 及川 周, 外 (OIKAWA Shu 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, 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,

(54) Title: AUTOPHAGY ACTIVATOR

(54) 発明の名称: オートファジー活性化剤

(57) Abstract: An autophagy activator that comprises methyl hesperidin as an active ingredient, and a composition for autophagy activation that comprises the aforesaid autophagy activator and a pharmaceutically acceptable carrier.

(57) 要約: メチルヘスペリジンを有効成分として含有する、オートファジー活性化剤、及び当該オートファジー活性化剤と薬学的に許容される担体とを含有する、オートファジー活性化用組成物。



WO 2022/059775 A1

明 細 書

発明の名称：オートファジー活性化剤

技術分野

[0001] 本発明は、オートファジー活性化剤およびオートファジー活性化用組成物に関する。

本願は、2020年9月17日に、日本に出願された特願2020-156459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] オートファジー (autophagy) は、飢餓、成長因子欠乏、および病原体感染などの細胞外もしくは細胞内のストレスおよびシグナルに応答し、老朽化もしくは損傷した細胞内物質およびオルガネラを分解することで、エネルギーの再生産および損傷物質の除去をするメカニズムであり、正常な細胞の恒常性維持に重要である。過去の研究から、老化が進むほど細胞内のオートファジー活性が急激に減少すると報告されている（非特許文献1）。また、オートファジーを抑制した場合、細胞内に老朽ミトコンドリアや誤って折りたたまれたタンパク質などが過剰に蓄積し、細胞内の酸化ストレスが増加することで細胞死が誘導され、結果として細胞が老化することになる。

したがって、細胞内の老化した物質およびオルガネラを分解し、その分解産物をリサイクルするオートファジーを活性化することで、細胞内の不要物をすみやかに除去することで細胞の恒常性を高めることができる。

[0003] 一方、老化がオートファジーに及ぼす影響として、ヒトの脳では加齢とともにATG5、ATG7、およびBecn1遺伝子の発現量が低下することが知られている。また、アルツハイマー病等の神経変性疾患では、オートファジーの活性低下が認められるとされる。そのため、オートファジーの活性化はアルツハイマー病をはじめ、ハンチントン病、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療および予防に寄与することが知られている（非特許文献2、3）。特にアルツハイマー病ではオートファジーの機能が阻害され

ているため、アミロイドβと呼ばれる凝集タンパク質が生体内に蓄積され、これが発症に関わっているといわれている（非特許文献4）。また、脳の黒質および淡蒼球における鉄の沈着と大脳の萎縮をともなう神経変性疾患であるSENDA病（SENDA:static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood）、消化管に重篤な炎症あるいは潰瘍をひき起こす炎症性腸疾患であるクローン病、およびがんについても、オートファジー関連遺伝子や選択的オートファジーに関与する遺伝子の変異が影響するといわれている（非特許文献5）。

[0004] オートファジーの過程は、酵母および哺乳類の両方で研究されており、最大で36のタンパク質が利用されている。なかでもオートファゴソームの形成からその内容物の分化までは、オートファジー関連遺伝子（ATG）にコードされるAtgタンパク質により制御されており、Atg12-Atg5結合系、LC3-Phosphatidyl Ethanolamine（PE）結合系を含む6つのグループに分類することができ、それぞれが各過程で段階的に作用している。

[0005] 一方で、オートファジーは、定常状態では低いレベルに抑えられているが、飢餓などストレス下では活性化される。mTOR（mammalian target of rapamycin）は酵母から哺乳類にわたるオートファジーの主要な抑制因子として働いているが、飢餓条件下ではmTORが不活性化されオートファジーが誘導されることが知られている（非特許文献6）。

[0006] オートファジー活性化剤としては、オートファジーの活性状態のマーカであるLC3関連の因子を増やしオートファジーを活性化する化合物、および、オートファジーフラックス（オートファゴソームのリソソームへの融合を含む）を促進する化合物が報告されている（特許文献1～4）。

また、柑橘類より抽出されるポリフェノールの一種であるヘスペリジンはオートファジーを活性化する作用があることが知られている（非特許文献7）。

)。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2018/173653号

特許文献2：特開2018-80204号公報

特許文献3：特表2018-510902号公報

特許文献4：特表2019-529514号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Yogendra S. Rajawat et al., Aging: Central role for autophagy and the lysosomal degradative system. *Ageing Research Reviews* 8 (2009) 199-213.

非特許文献2：Aaron Barnett et al., Autophagy in Aging and Alzheimer's Disease: Pathologic or Protective?. *J Alzheimers Dis.* 2011; 25(3): 385-394.

非特許文献3：Marta M. Lipinski et al., Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107, 14164-14169.

非特許文献4：Xiangqing Li et al., Cubeben induces autophagy via PI3K-AKT-mTOR pathway to protect primary neurons against amyloid beta in Alzheimer's disease. *Cytotechnology* (2019) 71: 679-686.

非特許文献5：蔭山ら、「オートファジーと疾患」、領域融合レビュー、2014年、3、e006

非特許文献6：猪俣ら、「オートファジーと老化の関連性」、*岐歯学誌*、2018年、第45巻、第1号、1-7

非特許文献7：Gowrikumar Saiprasad et al., Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental c

olon carcinogenesis. European Journal of Cancer (2014) 50, 2489-2507.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記のように、アルツハイマー病等の様々な疾患においてオートファジー機能が低下することが知られており、オートファジーを効果的に活性化することのできる薬剤が求められている。しかしながら、従来知られている薬剤では、その効果はまだ不十分といえる。

[0010] そこで、本発明は、オートファジーを効果的に活性化することができる、オートファジー活性化剤、および前記オートファジー活性化剤を含有するオートファジー活性化用組成物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

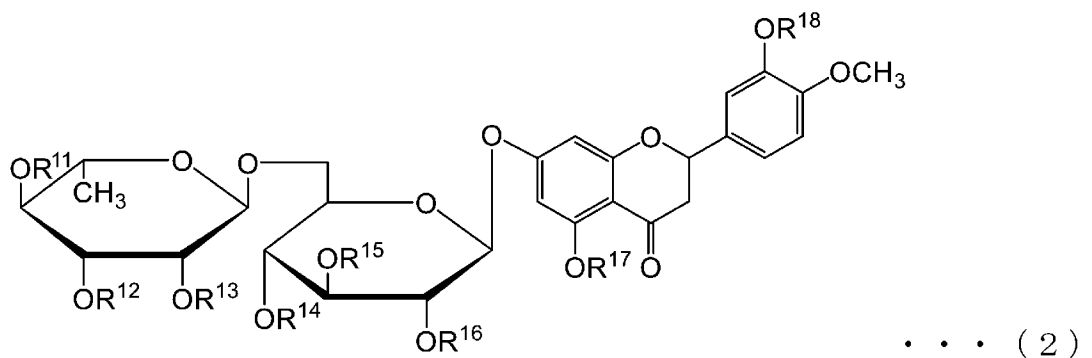
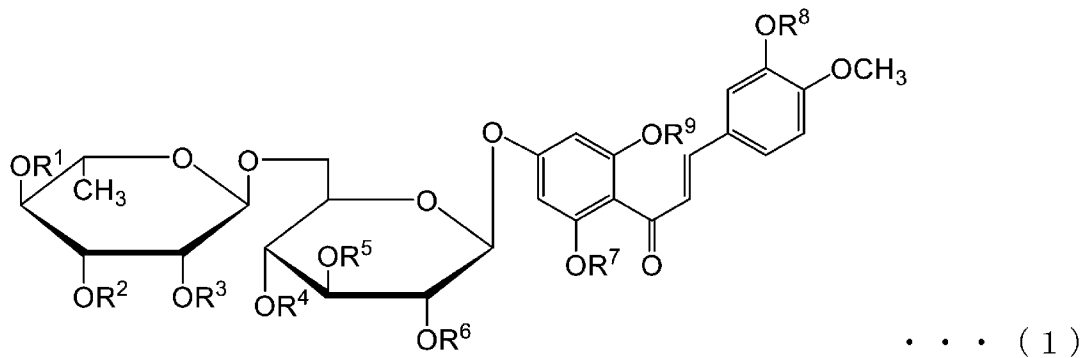
[0011] 本発明は以下の態様を含む。

[1] メチルヘスペリジンを有効成分として含有する、オートファジー活性化剤。

[2] 前記メチルヘスペリジンが、下記一般式(1)で表されるカルコン体メチルヘスペリジン、及び下記一般式(2)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンからなる群より選択される1種以上である、[1]に記載のオートファジー活性化剤。

[0012]

[化1]



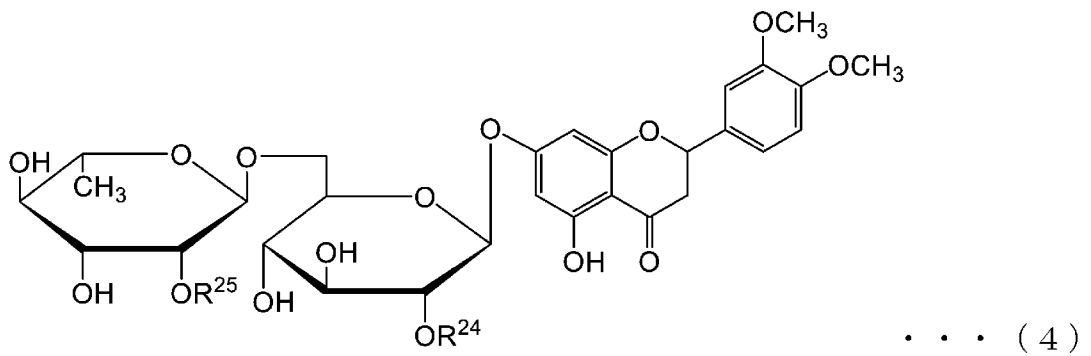
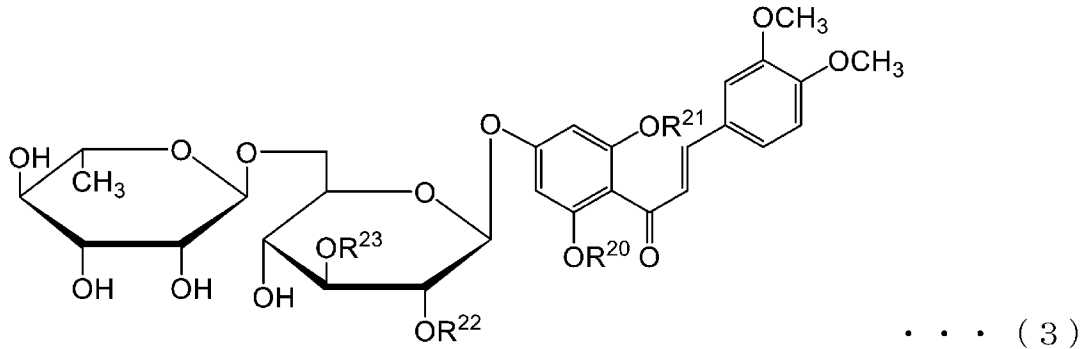
[式(1)中、 $R^1 \sim R^9$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。ただし、 $R^1 \sim R^9$ のうち、少なくとも1つはメチル基である。

式(2)中、 $R^{11} \sim R^{18}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。ただし、 $R^{11} \sim R^{18}$ のうち、少なくとも1つはメチル基である。]

[3] 前記メチルヘスペリジンが、下記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジン、及び下記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンからなる群より選択される1種以上である、[2]に記載のオートファジー活性化剤。

[0013]

[化2]



[式(3)中、 $R^{20} \sim R^{23}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。

式(4)中、 $R^{24} \sim R^{25}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。]

[4] 前記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジンが、下記表1に示される $R^{20} \sim R^{23}$ の組み合わせを有するカルコン体-1~3からなる群より選択される1種以上である、[3]に記載のオートファジー活性化剤。

[0014] [表1]

	R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
カルコン体-1	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
カルコン体-2	H	CH ₃	CH ₃	H
カルコン体-3	H	CH ₃	H	H

[5] 前記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンが、下記表2に示される $R^{24} \sim R^{25}$ の組み合わせを有するフラバノン体-1~4か

らなる群より選択される1種以上である、[3]又は[4]に記載のオートファジー活性化剤。

[0015] [表2]

	R ²⁴	R ²⁵
フラバノン体-1	CH ₃	CH ₃
フラバノン体-2	CH ₃	H
フラバノン体-3	H	H
フラバノン体-4	H	CH ₃

[6] LC3遺伝子の発現を促進する、[1]～[5]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化剤。

[7] ATG5遺伝子の発現を促進する、[1]～[6]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化剤。

[8] ATG7遺伝子の発現を促進する、[1]～[7]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化剤。

[9] mTOR遺伝子の発現を抑制する、[1]～[8]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化剤。

[10] アルツハイマー病の予防又は治療に用いる、[1]～[9]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化剤。

[11] [1]～[10]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化剤及び薬学的に許容される担体を含有する、オートファジー活性化用組成物。

[12] 前記メチルヘスペリジンの合計含有量が、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.01～2質量%である、[11]に記載のオートファジー活性化用組成物。

[13] ビタミンC誘導体、及びビタミンE誘導体からなる群より選択される少なくとも1種のビタミン誘導体又はその塩をさらに含有する、[11]又は[12]に記載のオートファジー活性化用組成物。

[14] 前記ビタミン誘導体又はその塩が、リン酸アスコルビル、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル、トコフェロールリン酸エステル、及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種である、[13]に記載のオ

オートファジー活性化用組成物。

[15] イノシトールに糖が結合したイノシトール誘導体をさらに含有する、[11]～[14]のいずれか1つに記載のオートファジー活性化用組成物。

[16] 前記糖が、グルコース又はグルコースを構成単位として含むオリゴ糖である、[15]に記載のオートファジー活性化用組成物。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、オートファジーを効果的に活性化することができる、オートファジー活性化剤、および前記オートファジー活性化剤を含有するオートファジー活性化用組成物を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0017] (オートファジー活性化剤)

一実施形態において、本発明は、メチルヘスペリジンをも有効成分として含有する、オートファジー活性化剤を提供する。

ここで「オートファジー (autophagy)」とは、老朽または損傷した細胞内物質およびオルガネラを分解することで、エネルギーの再生産および損傷物質の除去をするメカニズムである。

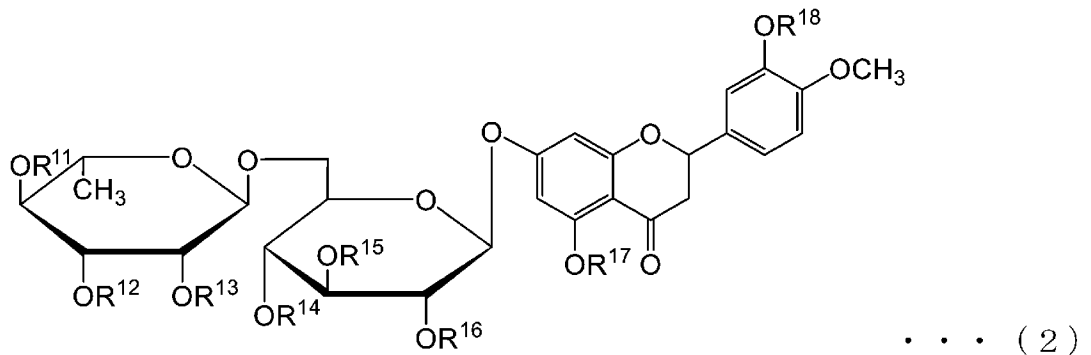
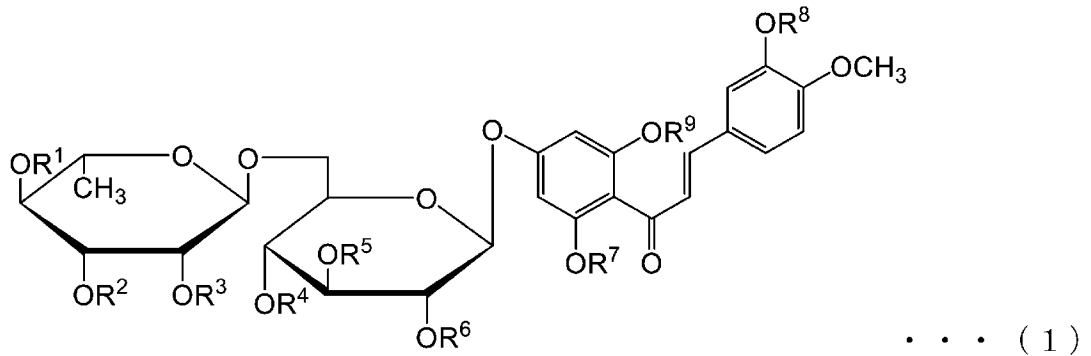
本実施形態のオートファジー活性化剤は、オートファジーマーカーであるLC3遺伝子、ならびにオートファゴソームに含まれるATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現を促進することができ、オートファジーを活性化させることができる。また、オートファジーの抑制因子として働くmTOR遺伝子の発現を抑制することで、オートファジーを活性化させることができる。

[0018] <メチルヘスペリジン>

本実施形態のオートファジー活性化剤は、メチルヘスペリジンをも有効成分として含むものであれば特に限定されない。本実施形態のオートファジー活性化剤に用いられるメチルヘスペリジンとしては、ヘスペリジンをもメチル化し、水に可溶化したものが好ましい。

[0019] メチルヘスペリジンには、主に、下記一般式（１）で表されるカルコン型化合物（カルコン体メチルヘスペリジン）と、下記一般式（２）で表されるフラバノン型化合物（フラバノン体メチルヘスペリジン）があることが知られている。

[0020] [化3]



[式（１）中、 $R^1 \sim R^9$ は、それぞれ独立に、メチル基又は水素原子である。ただし、 $R^1 \sim R^9$ のうち、少なくとも１つはメチル基である。

式（２）中、 $R^{11} \sim R^{18}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。ただし、 $R^{11} \sim R^{18}$ のうち、少なくとも１つはメチル基である。]

[0021] 本実施形態のオートファジー活性化剤に用いられるメチルヘスペリジンは、前記一般式（１）で表されるカルコン体メチルヘスペリジン、及び前記一般式（２）で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンからなる群より選択される１種以上であることが好ましい。

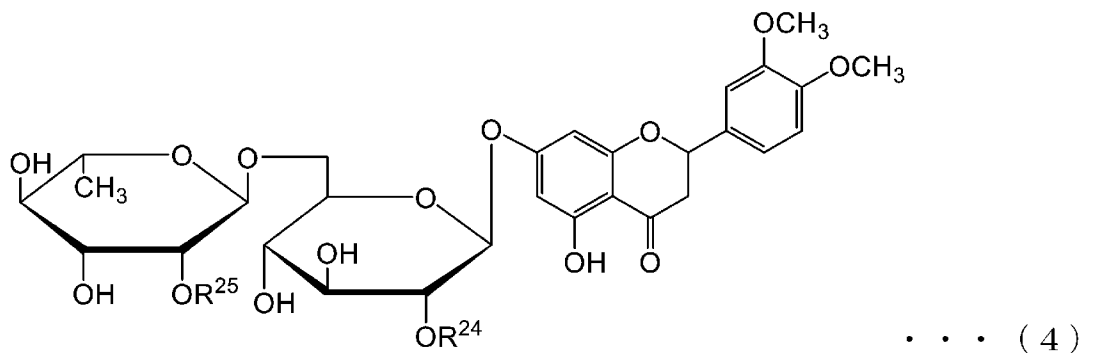
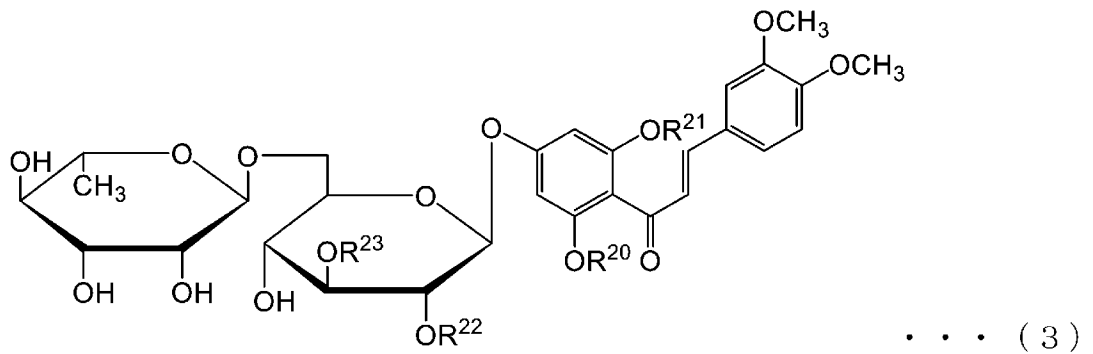
[0022] 前記一般式（１）中、 $R^1 \sim R^9$ は、それぞれ独立に、メチル基又は水素原子であり、 $R^1 \sim R^9$ のうち、少なくとも１つはメチル基である。 $R^1 \sim R^9$ のうち、いずれか１～６個がメチル基であることが好ましく、いずれか２～５

個がメチル基であることがより好ましい。

[0023] 前記一般式(2)中、 $R^{11} \sim R^{18}$ は、それぞれ独立に、メチル基又は水素原子であり、 $R^{11} \sim R^{18}$ のうち、少なくとも1つはメチル基である。 $R^{11} \sim R^{18}$ のうち、いずれか1~4個がメチル基であることが好ましく、いずれか1~3個がメチル基であることがより好ましい。

[0024] 前記一般式(1)で表される化合物の中でも、カルコン体メチルヘスペリジンとしては、下記一般式(3)で表される化合物が好ましい。前記一般式(2)で表される化合物の中でも、フラバノン体メチルヘスペリジンとしては、下記一般式(4)で表される化合物が好ましい。

[0025] [化4]



[式(3)中、 $R^{20} \sim R^{23}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。

式(4)中、 $R^{24} \sim R^{25}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。]

[0026] 前記一般式(3)中、 $R^{20} \sim R^{23}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。前記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジン

は、下記表3に示される $R^{20} \sim R^{23}$ の組み合わせを有するカルコン体-1～3からなる群より選択される1種以上であることが好ましい。

[0027] [表3]

	R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
カルコン体-1	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
カルコン体-2	H	CH ₃	CH ₃	H
カルコン体-3	H	CH ₃	H	H

[0028] 前記一般式(4)中、 $R^{24} \sim R^{25}$ は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。前記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンとしては、下記表4に示される $R^{24} \sim R^{25}$ の組み合わせを有するフラバノン体-1～4からなる群より選択される1種以上であることが好ましい。

[0029] [表4]

	R^{24}	R^{25}
フラバノン体-1	CH ₃	CH ₃
フラバノン体-2	CH ₃	H
フラバノン体-3	H	H
フラバノン体-4	H	CH ₃

[0030] 本実施形態のオートファジー活性化剤に用いられるメチルヘスペリジンは、1種単独であってもよいし、2種以上の混合物であってもよい。メチルヘスペリジンは、前記一般式(1)で表されるカルコン体メチルヘスペリジンまたは前記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジンと、前記一般式(2)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンまたは前記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンとの、両方を含むものでもよいし、片方のみを含むものでもよい。メチルヘスペリジンは、前記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジン、及び前記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンを含むものであってもよい。また、メチルヘスペリジンは、前記カルコン体-1～3のいずれか1種以上を含むものであってもよく、前記フラバノン体-1～4のいずれか1種以上を含むものであってもよい。

また、本実施形態のオートファジー活性化剤は、メチルヘスペリジンとし

て、カルコン体-1~3およびフラバノン体-1~3の混合物を含むものであってもよい。

[0031] メチルヘスペリジンは、公知の方法により製造することができる。メチルヘスペリジンは、例えば、柑橘類の果皮などから製造されたヘスペリジンの水酸化ナトリウム水溶液に溶かし、そのアルカリ溶液に対応量のジメチル硫酸を作用させ、反応液を硫酸で中和し、*n*-ブチルアルコールで抽出し、溶媒を留去したのち、イソプロピルアルコールで再結晶することにより製造できる（崎浴，日本化学雑誌，（1958）Vol. 79, pp. 733-736；特許6312333号公報）。メチルヘスペリジンの製造方法は、上記方法に限定されない。

[0032] メチルヘスペリジンは、市販品（例えば、医薬品添加物、食品添加物、および化粧品原料として流通しているもの、または、「メチルヘスペリジン」（昭和電工株式会社）、「メチルヘスペリジン」（東京化成工業社）、「ヘスペリジンメチルカルコン」（Sigma社）等）を購入して使用することもできる。

[0033] 本実施形態のオートファジー活性化剤は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病などの神経変性疾患の治療の目的で、それ自体を患者に投与して使用することができる。また、本実施形態のオートファジー活性化剤は、オートファジーを活性化する目的で、医薬品や化粧品に配合して使用することもできる。また、後述するオートファジー活性化用組成物に配合して使用してもよい。

[0034] 本実施形態のオートファジー活性化剤は、LC3遺伝子の発現を促進することで、オートファジーを効果的に活性化することができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、ATG5遺伝子の発現を促進することで、オートファジーを効果的に活性化することができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、ATG7遺伝子の発現を促進することで、オートファジーを効果的に活性化することができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、mTOR遺伝子の発現を抑制す

ることで、オートファジーを効果的に活性化することができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、オートファジーを効果的に活性化することができるので、アルツハイマー病の予防または治療に用いることができる。

[0035] アミロイド β は、神経細胞におけるオートファジーの低下を引き起こすことが知られている。また、アミロイド β は、オートファジーの低下とそれによる神経細胞のアポトーシスと呼ばれる細胞死を誘引することが知られている。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、アミロイド β 存在下でのLC3遺伝子発現を促進させることができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、アミロイド β 存在下でのATG5遺伝子発現を促進させることができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、アミロイド β 存在下でのATG7遺伝子発現を促進させることができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、アミロイド β 存在下でのアポトーシスを抑制することができる。

本実施形態のオートファジー活性化剤は、特に神経細胞において、アミロイド β 存在下でのLC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子からなる群より選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を促進させることができる。また、本実施形態のオートファジー活性化剤は、特に神経細胞において、アミロイド β 存在下でのアポトーシスを抑制することができる。

[0036] アミロイド β 存在下でLC3遺伝子発現を促進させるとは、アミロイド β 存在下において、本実施形態のオートファジー活性化剤を投与することにより、前記オートファジー活性化剤を投与しなかった場合と比較して、LC3遺伝子の発現量が上昇することを意味する。ATG5遺伝子、およびATG7遺伝子についても同様である。

アミロイド β 存在下でアポトーシスを抑制するとは、アミロイド β 存在下において、本実施形態のオートファジー活性化剤を投与することにより、前

記オートファジー活性化剤を投与しなかった場合と比較して、アポトーシスが抑制されることを意味する。

[0037] LC3 (microtubule associated protein 1 light chain 3 alpha:NCBI Gene ID:84557) は、オートファジーのシグナル伝達上流でホスファチジルエタノールアミンを付加され、オートファゴソーム膜に誘引されるLC3-I-IIへと変換され、オートファゴソーム膜に結合する。LC3は、オートファゴソームのマーカーとして用いられる。ヒトLC3遺伝子の塩基配列としては、例えば、NCBI Reference Sequenceデータベースに登録されているNM_032514.4、及びNM_181509.3等が挙げられる。

[0038] ATG5 (autophagy related 5:NCBI Gene ID:9474) は、ATG12と結合して、ユビキチン様共役系でE1様活性化酵素として機能する。ヒトATG5遺伝子の塩基配列としては、例えば、NCBI Reference Sequenceデータベースに登録されているNM_001286106.1、NM_001286107.1、NM_001286108.1、NM_001286111.1、及びNM_004849.4等が挙げられる。

[0039] ATG7 (autophagy related 7:NCBI Gene ID:10533) は、ATP依存的にLC3及びATG12を活性化するE1様活性化酵素として機能する。ヒトATG7遺伝子の塩基配列としては、例えば、NCBI Reference Sequenceデータベースに登録されているNM_001136031.3、NM_001144912.2、NM_001349232.2、NM_001349233.2、NM_001349234.2等が挙げられる。

[0040] mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase:NCBI Gene ID:2475) は、ホスファチジルイノシトールキナーゼ関連キナーゼの1種であり、DNA損傷及び

栄養欠乏などのストレスに対する細胞応答を媒介する。mTORは、オートファジーの抑制因子として機能する。ヒトmTOR遺伝子の塩基配列としては、例えば、NCBI Reference Sequenceデータベースに登録されているNM_004958.4等が挙げられる。

[0041] 本実施形態のオートファジー活性化剤は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病等の神経変性疾患の発症リスクが高い患者に投与し、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病などの神経変性疾患を予防するために使用してもよい。また、本実施形態のオートファジー活性化剤は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病などの神経変性疾患を発症した患者に投与し、神経変性疾患の進行や悪化を抑制するために使用してもよい。

[0042] 本実施形態のオートファジー活性化剤は、後述するオートファジー活性化用組成物と同様の方法で患者に投与することができ、経口的に投与してもよく、非経口的に投与してもよく、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、腹腔内等に投与してもよく、坐剤として直腸内投与してもよく、皮膚外用剤として皮膚に投与してもよい。

[0043] (オートファジー活性化用組成物)

本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、上述したメチルヘスペリジンを含むオートファジー活性化剤と、薬学的に許容される担体とを含む。

[0044] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、常法（例えば、日本薬局方記載の方法）に従って、上述したオートファジー活性化剤、薬学的に許容される担体、および場合によっては他の成分を混合して製剤化することにより製造することができる。

[0045] 本明細書において、「薬学的に許容される担体」とは、有効成分の生理活性を阻害せず、かつ、その投与対象に対して実質的な毒性を示さない担体を意味する。

なお、「実質的な毒性を示さない」とは、その成分が通常使用される投与

量において、投与対象に対して毒性を示さないことを意味する。

薬学的に許容される担体としては、特に制限されず、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、希釈剤、注射剤用溶剤、保湿剤、感触向上剤、界面活性剤、高分子・増粘・ゲル化剤、溶剤、噴射剤、酸化防止剤、還元剤、酸化剤、キレート剤、酸、アルカリ、粉体、無機塩、水、金属含有化合物、不飽和単量体、多価アルコール、高分子添加剤、湿潤剤、増粘剤、粘着付与物質、油性原料、液状マトリックス、脂溶性物質、高分子カルボン酸塩等を挙げることができる。

[0046] これらの成分の具体例としては、例えば、国際公開公報第2016/076310号に記載のもの等が挙げられる。さらに、高分子・増粘・ゲル化剤の具体例としては、メタクロイルオキシエチルホスホリルコリン、メタクリル酸ブチルまたはこれらの重合体等が挙げられる。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物における薬学的に許容される担体は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0047] また、他の成分としては、特に制限されず、防腐剤、抗菌剤、紫外線吸収剤、美白剤、メチルヘスペリジン以外のビタミン類及びその誘導体類、消炎剤、抗炎症剤、育毛用薬剤、血行促進剤、刺激剤、ホルモン類、抗しわ剤、抗老化剤、ひきしめ剤、冷感剤、温感剤、創傷治癒促進剤、刺激緩和剤、鎮痛剤、細胞賦活剤、植物・動物・微生物エキス、種子油、鎮痒剤、角質剥離・溶解剤、制汗剤、清涼剤、収れん剤、酵素、核酸、香料、色素、着色剤、染料、顔料、消炎鎮痛剤、抗真菌剤、抗ヒスタミン剤、催眠鎮静剤、精神安定剤、抗高血圧剤、降圧利尿剤、抗生物質、麻酔剤、抗菌性物質、抗てんかん剤、冠血管拡張剤、生薬、止痒剤、角質軟化剥離剤、紫外線遮断剤、殺菌剤、抗酸化物質、pH調整剤、添加剤、金属セッケン等を挙げることができる。これらの成分の具体例としては、例えば、国際公開公報第2016/076310号に記載のもの等が挙げられる。さらに、植物・動物・微生物エキスの具体例としては、ラプサナコムニス花／葉／茎、チャ葉等が挙げられる。種子油の具体例としては、ワサビノキ種子油が挙げられる。香料の具体

例としては、ペリルアルデヒドが挙げられる。

他の成分は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0048] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、前記オートファジー活性化剤を治療的有効量含有することができる。「治療的有効量」とは、患者の疾患の治療又は予防のために有効な薬剤の量を意味する。治療的有効量は、投与対象の疾患の状態、年齢、性別、および体重等によって変動し得る。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、上記オートファジー活性化剤の治療的有効量は、メチルヘスペリジンが、オートファジーを活性化し得る量であり得る。また、上記オートファジー活性化剤の治療的有効量は、メチルヘスペリジンが、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子からなる群より選択される少なくとも1種の遺伝子の発現を促進し得る量であり得る。また、上記オートファジー活性化剤の治療的有効量は、メチルヘスペリジンが、mTOR遺伝子の発現を抑制し得る量であり得る。また、上記オートファジー活性化剤の治療的有効量は、メチルヘスペリジンが、アミロイド β の存在下で、アポトーシスを抑制し得る量であり得る。

[0049] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物における前記オートファジー活性化剤の治療的有効量（メチルヘスペリジンの合計含有量）は、オートファジー活性化用組成物全量に対して、例えば0.01～2質量%であってもよく、例えば0.05～1.5質量%であってもよく、例えば0.1～1.0質量%であってもよい。

なお、メチルヘスペリジンの合計含有量とは、1種のメチルヘスペリジンを単独で使用する場合にはその化合物の含有量を意味し、メチルヘスペリジンを2種以上組み合わせて用いる場合には、これらの化合物の合計の含有量を意味する。

[0050] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、前記オートファジー活性化剤に加えて、他のオートファジー活性化成分を含んでもよい。他のオートファジー活性化成分としては、例えば、ビタミンC誘導体およびビタミンE誘導体からなる群より選択される少なくとも1種のビタミン誘導体又は

その塩、並びにイノシトールに糖が結合したイノシトール誘導体が挙げられる。

[0051] <ビタミンC誘導体又はその塩>

本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、前記オートファジー活性化剤に加えて、ビタミンC誘導体又はその塩を含有することが好ましい。ビタミンC誘導体又はその塩を含有することにより、オートファジーの活性化作用がより向上する。

[0052] ビタミンC誘導体としては、アスコルビン酸の少なくとも1つの水酸基を誘導化したアスコルビン酸誘導体が挙げられる。

前記アスコルビン酸誘導体として、より具体的には、アスコルビン酸の水酸基のいずれかをリン酸エステル化させたリン酸アスコルビル（アスコルビン酸リン酸エステルともいう）；アスコルビン酸の水酸基のいずれかをリン酸エステル化し、他の水酸基を脂肪酸によりエステル化させたリン酸アスコルビルの脂肪酸エステル；アスコルビン酸の水酸基のいずれかをエトキシ化させたエチルアスコルビン酸；アスコルビン酸の水酸基のいずれかをグルコシド化させたアスコルビン酸グルコシド；アスコルビン酸の水酸基のいずれかをアシル化させたアシル化アスコルビン酸；アスコルビン酸の水酸基のいずれかをアシル化し、他の水酸基をリン酸エステル化させたアシル化リン酸アスコルビル；アスコルビン酸の水酸基のいずれかをグリセリンで置換したグリセリルアスコルビン酸；リン酸を介してアスコルビン酸とトコフェロールとがそれぞれエステル結合で結合したアスコルビン酸とトコフェロールのリン酸ジエステル（具体的には、 $d\text{-}\alpha\text{-トコフェロール}2\text{-}\text{L}\text{-アスコルビン酸リン酸ジエステル}$ など）等が挙げられる。

[0053] アスコルビン酸誘導体の塩としては、例えば、アスコルビン酸誘導体と無機塩基との塩、アスコルビン酸誘導体と有機塩基との塩等が挙げられる。

無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；亜鉛塩等が挙げられる。

有機塩基との塩としては、例えば、アルキルアンモニウム塩、塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0054] アスコルビン酸誘導体又はその塩としては、上記の中でも、(i) リン酸アスコルビル又はその塩、(ii) リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩、(iii) エチルアスコルビン酸又はその塩、(iv) アスコルビン酸グルコシド又はその塩が好ましく、(i) リン酸アスコルビル又はその塩、(ii) リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩がより好ましい。

[0055] ≪(i) リン酸アスコルビル又はその塩≫

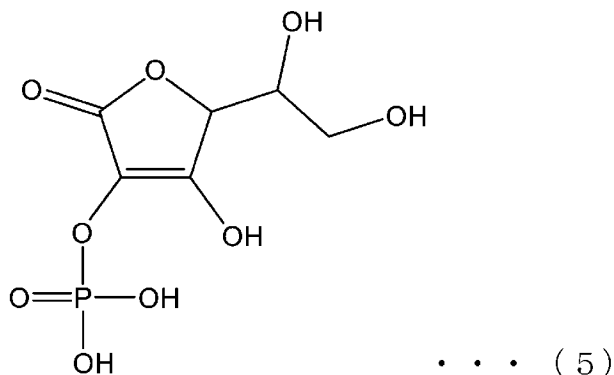
・リン酸アスコルビル

リン酸アスコルビルは、アスコルビン酸の少なくとも1つの水酸基にリン酸基が導入された化合物である。

リン酸アスコルビルとしては、下記化学式(5)で表される化合物が好適に挙げられる。

下記化学式(5)で表される化合物は、アスコルビン酸の2位の水酸基をリン酸エステルによって保護した、アスコルビン酸-2-リン酸エステルである。

[0056] [化5]



[0057] リン酸アスコルビルには、D体およびL体の立体異性体、ならびにラセミ体のDL体が存在する。本実施形態におけるリン酸アスコルビルは、これらの立体異性体のいずれであってもよいが、入手容易性の観点から、L体であ

ることが好ましく、具体的には、L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルが好ましい。

[0058] ・リン酸アスコルビルの塩

リン酸アスコルビルの塩としては、例えば、リン酸アスコルビルと無機塩基との塩、リン酸アスコルビルと有機塩基との塩等が挙げられる。

[0059] 無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；亜鉛塩等が挙げられる。

有機塩基との塩としては、例えば、アルキルアンモニウム塩、塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0060] リン酸アスコルビルの塩としては、上記の中でも、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩が好ましく、ナトリウム塩またはマグネシウム塩がより好ましく、マグネシウム塩がさらに好ましい。

リン酸アスコルビルのマグネシウム塩は、安定性が高く、かつ、着色されにくいという観点から好ましい。

[0061] リン酸アスコルビル又はその塩としては、上記の中でも、安定性向上の観点から、リン酸アスコルビルの塩であることが好ましく、上記化学式(5)で表される化合物のアルカリ金属塩、または、上記化学式(5)で表される化合物のアルカリ土類金属塩がより好ましく、上記化学式(5)で表される化合物のナトリウム塩、または、上記化学式(5)で表される化合物のマグネシウム塩がさらに好ましい。

上記化学式(5)で表される化合物のマグネシウム塩は、具体的には、L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルのマグネシウム塩が特に好ましい。

上記化学式(5)で表される化合物のナトリウム塩は、具体的には、L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルのナトリウム塩が特に好ましい。

[0062] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、リン酸アスコルビル又はその塩は、1種単独で用いてもよく、2種以上を併用して用いてもよい。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物がリン酸アスコルビル又はその塩を含有する場合、その含有量は、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.1～15質量%であることが好ましく、0.5～10質量%であることがより好ましく、1～5質量%であることがさらに好ましい。

[0063] リン酸アスコルビル又はその塩は、公知の製造方法、例えば、特開平2-279690、特開平6-345786に記載の方法等により製造することができる。

例えば、リン酸アスコルビルの具体的な製造方法としては、アスコルビン酸と、オキシ塩化リン等とを反応させて、ホスホリル化することにより得ることができる。

また、リン酸アスコルビルの塩の具体的な製造方法としては、リン酸アスコルビル溶液を、酸化マグネシウム等の金属酸化物、または、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物等で中和することにより、リン酸アスコルビルの塩を得ることができる。

[0064] リン酸アスコルビルの塩の市販品の例としては、昭和電工社製のアスコルビン酸P S（化合物名；L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルのナトリウム塩（L-アスコルビン酸-2-リン酸ナトリウムともいう）、表示名称；アスコルビルリン酸N a）、昭和電工社製のアスコルビン酸P M（化合物名；L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルのマグネシウム塩（L-アスコルビン酸-2-リン酸マグネシウムともいう）、表示名称；リン酸アスコルビルM g）等が挙げられる。

[0065] ≪（i i）リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩≫

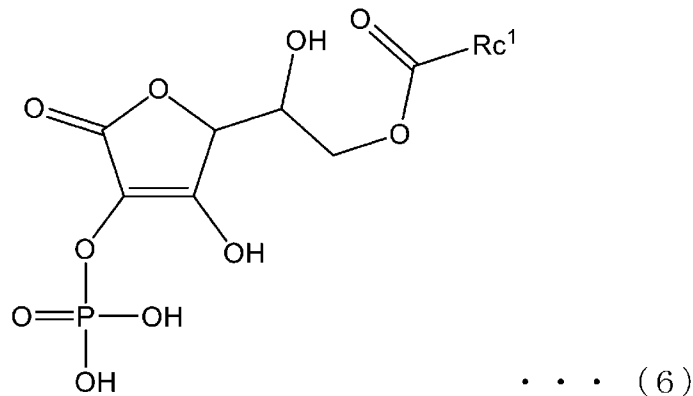
・リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル

リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルは、リン酸アスコルビルの少なくとも1つの水酸基に脂肪酸がエステル結合した化合物である。該脂肪酸としては、炭素原子数6～22の直鎖状又は分岐鎖状の脂肪酸（すなわち、カルボキシ基に結合する直鎖状または分岐鎖状のアルキル基の炭素原子数が5～21の脂肪酸）であることが好ましく、炭素原子数10～20の直鎖状または

分岐鎖状の脂肪酸であることがより好ましく、炭素原子数 12～18 の直鎖状または分岐鎖状の脂肪酸であることがさらに好ましい。

リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルとしては、下記一般式 (6) で表される化合物が挙げられる。下記一般式 (6) で表される化合物は、アスコルビン酸の 2 位の水酸基にリン酸がエステル結合し、6 位の水酸基に脂肪酸がエステル結合した、アスコルビン酸-2-リン酸-6-脂肪酸である。

[0066] [化6]



[式中、Rc¹は炭素原子数5～21の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基である。]

[0067] 上記一般式 (6) 中、Rc¹は炭素原子数5～21の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基である。具体的には、直鎖状又は分岐鎖状のペンチル基、直鎖状又は分岐鎖状のヘキシル基、直鎖状又は分岐鎖状のヘプチル基、直鎖状又は分岐鎖状のオクチル基、直鎖状又は分岐鎖状のノニル基、直鎖状又は分岐鎖状のデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のウンデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のドデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のトリデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のテトラデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のペンタデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のヘキサデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のヘプタデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のオクタデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のノナデシル基、直鎖状又は分岐鎖状のイコシル基、直鎖状又は分岐鎖状のヘンイコシル基が挙げられる。

[0068] 上記一般式 (6) 中、Rc¹は、上記の中でも、炭素原子数9～19の直鎖

状または分岐鎖状のアルキル基であることが好ましく、炭素原子数 11～17 の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基であることがより好ましく、炭素原子数 13～15 の直鎖状または分岐鎖状のアルキル基であることがさらに好ましく、原料入手性などの観点から、炭素原子数 15 の直鎖状のアルキル基（直鎖状のペンタデシル基）であることが特に好ましい。

すなわち、上記一般式（6）で表される化合物としては、6-*O*-パルミトイルアスコルビン酸-2-リン酸エステル（アスコルビン酸-2-リン酸-6-パルミチン酸ともいう）が特に好ましい。

[0069] リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルには、D体およびL体の立体異性体、ならびにラセミ体のDL体が存在する。本実施形態におけるリン酸アスコルビルの脂肪酸エステルは、これらの立体異性体のいずれであってもよいが、入手容易性の観点から、L体であることが好ましく、具体的には、L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルの脂肪酸エステルが好ましい。

[0070] ・リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルの塩

リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルの塩としては、例えば、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルと無機塩基との塩、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルと有機塩基との塩等が挙げられる。

[0071] 無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；亜鉛塩等が挙げられる。

有機塩基との塩としては、例えば、アルキルアンモニウム塩、塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0072] リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルの塩としては、上記の中でも、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩が好ましく、ナトリウム塩またはマグネシウム塩がより好ましく、ナトリウム塩がさらに好ましい。

リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルのナトリウム塩は、安定性及び製剤への配合容易性の観点から好ましい。

[0073] リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩としては、上記の中でも

、安定性及び製剤への配合容易性の観点からリン酸アスコルビルの脂肪酸エステル塩であることが好ましく、上記一般式(6)で表される化合物のアルカリ金属塩、または、上記一般式(6)で表される化合物のアルカリ土類金属塩がより好ましく、上記一般式(6)で表される化合物のナトリウム塩、または、上記一般式(6)で表される化合物のマグネシウム塩がさらに好ましく、上記一般式(6)で表される化合物のナトリウム塩、具体的には、L-アスコルビン酸-2-リン酸-6-パルミチン酸のナトリウム塩が特に好ましい。

[0074] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩は、1種単独で用いてもよく、2種以上を併用して用いてもよい。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物がリン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩を含有する場合、その含有量は、0.05~12質量%であることが好ましく、0.05~5質量%であることがより好ましく、0.1~2質量%であることがさらに好ましい。

[0075] リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩は、公知の製造方法、例えば、特許6265550に記載の方法等により製造することができる。

例えば、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステルの具体的な製造方法としては、上述したリン酸アスコルビルの製造方法と同様の方法でリン酸アスコルビルを製造した後、該リン酸アスコルビルと、脂肪酸またはそのエステルとを縮合反応させることにより得ることができる。

また、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル塩の具体的な製造方法としては、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル溶液を、酸化マグネシウム等の金属酸化物、または、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物等で中和することにより、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル塩を得ることができる。

[0076] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物におけるリン酸アスコルビルの脂肪酸エステル塩の市販品の例としては、昭和電工社製のアプレシエ(登録商標)(APPS)(化合物名; L-アスコルビン酸-2-リン酸-6

ーパルミチン酸のナトリウム塩（L-6-O-パルミトイルアスコルビン酸-2-リン酸エステル）のナトリウム塩ともいう）、表示名称；パルミチン酸アスコルビルリン酸3Na）等が挙げられる。

[0077] 《(iii) エチルアスコルビン酸又はその塩》

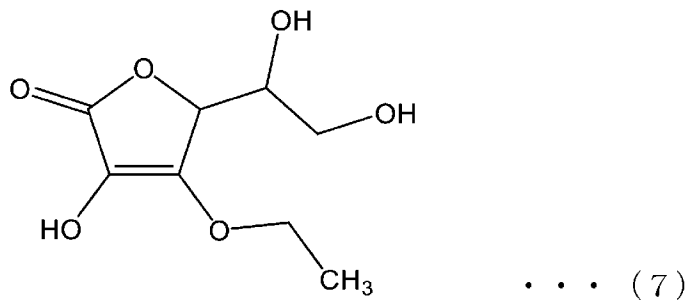
・エチルアスコルビン酸

エチルアスコルビン酸は、アスコルビン酸の少なくとも1つの水酸基にエチル基が導入された化合物である。

エチルアスコルビン酸としては、下記化学式(7)で表される化合物が好適に挙げられる。

下記化学式(7)で表される化合物は、アスコルビン酸の3位の水酸基の水素原子をエチル基によって置換した、3-O-エチルアスコルビン酸である。

[0078] [化7]



[0079] エチルアスコルビン酸には、D体およびL体の立体異性体、ならびにラセミ体のDL体が存在する。エチルアスコルビン酸は、これらの立体異性体のいずれであってもよいが、入手容易性の観点から、L体であることが好ましく、具体的には、L-3-O-エチルアスコルビン酸（3-O-エチル-L-アスコルビン酸ともいう）が好ましい。

[0080] ・エチルアスコルビン酸の塩

エチルアスコルビン酸の塩としては、例えば、エチルアスコルビン酸と無機塩基との塩、エチルアスコルビン酸と有機塩基との塩等が挙げられる。

[0081] 無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミ

ニウム塩；アンモニウム塩；亜鉛塩等が挙げられる。

有機塩基との塩としては、例えば、アルキルアンモニウム塩、塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0082] エチルアスコルビン酸又はその塩としては、上記の中でも、入手容易性の観点から、エチルアスコルビン酸であることが好ましく、L-3-O-エチルアスコルビン酸がより好ましい。

[0083] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、エチルアスコルビン酸又はその塩は、1種単独で用いてもよく、2種以上を併用して用いてもよい。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物がエチルアスコルビン酸又はその塩を含有する場合、その含有量は、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.1～15質量%であることが好ましく、0.5～10質量%であることがより好ましく、1～5質量%であることがさらに好ましい。

[0084] エチルアスコルビン酸又はその塩は、公知の製造方法で製造することができる。

例えば、エチルアスコルビン酸の製造方法としては、アスコルビン酸をジメチルスルホキシド（DMSO）中でナトリウムメトキシド存在下にハロゲン化アルキルによりアルキル化する方法；特開平8-134055、特開平1-228977に記載の方法等により製造することができる。

また、エチルアスコルビン酸の塩の具体的な製造方法としては、エチルアスコルビン酸溶液を、酸化マグネシウム等の金属酸化物、または、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物等で中和することにより、エチルアスコルビン酸の塩を得ることができる。

[0085] エチルアスコルビン酸の市販品の例としては、富士フィルム和光純薬社製の3-O-エチル-L-アスコルビン酸（表示名称；3-O-エチルアスコルビン酸）等が挙げられる。

[0086] ≪(iv) アスコルビン酸グルコシド又はその塩≫

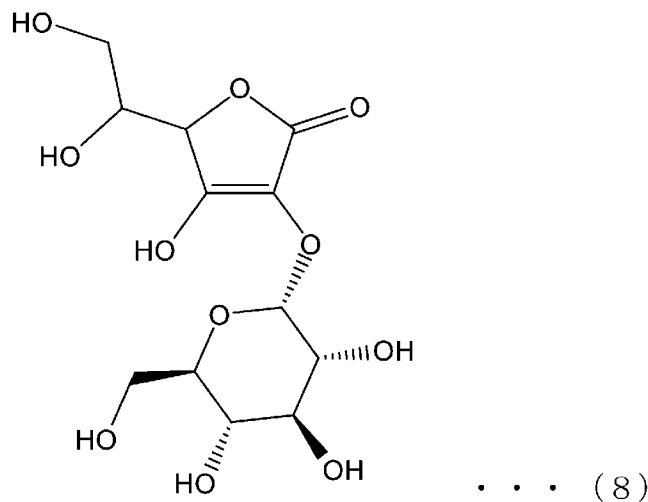
・アスコルビン酸グルコシド

アスコルビン酸グルコシドは、アスコルビン酸の少なくとも1つの水酸基がグルコシド化された化合物である。グルコシド結合は、 α -グルコシド結合であることが好ましい。

アスコルビン酸グルコシドとしては、下記化学式(8)で表される化合物が好適に挙げられる。

下記化学式(8)で表される化合物は、アスコルビン酸の2位の水酸基にグルコースが結合した、アスコルビン酸2-グルコシドである。

[0087] [化8]



[0088] アスコルビン酸には、D体およびL体の立体異性体、ならびにラセミ体のDL体が存在する。アスコルビン酸グルコシド中のアスコルビン酸は、これらの立体異性体のいずれであってもよいが、入手容易性の観点から、L体であることが好ましく、アスコルビン酸グルコシドは、具体的には、L-アスコルビン酸2-グルコシドが好ましい。アスコルビン酸グルコシド中のグルコースは、D体であってもL体であってもよいが、入手容易性の観点から、D体であることが好ましい。

[0089] ・アスコルビン酸グルコシドの塩

アスコルビン酸グルコシドの塩としては、例えば、アスコルビン酸グルコシドと無機塩基との塩、アスコルビン酸グルコシドと有機塩基との塩等が挙げられる。

[0090] 無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカ

り金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；亜鉛塩等が挙げられる。

有機塩基との塩としては、例えば、アルキルアンモニウム塩、塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0091] アスコルビン酸グルコシド又はその塩としては、上記の中でも、入手容易性の観点から、アスコルビン酸グルコシドであることが好ましく、L-アスコルビン酸2-グルコシドがより好ましい。

[0092] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、アスコルビン酸グルコシド又はその塩は、1種単独で用いてもよく、2種以上を併用して用いてもよい。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物がアスコルビン酸グルコシド又はその塩を含有する場合、その含有量は、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.1～15質量%であることが好ましく、0.5～10質量%であることがより好ましく、1～5質量%であることがさらに好ましい。

[0093] アスコルビン酸グルコシド又はその塩は、例えば、特開平03-139288に記載の方法等により製造することができる。

例えば、アスコルビン酸グルコシドの具体的な製造方法としては、アスコルビン酸の2位の水酸基にグルコース1分子を酵素反応で α -グルコシド結合させることにより製造することができる。

また、アスコルビン酸グルコシドの塩の具体的な製造方法としては、アスコルビン酸グルコシド溶液を、酸化マグネシウム等の金属酸化物、または、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物等で中和することにより、アスコルビン酸グルコシドの塩を得ることができる。

[0094] アスコルビン酸グルコシドの市販品の例としては、林原社製のアスコルビン酸2-グルコシド（化合物名；L-アスコルビン酸2-グルコシド、表示名称；アスコルビルグルコシド）等が挙げられる。

[0095] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、アスコルビン酸誘

導体又はその塩は、1種単独で用いてもよく、2種以上を併用して用いてもよい。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物が含有するアスコルビン酸誘導体又はその塩としては、上記の中でも、よりオートファジーを活性化できる観点から、(i)リン酸アスコルビル若しくはその塩又は(ii)リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル若しくはその塩であることが好ましく、(iii)リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル又はその塩であることがより好ましい。

[0096] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、アスコルビン酸誘導体又はその塩を含有することにより、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現をより促進することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、アスコルビン酸誘導体又はその塩を含有することにより、mTOR遺伝子の発現をより抑制することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、アスコルビン酸誘導体又はその塩を含有することにより、特に神経細胞において、アミロイド β 存在下でのLC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現をより促進することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、アスコルビン酸誘導体又はその塩を含有することにより、特に神経細胞において、アミロイド β 存在下でのアポトーシスをより抑制することができる。

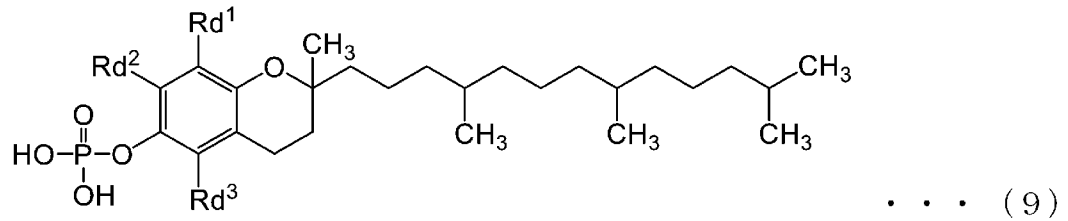
[0097] <ビタミンE誘導体又はその塩>

本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、前記オートファジー活性化剤に加えて、ビタミンE誘導体又はその塩を含有することが好ましい。ビタミンE誘導体又はその塩を含有することにより、オートファジーの活性化作用がより向上する。

[0098] ビタミンE誘導体としては、トコフェロールリン酸エステル又はその塩が挙げられる。

トコフェロールリン酸エステルとしては、下記一般式(9)で表される化合物が挙げられる。

[0099] [化9]



[式中、Rd¹、Rd²及びRd³は、互いに独立に、水素原子又はメチル基を表す。]

[0100] トコフェロールリン酸エステルには、上記一般式(9)中のRd¹、Rd²、Rd³によって、 α -トコフェロールリン酸エステル(Rd¹、Rd²、Rd³=CH₃)、 β -トコフェロールリン酸エステル(Rd¹、Rd³=CH₃、Rd²=H)、 γ -トコフェロールリン酸エステル(Rd¹、Rd²=CH₃、Rd³=H)、 δ -トコフェロールリン酸エステル(Rd¹=CH₃、Rd²、Rd³=H)、 ζ_2 -トコフェロールリン酸エステル(Rd²、Rd³=CH₃、Rd¹=H)、 η -トコフェロールリン酸エステル(Rd²=CH₃、Rd¹、Rd³=H)等が存在する。

[0101] トコフェロールリン酸エステルは、特に限定されず、これらのトコフェロールリン酸エステルのいずれであってもよい。これらの中でも、 α -トコフェロールリン酸エステル及び γ -トコフェロールリン酸エステルが好ましく、 α -トコフェロールリン酸エステルがより好ましい。

[0102] 上記一般式(9)で表される化合物は、クロマン環の2位に不斉炭素原子を有するため、d体及びl体の立体異性体、並びにd|体が存在する。トコフェロールリン酸エステルは、これらの立体異性体のいずれであってもよいが、d|体が好ましい。

[0103] 上記の中でも、トコフェロールリン酸エステルとしては、d| α -トコ

フェロールリン酸エステル及びd l- γ -トコフェロールリン酸エステルが好ましく、d l- α -トコフェロールリン酸エステルがより好ましい。

[0104] トコフェロールリン酸エステルの塩は、特に限定されないが、例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩等が挙げられる。

[0105] 無機塩基との塩としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；亜鉛塩等が挙げられる。

有機塩基との塩としては、例えば、アルキルアンモニウム塩、塩基性アミノ酸との塩等が挙げられる。

[0106] 上記の中でも、トコフェロールリン酸エステルの塩としては、アルカリ金属塩が好ましく、ナトリウム塩がより好ましい。トコフェロールリン酸エステルのアルカリ金属塩、特にナトリウム塩は、水への溶解性が高く、また性状が粉末となるため取り扱いが容易になるという利点を有している。

[0107] トコフェロールリン酸エステルの好ましい態様としては、上記一般式(9)で表される化合物のアルカリ金属塩(例、ナトリウム塩)、 α -トコフェロールリン酸エステルのアルカリ金属塩(例、ナトリウム塩)、 γ -トコフェロールリン酸エステルのアルカリ金属塩(例、ナトリウム塩)、d l- α -トコフェロールリン酸エステルのアルカリ金属塩(例、ナトリウム塩)、d l- γ -トコフェロールリン酸エステルのアルカリ金属塩(例、ナトリウム塩)等が挙げられる。

[0108] トコフェロールリン酸エステルのアルカリ金属塩の中でも、 α -トコフェロールリン酸エステルのナトリウム塩及び γ -トコフェロールリン酸エステルのナトリウム塩が好ましく、 α -トコフェロールリン酸エステルのナトリウム塩がより好ましい。

[0109] d l- α -トコフェロールリン酸エステルのナトリウム塩は、TPNa(登録商標)(表示名称：トコフェリルリン酸Na)の製品名で昭和電工より市販されている。前記TPNaは、トコフェロールリン酸エステルの好ましい例として例示される。

[0110] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、トコフェロールリン酸エステル又はその塩は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

本実施形態のオートファジー活性化用組成物がトコフェロールリン酸エステル又はその塩を含有する場合、その含有量は、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.01~10質量%であることが好ましく、0.05~5質量%であることがより好ましく、0.1~3質量%であることがさらに好ましい。

[0111] トコフェロールリン酸エステル又はその塩は、公知の製造方法、例えば特開昭59-44375号公報、国際公開公報第97/14705号等に記載の方法により製造することができる。

例えば、溶媒中に溶解したトコフェロールにオキシ塩化リン等のリン酸化剤を作用させ、反応終了後に適宜精製することによりトコフェロールリン酸エステルを得ることができる。さらに、得られたトコフェロールリン酸エステルを、酸化マグネシウム等の金属酸化物、水酸化ナトリウム等の金属水酸化物、又は、水酸化アンモニウムや水酸化アルキルアンモニウム等で中和することにより、トコフェロールリン酸エステルの塩を得ることができる。

[0112] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、トコフェロールリン酸エステル又はその塩を含有することにより、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現をより促進することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、トコフェロールリン酸エステル又はその塩を含有することにより、mTOR遺伝子の発現をより抑制することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、トコフェロールリン酸エステル又はその塩を含有することにより、特に神経細胞において、アミロイド β 存在下でのLC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現をより促進することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、トコフェロールリン酸エステル又はその塩を含有することにより、特に神経細胞において、アミロイドβ存在下でのアポトーシスをより抑制することができる。

[0113] <イノシトール誘導体>

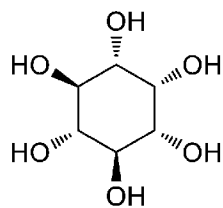
本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、前記オートファジー活性化剤に加えて、イノシトールに糖が結合したイノシトール誘導体を含有することが好ましい。イノシトール誘導体を含有することにより、オートファジーの活性化作用がより向上する。前記イノシトール誘導体は、イノシトールと糖から構成される化合物であり、具体的には、イノシトールの少なくとも一つの水酸基に糖が結合した化合物である。

[0114] ・イノシトール

イノシトールとは、 $C_6H_6(OH)_6$ で表される環状六価アルコールである。イノシトールには、*c i s*-イノシトール、*e p i*-イノシトール、*a l l o*-イノシトール、*m y o*-イノシトール、*m u c o*-イノシトール、*n e o*-イノシトール、*c h i r o*-イノシトール（D体及びL体が存在する。）、*s c y l l o*-イノシトールの、9つの立体異性体が存在する。

[0115] イノシトール誘導体を構成するイノシトールとしては、上記の立体異性体の中でも、生理活性を有する*m y o*-イノシトールであることが好ましい。*m y o*-イノシトールの構造式を以下に示す。

[0116] [化10]



(*m y o*-イノシトール)

[0117] イノシトールの製造方法としては、例えば、米糠から抽出する方法、化学合成法、及び発酵法等が挙げられる。

・糖

イノシトール誘導体を構成する糖は、単糖であってもよく、オリゴ糖であってもよい。ここで、単糖とは、それ以上加水分解されない糖を意味し、多糖を形成する際の構成要素となる化合物を意味する。単糖は、糖類の最小単位であるということもできる。オリゴ糖とは、単糖がグリコシド結合によって複数個結合した糖のオリゴマーである。

[0118] ・ ・ 単糖

単糖として、具体的には、グルコース（ブドウ糖）、フルクトース（果糖）、ガラクトース、リボース、キシロース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ペンタエリスリトール等が挙げられる。

[0119] ・ ・ オリゴ糖

オリゴ糖として、具体的には、スクロース（ショ糖）、ラクトース（乳糖）、マルトース（麦芽糖）、イソマルトース、トレハロース、セロビオース、マルチトール等の二糖；ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース等の三糖；スタキオース等の四糖； α -シクロデキストリン等の六糖； β -シクロデキストリン等の七糖； γ -シクロデキストリン等の八糖が挙げられる。

[0120] イノシトール誘導体を構成する糖としては、上記の中でも、グルコース又はグルコースを単糖単位として含むオリゴ糖であることが好ましい。

ここで、単糖単位とは、単糖に相当する化学構造を意味し、単糖に由来する化学構造であるということもできる。

[0121] 上記グルコースを単糖単位として含むオリゴ糖は、グルコースのみがグリコシド結合によって複数結合したオリゴ糖であってもよく、少なくとも1分子のグルコースと、グルコース以外の糖とがグリコシド結合によって複数結合したオリゴ糖であってもよい。

該グルコースを単糖単位として含むオリゴ糖の分子量は、例えば、300～3000程度であってもよい。

[0122] イノシトール誘導体において、糖は、イノシトール分子内に6つ存在する水酸基のいずれか1つに結合していてもよく、いずれか2つ以上に結合して

いてもよい。例えば、1分子のイノシトールに1又は複数の単糖が結合していてもよく、1分子のイノシトールに1又は複数のオリゴ糖が結合していてもよく、1分子のイノシトールに1又は複数の単糖及び1又は複数のオリゴ糖が結合していてもよい。

[0123] イノシトール誘導体において、1分子のイノシトールに結合した糖（単糖及び／又はオリゴ糖）の合計は、単糖単位に換算して1以上であり、例えば2以上であってもよく、例えば3以上であってもよく、例えば4以上であってもよく、例えば10以上であってもよい。

ここで、単糖単位に換算とは、1分子のイノシトールに結合した糖がいくつの単糖単位から構成されているかを示すものである。なお、1分子のイノシトールに複数の糖が結合している場合は、複数の糖の単糖単位をそれぞれ合計した値を意味する。

[0124] 具体的には、二糖を単糖単位に換算すると2であり、三糖を単糖単位に換算すると3である。また、1分子のイノシトールに二糖および三糖が結合している場合は、単糖単位に換算すると5である。

[0125] より具体的には、グルコース（ブドウ糖）、フルクトース（果糖）、ガラクトース、リボース、キシロース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ペンタエリスリトール等の単糖を単糖単位に換算すると1である。

また、スクロース（ショ糖）、ラクトース（乳糖）、マルトース（麦芽糖）、イソマルトース、トレハロース、セロビオース、マルチトール等の二糖を単糖単位に換算すると2である。

また、ラフィノース、メレジトース、マルトトリオース等の三糖を単糖単位に換算すると3である。

また、スタキオース等の四糖を単糖単位に換算すると4であり、 α -シクロデキストリン等の六糖を単糖単位に換算すると6であり、 β -シクロデキストリン等の七糖を単糖単位に換算すると7であり、 γ -シクロデキストリン等の八糖を単糖単位に換算すると8である。

[0126] イノシトール誘導体は、高い精製度のイノシトール誘導体を得やすくなる観点から、原料の糖として、 β -シクロデキストリンを用いたものであることが好ましい。 β -シクロデキストリンは、工業的に安価で安定供給可能である。

この場合、イノシトール誘導体を構成する糖はグルコースを構成単位として含むことになる。

一方で、イノシトール誘導体の原料の糖として、より安価なデンプン等を用いた場合、イノシトール誘導体の合成時に様々な糖が様々な場所に転移されるため、得られるイノシトール誘導体の精製度が安定しない傾向がある。

[0127] イノシトール誘導体は、薬学的に許容可能な塩の形態であってもよい。

本明細書において、「薬学的に許容可能な塩」とは、イノシトール誘導体の生理活性を阻害しない塩の形態を意味する。

イノシトール誘導体の薬学的に許容可能な塩としては、特に制限されず、例えば、アルカリ金属（ナトリウム、カリウムなど）との塩；アルカリ土類金属（マグネシウム、カルシウムなど）との塩；有機塩基（ピリジン、トリエチルアミンなど）との塩、アミンとの塩等が挙げられる。

[0128] また、イノシトール誘導体は、溶媒和物の形態であってもよい。さらに、イノシトール誘導体は、イノシトール誘導体の塩の溶媒和物の形態であってもよい。溶媒和物としては、特に制限されず、例えば、水和物、エタノール溶媒和物等を挙げるができる。

[0129] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物において、イノシトール誘導体は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0130] イノシトール誘導体は、上記の中でも、2種以上のイノシトール誘導体の混合物であることが好ましく、2～40種類のイノシトール誘導体の混合物であることがより好ましく、2～30種類のイノシトール誘導体の混合物であることがさらに好ましく、10～30種類のイノシトール誘導体の混合物であることが特に好ましい。

[0131] イノシトール誘導体は、上記の中でも、イノシトール1分子に結合した糖

の合計が単糖単位換算で10以上であるイノシトール誘導体を含むことが好ましい。

[0132] また、イノシトール誘導体は、イノシトールにグルコース又はグルコースを単糖単位として含むオリゴ糖が結合したイノシトール誘導体であることが好ましく、2種以上の該イノシトール誘導体の混合物であることが好ましく、2~40種類の該イノシトール誘導体の混合物であることがより好ましく、2~30種類の該イノシトール誘導体の混合物であることがさらに好ましく、10~30種類の該イノシトール誘導体の混合物であることが特に好ましい。

[0133] イノシトール誘導体は、イノシトールにグルコース又はグルコースを単糖単位として含むオリゴ糖が結合したイノシトール誘導体を含み、イノシトール1分子に結合したグルコース及びグルコースを単糖単位として含むオリゴ糖の合計が単糖単位換算で10以上であるイノシトール誘導体を含むことが好ましい。

[0134] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物がイノシトール誘導体を含有する場合、その含有量は、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.1~2質量%であることが好ましく、0.2~1.5質量%であることがより好ましく、0.5~1.5質量%であることがさらに好ましい。

[0135] イノシトール誘導体の合成方法としては、特に制限はなく、従来知られている方法で適宜合成することができる。例えば、イノシトール及びオリゴ糖の1種であるシクロデキストリンを、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの存在下で反応させて、イノシトール誘導体を合成してもよい（例えば、特開昭63-196596号公報を参照）。あるいは、グルコシル亜リン酸エステルを糖供与体として用い、グルコシル体を得る方法により、イノシトール誘導体を合成してもよい（例えば、特開平6-298783号公報を参照）。

[0136] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、イノシトール誘導体を含有することにより、LC3遺伝子、ATG5

遺伝子、及びATG7遺伝子の発現をより促進することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、イノシトール誘導体を含有することにより、mTOR遺伝子の発現をより抑制することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、イノシトール誘導体を含有することにより、特に神経細胞において、アミロイドβ存在下でのLC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現をより促進することができる。

また、本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、メチルヘスペリジンに加えて、イノシトール誘導体を含有することにより、特に神経細胞において、アミロイドβ存在下でのアポトーシスをより抑制することができる。

[0137] 本実施形態のオートファジー活性化用組成物は、医薬組成物であってもよく、化粧品であってもよい。

[0138] (医薬組成物)

一実施形態において、本発明は、上述したオートファジー活性化剤及び薬学的に許容される担体を含有する、オートファジー活性化用医薬組成物を提供する。

[0139] 本実施形態の医薬組成物において、薬学的に許容される担体としては、特に制限されず、上記に挙げたもののほか医薬品に一般的に使用される担体を使用することができる。例えば、日本薬局方、日本薬局方外医薬品規格、医薬品添加物規格2013（薬事日報社、2013年）、医薬品添加物辞典2016（日本医薬品添加剤協会編、薬事日報社、2016年）、Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th edition（Pharmaceutical Press、2012年）等に記載されている一般的な原料を使用することができる。

薬学的に許容される担体は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0140] 本実施形態の医薬組成物は、前記オートファジー活性化剤及び薬学的に許

容される担体に加えて、他の成分を含有していてもよい。他の成分としては、特に制限されず、一般的な医薬品添加物を使用することができる。また、他の成分として、上述したオートファジー活性化剤以外の活性成分を使用することもできる。他の成分としての医薬品添加物及び活性成分としては、上記に挙げたもののほか、例えば、日本薬局方、日本薬局方外医薬品規格、医薬品添加物規格2013（薬事日報社、2013年）、医薬品添加物辞典2016（日本医薬品添加剤協会編、薬事日報社、2016年）、Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th edition（Pharmaceutical Press、2012年）等に記載されている一般的な原料を使用することができる。他の成分は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0141] 本実施形態の医薬組成物の剤型としては、特に制限されず、医薬品製剤として一般的に用いられる剤型とすることができる。例えば、錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等の経口的に投与する剤型；及び、注射剤、坐剤、皮膚外用剤等の非経口的に投与する剤型等が挙げられる。これらの剤型の医薬組成物は、定法（例えば、日本薬局方記載の方法）に従って、製剤化することができる。

[0142] 本実施形態の医薬組成物の投与方法は、特に制限されず、医薬品の投与方法として一般的に用いられる方法で投与することができる。例えば、錠剤、被覆錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤等として経口投与してもよく、注射剤、輸液製剤等として、単独で、又はブドウ糖液、リンゲル液等の一般的な輸液と混合して、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、皮下、腹腔内等に投与してもよく、坐剤として直腸内投与してもよく、皮膚外用剤として皮膚に投与してもよい。

[0143] 本実施形態の医薬組成物の投与量は、治療的有効量とすることができる。治療的有効量は、患者の症状、体重、年齢、及び性別等、並びに医薬組成物の剤型、及び投与方法等によって適宜決定すればよい。

例えば、本実施形態の医薬組成物の投与量は、経口投与の場合には、メチ

ルヘスペリジンの合計含有量として投与単位形態あたり0.01~500mg、注射剤の場合には、メチルヘスペリジンの合計含有量として投与単位形態あたり0.02~250mg、坐剤の場合には、メチルヘスペリジンの合計含有量として投与単位形態あたり0.01~500mg、皮膚外用剤の場合には、メチルヘスペリジンの合計含有量として投与単位形態あたり0.01~500mg等が挙げられる。

[0144] 本実施形態の医薬組成物の投与間隔は、患者の症状、体重、年齢、および性別等、ならびに医薬組成物の剤型、および投与方法等によって適宜決定すればよい。例えば、1日1回又は2~3回程度等とすることができる。

[0145] 本実施形態の医薬組成物は、オートファジー活性の低下に起因する疾患の治療又は予防のために用いることができる。そのような疾患としては、例えば、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、SENDA病などの神経変性疾患；クローン病などの炎症性腸疾患；がんなどが挙げられる。

[0146] 本実施形態の医薬組成物は、例えば、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、SENDA病などの神経変性疾患；クローン病などの炎症性腸疾患；又はがんの患者に投与して、神経変性疾患、炎症性腸疾患、又はがんの進行を抑制するために用いることができる。また、本実施形態の医薬組成物は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、SENDA病などの神経変性疾患；クローン病などの炎症性腸疾患；又はがんの患者に投与して、神経変性疾患、炎症性腸疾患、又はがんを治療するために用いることができる。また、本実施形態の医薬組成物は、アミロイド β に起因する疾患を治療するために用いることができる。また、本実施形態の医薬組成物は、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子の発現量低下に起因する疾患を治療するために用いることができる。また、本実施形態の医薬組成物は、mTORの発現量上昇に起因する疾患を治療するために用いることができる。

本実施形態の医薬組成物は、上記の中でも、特にアルツハイマー病を治療

するために好適に用いることができる。

[0147] 本実施形態の医薬組成物は、アルツハイマー病をはじめ、ハンチントン病、パーキンソン病、SENDA病などの神経変性疾患の発症リスクの高い患者に投与して、神経変性疾患を予防するために用いることもできる。また、本実施形態の医薬組成物は、クローン病などの炎症性腸疾患の発症リスクの高い患者に投与して、炎症性腸疾患を予防するために用いることもできる。また、本実施形態の医薬組成物は、がんの発症リスクの高い患者に投与して、がんを予防するために用いることもできる。

[0148] (化粧品)

一実施形態において、本発明は、上述したオートファジー活性化剤及び薬学的に許容される担体を含有する、オートファジー活性化のための化粧料を提供する。

[0149] 本実施形態の化粧料において、薬学的に許容される担体としては、特に制限されず、上記に挙げたもののほか化粧料に一般的に使用される担体を使用することができる。例えば、化粧品原料基準第二版注解（日本公定書協会編、薬事日報社、1984年）、化粧品原料基準外成分規格（厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1993年）、化粧品原料基準外成分規格追補（厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1993年）、化粧品種別許可基準（厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1993年）、化粧品原料辞典（日光ケミカルズ社、平成3年）、International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook 2002 Ninth Edition Vol. 1~4, by CTF A等に記載されている一般的な原料を使用することができる。

薬学的に許容される担体は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0150] 本実施形態の化粧料は、オートファジー活性化剤及び薬学的に許容される担体に加えて、他の成分を含有していてもよい。他の成分としては、特に制限されず、一般的な化粧品添加物を使用することができる。また、他の成分

として、上述したオートファジー活性化剤以外の活性成分を使用することもできる。他の成分としての化粧品添加物及び活性成分としては、上記に挙げたもののほか、例えば、化粧品原料基準第二版注解（日本公定書協会編、薬事日報社、1984年）、化粧品原料基準外成分規格（厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1993年）、化粧品原料基準外成分規格追補（厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1993年）、化粧品種別許可基準（厚生省薬務局審査課監修、薬事日報社、1993年）、化粧品原料辞典（日光ケミカルズ社、平成3年）、International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook 2002 Ninth Edition Vol. 1~4, by CTF A等に記載されている一般的な原料を使用することができる。他の成分は、1種を単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

[0151] 本実施形態の化粧料の形態としては、特に制限されず、化粧料として一般的に用いられる形態とすることができる。例えば、シャンプー、リンス、整髪剤などの毛髪用化粧料；洗顔料、クレンジング剤、化粧水、乳液、ローション、クリーム、ジェル、サンスクリーン剤、パック、マスク、美容液などの基礎化粧料；ファンデーション類、化粧下地、口紅類、リップグロス、頬紅類などのメーキャップ化粧料；ボディ洗浄料、ボディーパウダー、防臭化粧料などのボディ化粧料等が挙げられる。これらの化粧料は、定法に従って製造することができる。

[0152] また、本実施形態の化粧料の剤型としては、特に制限されず、例えば、水中油（O/W）型、油中水（W/O）型、W/O/W型、O/W/O型等の乳化型、乳化高分子型、油性、固形、液状、練状、スティック状、揮発性油型、粉状、ゼリー状、ジェル状、ペースト状、クリーム状、シート状、フィルム状、ミスト状、スプレー型、エアゾール状、多層状、泡状、フレーク状等が挙げられる。

[0153] 本実施形態の化粧料の使用量は、特に制限されないが、オートファジーを活性化するために有効な量とすることができる。

例えば、本実施形態の化粧料の使用量は、メチルヘスペリジンの合計含有量として1回の使用あたり0.01～500mgであり、例えば0.15～300mgであってもよく、例えば0.15～200mgであってもよく、例えば0.2～100mgであってもよい。

[0154] 本実施形態の化粧料の使用間隔は、特に制限されないが、例えば、1日1回又は2～3回程度等とすることができる。

[0155] 本実施形態の化粧料は、オートファジー活性の低下に起因する症状を緩和するために用いることができる。または、オートファジー活性の低下に起因する症状の発症を予防するために、これらの発症リスクが高い被験者により日常的なスキンケアやメイキャップに使用されてもよい。

[0156] (その他の実施形態)

一実施形態において、本発明は、メチルヘスペリジンを対象に投与する工程を含む、オートファジーを活性化する方法を提供する。

[0157] 一実施形態において、本発明は、メチルヘスペリジンを対象に投与する工程を含む、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子の発現を促進する方法を提供する。

[0158] 一実施形態において、本発明は、メチルヘスペリジンを対象に投与する工程を含む、mTOR遺伝子の発現を抑制する方法を提供する。

[0159] 一実施形態において、本発明は、メチルヘスペリジンを対象に投与する工程を含む、アミロイドβ存在下でのアポトーシスを抑制する方法を提供する。

[0160] 一実施形態において、本発明は、オートファジーを活性化するための、メチルヘスペリジンを提供する。

[0161] 一実施形態において、本発明は、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子の発現を促進するための、メチルヘスペリジンを提供する。

[0162] 一実施形態において、本発明は、mTOR遺伝子の発現を抑制するための、メチルヘスペリジンを提供する。

[0163] 一実施形態において、本発明は、アミロイドβ存在下でのアポトーシスを

抑制するための、メチルヘスペリジンを提供する。

- [0164] 一実施形態において、本発明は、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、SENDA病、クローン病、又はがんを予防又は治療するための、メチルヘスペリジンを提供する。
- [0165] 一実施形態において、本発明は、オートファジー活性化剤を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0166] 一実施形態において、本発明は、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子発現の促進剤を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0167] 一実施形態において、本発明は、mTOR遺伝子発現の抑制剤を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0168] 一実施形態において、本発明は、アミロイド β 存在下でのLC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子発現の促進剤を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0169] 一実施形態において、本発明は、アミロイド β 存在下でのアポトーシスの抑制剤を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0170] 一実施形態において、本発明は、オートファジー活性化用組成物を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0171] 一実施形態において、本発明は、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子発現の促進用組成物を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0172] 一実施形態において、本発明は、mTOR遺伝子発現の抑制用組成物を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0173] 一実施形態において、本発明は、アミロイド β 存在下でのLC3遺伝子、ATG5遺伝子、又はATG7遺伝子発現の促進用組成物を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。
- [0174] 一実施形態において、本発明は、アミロイド β 存在下でのアポトーシスの抑制用組成物を製造するための、メチルヘスペリジンの使用を提供する。

[0175] 上述の実施形態において、メチルヘスペリジンは、アスコルビン酸誘導体又はその塩、トコフェロールリン酸エステル又はその塩、及びイノシトールに糖が結合したイノシトール誘導体からなる群より選択される少なくとも1種と併用されることが好ましい。

実施例

[0176] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

[0177] [メチルヘスペリジン]

昭和電工株式会社から販売されているメチルヘスペリジン（製品名：メチルヘスペリジン）を使用した。この製品は、前記カルコン体-1～3及び前記フラバノン体-1～3の合計含有量が、組成物全量中、97.5質量%以上である。

[0178] [ビタミンC誘導体]

以下の実施例および処方例では、下記のビタミンC誘導体を使用した。

APM：L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルのマグネシウム塩（表示名称；リン酸アスコルビルMg、製品名；アスコルビン酸PM、昭和電工社製）

APPS：L-アスコルビン酸-2-リン酸-6-パルミチン酸のナトリウム塩（表示名称；パルミチン酸アスコルビルリン酸3Na、製品名；アプレシエ（APPS）、昭和電工社製）

[0179] [ビタミンE誘導体]

以下の実施例および処方例では、下記のビタミンE誘導体を使用した。

α -TPNa：d,l- α -トコフェリルリン酸ナトリウム（表示名称；トコフェリルリン酸Na、製品名；TPNa（登録商標）、昭和電工社製）

γ -TPNa：d,l- γ -トコフェリルリン酸ナトリウム（昭和電工社製）

[0180] [イノシトール誘導体]

以下の実施例および処方例では、国際公開第2019/045113号に

記載の方法により製造したイノシトール誘導体Aを使用した。

具体的には、 α -イノシトール（築野ライスファインケミカルズ社製）と β -シクロデキストリン（塩水港精糖社製）とをシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（ノボザイム社製）の存在下で反応させ、 α -イノシトールにグルコース又はグルコースを単糖単位とするオリゴ糖が結合したイノシトール誘導体の混合物であるイノシトール誘導体Aを作製した。作製したイノシトール誘導体Aを液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）で分析した結果、組成は以下の通りであった。

[0181] [表5]

単糖単位数	イノシトール誘導体A (質量%)
1	9
2	12
3	12
4	12
5	11
6	9
7	8
8	6
9	5
10	4
11	4
12以上	8

[0182] <試料溶液の作製>

以下の各試料溶液を作製し、実施例及び比較例に用いた。

メチルヘスペリジンDMSO溶液：メチルヘスペリジンをDMSOに溶解した。

ヘスペリジンDMSO溶液：ヘスペリジン（東京化成工業社製）をDMSOに溶解した。

APM水溶液：APMを精製水に溶解した。

APPS水溶液：APPSを精製水に溶解した。

α -TPNa溶液： α -TPNaを0.05%（V/V）エタノール水溶液に溶解した。

γ -TPNa溶液： γ -TPNaを0.05%（V/V）エタノール水溶液に溶解した。

液に溶解した。

イノシトール誘導体A水溶液：イノシトール誘導体Aを精製水に溶解した。

[0183] <ヒト老化線維芽細胞におけるLC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現促進効果の評価>

人為的に老化を誘発した細胞を作製するため、線維芽細胞を用いて試験を行った。老化線維芽細胞は、以下の手順により作製した。

[0184] <<老化線維芽細胞の作製>>

10%ウシ胎児血清 (MP Biomedicals社製) を添加したD-MEM培地 (Sigma-Aldrich社製) で、ヒト正常線維芽細胞 (NB1RGB; RIKEN BRC セルバンク製) をコンフルエントになるまで培養した。その後、250 μ M過酸化水素水で2時間処理し、新しい10%ウシ胎児血清を添加したD-MEM培地で24時間培養した。この過酸化水素水による処理と細胞培養の操作を3回繰り返し、得られた線維芽細胞を老化線維芽細胞とした。

[0185] <<遺伝子の発現促進効果の評価試験>>

作製した老化線維芽細胞を、10000個/cm²の播種密度で準備し、10%ウシ胎児血清 (MP Biomedicals社製) を添加したD-MEM培地 (Sigma-Aldrich社製) にて24時間培養した。次いで、実施例1では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻³% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例2では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例3では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APMの終濃度が100 μ MとなるようにAPM水溶液を培地に添加した。実施例4では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSO

の終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APP Sの終濃度が10 μ MとなるようにAPP S水溶液を培地に添加した。実施例5では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 α -TPNaの終濃度が10 μ Mとなるように α -TPNa溶液を培地に添加した。実施例6では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 γ -TPNaの終濃度が10 μ Mとなるように γ -TPNa溶液を培地に添加した。実施例7では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、イノシトール誘導体Aの終濃度が10⁻³% (V/V) となるようにイノシトール誘導体A水溶液を培地に添加した。

また、比較例1では、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、DMSOのみを培地に添加した。比較例2では、ヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、ヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。

次いで、それぞれの培地を、24時間、37℃、5%CO₂下で培養した。

[0186] 一方で、参考例1としては、上記ヒト正常線維芽細胞を、10000個/cm²の播種密度で準備し、10%ウシ胎児血清 (MP Biomedical社製) を添加したD-MEM培地 (Sigma-Aldrich社製) にて24時間培養し、該培地にDMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、DMSOのみを添加した。次いで、該培地を、24時間、37℃、5%CO₂下で培養した。

[0187] その後、Nucleospin (登録商標) RNAキット (タカラバイオ社製) を用いて、各例の老化線維芽細胞、または、ヒト正常線維芽細胞からRNAを抽出し、得られたRNAからcDNAを合成した。次いで、このcDNAをテンプレートに、定量リアルタイムPCRで、LC3遺伝子、A

T G 5 遺伝子、及び A T G 7 遺伝子に特異的なプライマー（タカラバイオ社製）をそれぞれ用いて、各遺伝子の発現量を定量した。

[0188] 内部標準遺伝子として化合物添加により遺伝子発現に変動がみられないハウスキーピング遺伝子の G A P D H（プライマー；タカラバイオ社製）の発現量を定量し、その値により各遺伝子の発現量を標準化した。前記各例における遺伝子発現量について、比較例 1 における各遺伝子の発現量をそれぞれ 1.00 としたときの、相対遺伝子発現量を求めた。その結果を表 6 に示した。

[0189] [表6]

	オートファジー活性化剤 又はDMSO	追加成分	細胞	相対遺伝子発現量			
				LC3	ATG5	ATG7	
参考例 1	0.1%(V/V) DMSO	-	正常 線維芽細胞	1396.92	1.75	1.69	
比較例 1	0.1%(V/V) DMSO	-		1.00	1.00	1.00	
比較例 2	10 ⁻² %(V/V) ヘスペリジン	-		<0	0.93	0.76	
実施例 1	10 ⁻³ %(V/V) メチルヘスペリジン	-		135.32	1.59	2.31	
実施例 2	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	-		2726.88	1.76	1.76	
実施例 3	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	100 μ M APM		老化 線維芽細胞	2801.23	1.87	1.82
実施例 4	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μ M APPS			2856.73	1.95	1.90
実施例 5	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μ M α-TPNa			2833.19	1.97	1.91
実施例 6	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μ M γ-TPNa			2811.85	1.88	1.80
実施例 7	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 ⁻³ %(V/V) イノシトール誘導体A			2798.72	1.81	1.79

[0190] 表 6 に示す通り、参考例 1 および比較例 1 において、それぞれ D M S O のみ添加して培養したヒト正常線維芽細胞および老化線維芽細胞では、老化線維芽細胞の方が、L C 3 遺伝子、A T G 5 遺伝子、及び A T G 7 遺伝子の発現量がいずれも低下していることが確認できた。

比較例 2 のヘスペリジン D M S O 溶液を添加して培養した老化線維芽細胞と、比較例 1 の D M S O のみ添加して培養した老化線維芽細胞とを比較すると、比較例 2 の老化線維芽細胞は、比較例 1 の老化線維芽細胞よりも、L C 3 遺伝子、A T G 5 遺伝子、及び A T G 7 遺伝子の発現量が低下していた。

[0191] 一方で、実施例1～7のオートファジー活性化剤を添加して培養した老化線維芽細胞では、比較例1のDMSOのみ添加して培養した老化線維芽細胞に比べて、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現量がいずれも増加しており、特にLC3遺伝子の発現量が増加していた。

[0192] 実施例3～7の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジン及び追加分 (APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)を添加して培養した老化線維芽細胞は、実施例2の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジンを添加して培養した老化線維芽細胞と比較して、LC3遺伝子、ATG5遺伝子及びATG7遺伝子の発現量がより増加しており、前記各遺伝子の発現がより促進されていた。この結果から、メチルヘスペリジンと、追加分 (APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)とを併用することにより、LC3遺伝子、ATG5遺伝子及びATG7遺伝子の発現をより促進できることが確認できた。

[0193] <ヒト老化線維芽細胞におけるmTOR遺伝子の発現抑制効果の評価>

上記で作製した老化線維芽細胞を、 10000 個/cm²の播種密度で準備し、10%ウシ胎児血清 (MP Biomedicals社製)を添加したD-MEM培地 (Sigma-Aldrich社製)にて24時間培養した。次いで、実施例8では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-3}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例9では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例10では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APMの終濃度が $100\mu\text{M}$ となるようにAPM水溶液を培地に添加した。実施例11では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジ

ンDMSO溶液を培地に添加し、APP Sの終濃度が10 μ MとなるようにAPP S水溶液を培地に添加した。実施例12では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 α -TPNaの終濃度が10 μ Mとなるように α -TPNa溶液を培地に添加した。実施例13では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 γ -TPNaの終濃度が10 μ Mとなるように γ -TPNa溶液を培地に添加した。実施例14では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、イノシトール誘導体Aの終濃度が10⁻³% (V/V)となるようにイノシトール誘導体A水溶液を培地に添加した。

また、比較例3では、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、DMSOを培地に添加した。比較例4では、ヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、ヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。

次いで、それぞれの培地を、24時間、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で培養した。

[0194] 一方で、参考例2としては、上記ヒト正常線維芽細胞を、10000個/cm²の播種密度で準備し、10%ウシ胎児血清 (MP Biomedical社製) を添加したD-MEM培地 (Sigma-Aldrich社製) にて24時間培養し、該培地にDMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、DMSOのみを添加した。次いで、該培地を、24時間、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下で培養した。

[0195] その後、Nucleospin (登録商標) RNAキット (タカラバイオ社製) を用いて、各例の老化線維芽細胞、又は、ヒト正常線維芽細胞からRNAを抽出し、得られたRNAからcDNAを合成した。次いで、このcDNAをテンプレートに定量リアルタイムPCRでmTOR遺伝子に特異的

なプライマー（タカラバイオ社製）を用いて、mTOR遺伝子の発現量を定量した。

[0196] 内部標準遺伝子として化合物添加により発現に変動がみられないハウスキーピング遺伝子のGAPDH（プライマー；タカラバイオ社製）の発現量を定量し、その値により各遺伝子の発現量を標準化した。各例における遺伝子発現量について、比較例3におけるmTOR遺伝子の発現量を1.00としたときの、相対遺伝子発現量を求めた。その結果を表7に示した。

[0197] [表7]

	オートファジー活性化剤 又はDMSO	追加成分	細胞	相対遺伝子発現量
				mTOR
参考例 2	0.1%(V/V) DMSO	-	正常 線維芽細胞	0.66
比較例 3	0.1%(V/V) DMSO	-		1.00
比較例 4	10 ⁻² %(V/V) ヘスペリジン	-		1.16
実施例 8	10 ⁻³ %(V/V) メチルヘスペリジン	-	老化 線維芽細胞	0.48
実施例 9	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	-		0.85
実施例 10	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	100 μM APM		0.78
実施例 11	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM APPS		0.66
実施例 12	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM α-TPNa		0.65
実施例 13	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM γ-TPNa		0.72
実施例 14	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 ⁻³ %(V/V) イノシトール誘導体A		0.73

[0198] 表7に示す通り、参考例2および比較例3において、それぞれDMSOのみ添加して培養したヒト正常線維芽細胞および老化線維芽細胞では、参考例2のヒト正常線維芽細胞に比べて、比較例3の老化線維芽細胞ではmTOR遺伝子の発現亢進がみられた。

比較例4のヘスペリジンDMSO溶液を添加して培養した老化線維芽細胞のmTOR遺伝子の発現量は、比較例3のDMSOのみを添加して培養した老化線維芽細胞とほぼ同等であった。

[0199] 一方で、実施例8～14のオートファジー活性化剤を添加して培養した老

化線維芽細胞は、比較例3のDMSOのみ添加して培養した老化線維芽細胞に比べて、mTOR遺伝子の発現量が低下しており、mTOR遺伝子の発現が抑制されていた。

[0200] 実施例10～14の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジン及び追加成分 (APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)を添加して培養した老化線維芽細胞は、実施例9の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジンを添加して培養した老化線維芽細胞と比較して、mTOR遺伝子の発現量がより低下しており、mTOR遺伝子の発現がより抑制されていた。この結果から、メチルヘスペリジンと、追加成分 (APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)とを併用することにより、mTOR遺伝子の発現をより抑制できることが確認できた。

[0201] <ヒト神経芽細胞腫におけるLC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現促進効果の評価>

オートファジー活性化剤存在下で、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y; ATCCから入手)におけるLC3遺伝子、ATG5遺伝子、および、ATG7遺伝子の発現量を以下の試験方法で測定し、オートファジー活性化剤によるLC3遺伝子、ATG5遺伝子、および、ATG7遺伝子の発現促進効果を評価した。

以下の実施例及び比較例では、神経細胞におけるオートファジーの低下を引き起こすことが知られているアミロイド β を各培地に添加して試験を行った。

[0202] SH-SY5Y細胞を 10000 個/cm²の播種密度で準備し、10%ウシ胎児血清 (MP Biomedicals社製)を添加したD-MEM/Ham's F-12培地 (Sigma-Aldrich社製)にて24時間培養した。次いで、実施例15では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-3}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例16では、メチルヘ

スペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例17では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APMの終濃度が $100\mu\text{M}$ となるようにAPM水溶液を培地に添加した。実施例18では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APPSの終濃度が $10\mu\text{M}$ となるようにAPPS水溶液を培地に添加した。実施例19では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 α -TPNaの終濃度が $10\mu\text{M}$ となるように α -TPNa溶液を培地に添加した。実施例20では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 γ -TPNaの終濃度が $10\mu\text{M}$ となるように γ -TPNa溶液を培地に添加した。実施例21では、メチルヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、イノシトール誘導体Aの終濃度が $10^{-3}\%$ (V/V)となるようにイノシトール誘導体A水溶液を培地に添加した。

また、比較例5では、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、DMSOを培地に添加した。比較例6では、ヘスペリジン終濃度が $10^{-2}\%$ (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V)となるように、ヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。

次いで、アミロイド β (Sigma-Aldrich社製)を0.01% (V/V) DMSO水溶液に溶かしたアミロイド β 溶液を調製し、各培地におけるアミロイド β の終濃度が $20\mu\text{M}$ となるように、該アミロイド β 溶液を各培地に添加した。

なお、参考例3では、DMSOの終濃度が0.1%(V/V)となるように、DMSOのみ添加し、アミロイドβ溶液は添加しなかった。

次いで、それぞれの培地を、48時間、37℃、5%CO₂下で培養した。

[0203] その後、Nucleospin (登録商標) RNAキット (タカラバイオ社製) を用いて、各例のSH-SY5Y細胞からRNAを抽出し、得られたRNAからcDNAを合成した。次いで、このcDNAをテンプレートに、定量リアルタイムPCRで、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子に特異的なプライマー (タカラバイオ社製) をそれぞれ用いて、各遺伝子の発現量を定量した。

[0204] 内部標準遺伝子として化合物添加により発現に変動がみられないハウスキーピング遺伝子のGAPDH (プライマー; タカラバイオ社製) の発現量を定量し、その値により各遺伝子の発現量を標準化した。各例における遺伝子発現量について、参考例3における各遺伝子の発現量をそれぞれ1.00としたときの、相対遺伝子発現量を求めた。その結果を表8に示した。

[0205] [表8]

	オートファジー活性化剤 又はDMSO	追加成分	アミロイドβ	相対遺伝子発現量		
				LC3	ATG5	ATG7
参考例3	0.1%(V/V) DMSO	-	なし	1.00	1.00	1.00
比較例5	0.1%(V/V) DMSO	-	あり	0.56	0.88	0.63
比較例6	10 ⁻² %(V/V) ヘスペリジン	-		2.41	3.29	2.31
実施例15	10 ⁻³ %(V/V) メチルヘスペリジン	-		3.32	2.24	2.77
実施例16	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	-		6.52	4.97	3.97
実施例17	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	100 μM APM		6.99	5.43	4.44
実施例18	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM APPS		7.27	5.89	5.03
実施例19	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM α-TPNa		7.66	6.01	5.22
実施例20	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM γ-TPNa		7.32	5.54	4.65
実施例21	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 ⁻³ %(V/V) イノシトール誘導体A		6.95	5.36	4.22

[0206] 表8に示す通り、参考例3および比較例5において、DMSOのみ添加し

て培養したSH-SY5Y細胞に比べて、さらにアミロイドβを添加して培養したSH-SY5Y細胞では、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現量がいずれも低下していることが確認できた。

[0207] 実施例15～21のオートファジー活性化剤とアミロイドβ溶液とを添加して培養したSH-SY5Y細胞では、比較例5のDMSOとアミロイドβ溶液とを添加して培養したSH-SY5Y細胞に比べて、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現量がいずれも増加していた。

また、比較例6の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のヘスペリジン添加して培養したSH-SY5Y細胞でも、比較例5のSH-SY5Y細胞に比べて、LC3遺伝子、ATG5遺伝子、及びATG7遺伝子の発現量が増加していた。しかしながら、実施例16の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジンを添加して培養したSH-SY5Y細胞の方が、いずれの遺伝子についても発現量の増加が顕著であった。

[0208] 実施例17～21の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジン及び追加成分 (APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)を添加して培養したSH-SY5Y細胞は、実施例16の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジンを添加して培養したSH-SY5Y細胞と比較して、LC3遺伝子、ATG5遺伝子及びATG7遺伝子の発現量がより増加しており、前記各遺伝子の発現がより促進されていた。この結果から、メチルヘスペリジンと、追加成分 (APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)とを併用することにより、アミロイドβ存在下での神経細胞におけるLC3遺伝子、ATG5遺伝子及びATG7遺伝子の発現をより促進できることが確認できた。

[0209] <ヒト神経芽細胞腫におけるアミロイドβに起因するアポトーシス抑制作用の評価>

オートファジー活性化剤存在下でのヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y; ATCCから入手)におけるアポトーシス細胞の割合を以下の試験方法で測定し、オートファジー活性化剤によるアポトーシス抑制作用を評価した。

以下の実施例及び比較例では、オートファジーの低下とそれによる神経細胞のアポトーシスと呼ばれる細胞死を誘引することが知られているアミロイド β を各培地に添加して試験を行った。

[0210] SH-SY5Y細胞を50000個/cm²の播種密度で準備し、10%ウシ胎児血清 (MP Biomedicals社製) を添加したD-MEM/Ham's F-12培地 (Sigma-Aldrich社製) にて24時間培養した。次いで、実施例22では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻³% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例23では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。実施例24では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APMの終濃度が100 μ MとなるようにAPM水溶液を培地に添加した。実施例25では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、APPSの終濃度が10 μ MとなるようにAPPS水溶液を培地に添加した。実施例26では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 α -TPNaの終濃度が10 μ Mとなるように α -TPNa溶液を培地に添加した。実施例27では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、 γ -TPNaの終濃度が10 μ Mとなるように γ -TPNa溶液を培地に添加した。実施例28では、メチルヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、メチルヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加し、イノシトール誘導体Aの終濃度が10⁻³% (V/V) となるようにイノシトール誘導体

A水溶液を培地に添加した。

また、比較例7では、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、DMSOを培地に添加した。比較例8では、ヘスペリジン終濃度が10⁻²% (V/V)、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、ヘスペリジンDMSO溶液を培地に添加した。

次いで、アミロイドβ (Sigma-Aldrich社製) を0.01% (V/V) DMSO水溶液に溶かしたアミロイドβ溶液を調製し、各培地におけるアミロイドβの終濃度が30 μMとなるように、該アミロイドβ溶液を各培地に添加した。

なお、参考例4では、DMSOの終濃度が0.1% (V/V) となるように、DMSOのみ添加し、アミロイドβ溶液は添加しなかった。

次いで、それぞれの培地を、48時間、37℃、5%CO₂下で培養した。

[0211] その後、培地を取り除いた各SH-SY5Y細胞に10 μM Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich社製) 水溶液を添加し、室温(25℃)で10分間静置した。溶液を除去後、各SH-SY5Y細胞をリン酸緩衝液(PBS、和光純薬社製)で洗浄し、蛍光顕微鏡下でクロマチン凝集によるアポトーシス様の強いHoechst蛍光の見られる細胞数(Hoechst (+)細胞)を計測した。独立試行の4実験で、各視野5000細胞以上を計測し、該4試験におけるHoechst (+)細胞の割合の平均値を、アポトーシスを起こしている細胞の割合とした。各例について、参考例4におけるアポトーシス細胞の割合を1.00とした時の相対値を算出し、その結果を表9に示した。

[0212]

[表9]

	オートファジー活性化剤 又はDMSO	追加成分	アミロイドβ	アポトーシス細胞の 割合
参考例 4	0.1%(V/V) DMSO	-	なし	1.00
比較例 7	0.1%(V/V) DMSO	-	あり	7.38
比較例 8	10 ⁻² %(V/V) ヘスペリジン	-		3.76
実施例 22	10 ⁻³ %(V/V) メチルヘスペリジン	-		4.02
実施例 23	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	-		2.17
実施例 24	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	100 μM APM		1.46
実施例 25	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM APPS		1.31
実施例 26	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM α-TPNa		1.20
実施例 27	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 μM γ-TPNa		1.22
実施例 28	10 ⁻² %(V/V) メチルヘスペリジン	10 ⁻³ %(V/V) イノシトール誘導体A		1.11

[0213] 表9に示す通り、参考例4および比較例7において、参考例4のDMSOのみ添加して培養したSH-SY5Y細胞に比べて、比較例7のさらにアミロイドβを添加して培養したSH-SY5Y細胞では、アポトーシス細胞の割合が増加することが確認できた。

[0214] 実施例22～28のオートファジー活性化剤とアミロイドβ溶液とを添加して培養したSH-SY5Y細胞では、比較例7のDMSOとアミロイドβ溶液とを添加して培養したSH-SY5Y細胞に比べて、アポトーシス細胞の割合が低下することが確認できた。

また、比較例8の終濃度10⁻²%(V/V)のヘスペリジンを添加して培養したSH-SY5Y細胞でも、比較例7のSH-SY5Y細胞に比べて、アポトーシス細胞の割合が低下していた。しかしながら、実施例23の終濃度10⁻²%(V/V)のメチルヘスペリジンを添加して培養したSH-SY5Y細胞の方が、アポトーシス細胞の割合の低下が顕著であった。

[0215] 実施例24～28の終濃度10⁻²%(V/V)のメチルヘスペリジン及び追加成分（APM、APPS、α-TPNa、γ-TPNa又はイノシトール

ル誘導体A)を添加して培養したSH-SY5Y細胞は、実施例23の終濃度 $10^{-2}\%$ (V/V)のメチルヘスペリジン添加して培養したSH-SY5Y細胞と比較して、アポトーシス細胞の割合がより低下していた。この結果から、メチルヘスペリジンと、追加成分(APM、APPS、 α -TPNa、 γ -TPNa又はイノシトール誘導体A)とを併用することにより、アミロイド β 存在下での神経細胞のアポトーシスをより抑制できることが確認できた。

[0216] [処方例]

オートファジー活性化用組成物として、外用剤の処方例1~5を表10に示した。

[0217] [表10]

材料	処方例1 (質量%)	処方例2 (質量%)	処方例3 (質量%)	処方例4 (質量%)	処方例5 (質量%)
メチルヘスペリジン	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
ブチレングリコール	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
ジプロピレングリコール	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
グリセリン	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
ペンチレングリコール	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
フェノキシエタノール	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
シクロヘキサン-1,4-ジカルボン酸 ビスエトキシジグリコール	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
APM	-	3.00	-	-	3.00
APPS	-	-	0.50	-	-
α -TPNa	-	-	-	2.00	-
イノシトール誘導体A	-	-	-	-	1.00
水	89.75	86.95	89.25	87.75	88.75
計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

産業上の利用可能性

[0218] 本発明により、オートファジーを効果的に活性化することができるオートファジー活性化剤、及び前記オートファジー活性化剤を含有するオートファジー活性化用組成物が提供される。

[0219] 以上、本発明の好ましい実施例を説明したが、本発明はこれら実施例に限定されることはない。本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。本発明は前述した説明によって

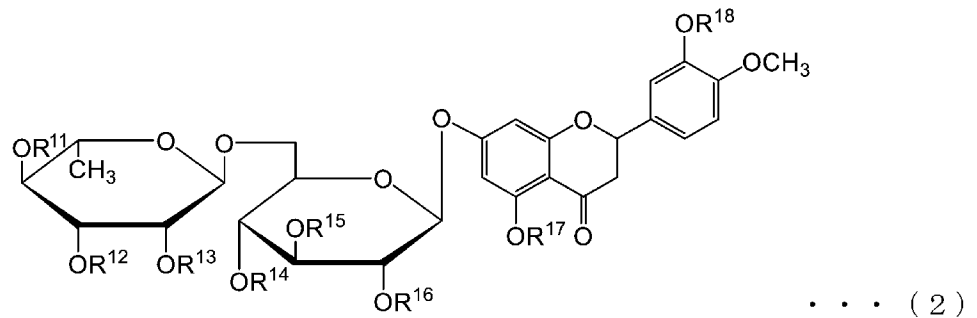
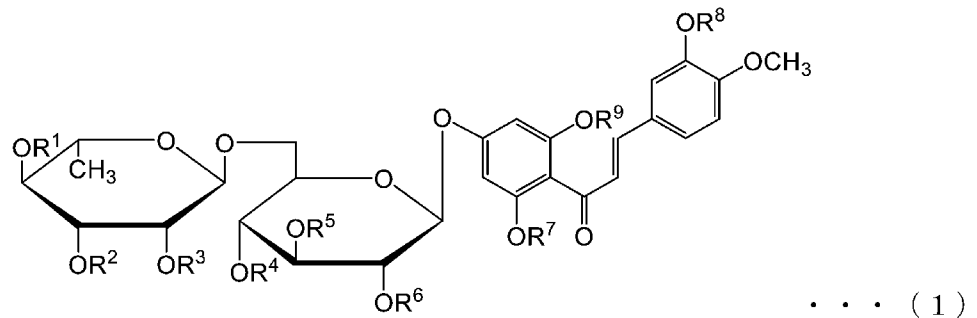
限定されることはなく、添付のクレームの範囲によってのみ限定される。

請求の範囲

[請求項1] メチルヘスペリジンを含む有効成分として含有する、オートファジー活性化剤。

[請求項2] 前記メチルヘスペリジンが、下記一般式(1)で表されるカルコン体メチルヘスペリジン、及び下記一般式(2)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンからなる群より選択される1種以上である、請求項1に記載のオートファジー活性化剤。

[化1]



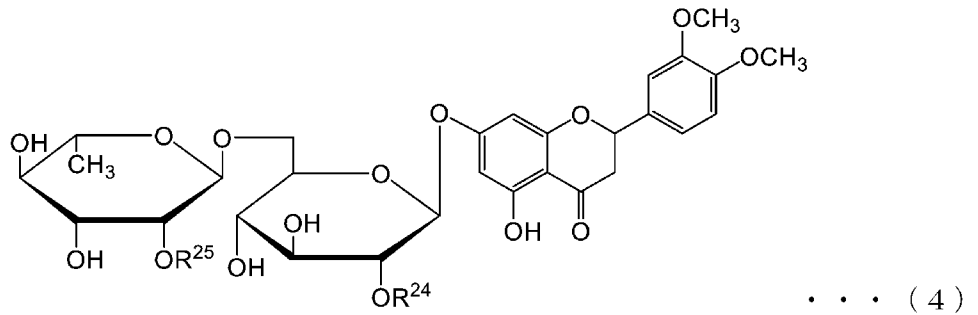
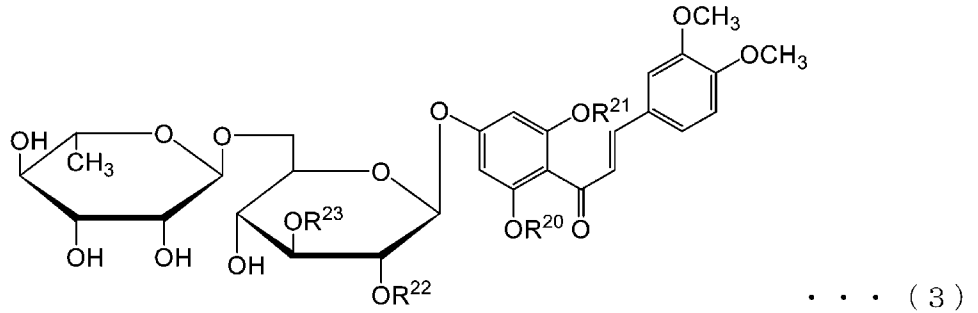
[式(1)中、R¹~R⁹は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。ただし、R¹~R⁹のうち、少なくとも1つはメチル基である。

式(2)中、R¹¹~R¹⁸は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。ただし、R¹¹~R¹⁸のうち、少なくとも1つはメチル基である。]

[請求項3] 前記メチルヘスペリジンが、下記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジン、及び下記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンからなる群より選択される1種以上である、請

求項2に記載のオートファジー活性化剤。

[化2]



[式(3)中、R²⁰~R²³は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。

式(4)中、R²⁴~R²⁵は、それぞれ独立に、メチル基または水素原子である。]

[請求項4]

前記一般式(3)で表されるカルコン体メチルヘスペリジンが、下記表1に示されるR²⁰~R²³の組み合わせを有するカルコン体-1~3からなる群より選択される1種以上である、請求項3に記載のオートファジー活性化剤。

[表1]

	R ²⁰	R ²¹	R ²²	R ²³
カルコン体-1	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃
カルコン体-2	H	CH ₃	CH ₃	H
カルコン体-3	H	CH ₃	H	H

[請求項5]

前記一般式(4)で表されるフラバノン体メチルヘスペリジンが、下記表2に示されるR²⁴~R²⁵の組み合わせを有するフラバノン体-1~4からなる群より選択される1種以上である、請求項3又は4

に記載のオートファジー活性化剤。

[表2]

	R ²⁴	R ²⁵
フラバノン体-1	CH ₃	CH ₃
フラバノン体-2	CH ₃	H
フラバノン体-3	H	H
フラバノン体-4	H	CH ₃

- [請求項6] L C 3 遺伝子の発現を促進する、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載のオートファジー活性化剤。
- [請求項7] A T G 5 遺伝子の発現を促進する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のオートファジー活性化剤。
- [請求項8] A T G 7 遺伝子の発現を促進する、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のオートファジー活性化剤。
- [請求項9] m T O R 遺伝子の発現を抑制する、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載のオートファジー活性化剤。
- [請求項10] アルツハイマー病の予防又は治療に用いる、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載のオートファジー活性化剤。
- [請求項11] 請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載のオートファジー活性化剤及び薬学的に許容される担体を含有する、オートファジー活性化用組成物。
- [請求項12] 前記メチルヘスペリジンの合計含有量が、オートファジー活性化用組成物全量に対して、0.01～2質量%である、請求項 1 1 に記載のオートファジー活性化用組成物。
- [請求項13] ビタミンC誘導体、及びビタミンE誘導体からなる群より選択される少なくとも1種のビタミン誘導体又はその塩をさらに含有する、請求項 1 1 又は 1 2 に記載のオートファジー活性化用組成物。
- [請求項14] 前記ビタミン誘導体又はその塩が、リン酸アスコルビル、リン酸アスコルビルの脂肪酸エステル、トコフェロールリン酸エステル、及びそれらの塩からなる群より選択される少なくとも1種である、請求項

13に記載のオートファジー活性化用組成物。

[請求項15] イノシトールに糖が結合したイノシトール誘導体をさらに含有する、請求項11～14のいずれか一項に記載のオートファジー活性化用組成物。

[請求項16] 前記糖が、グルコース又はグルコースを構成単位として含むオリゴ糖である、請求項15に記載のオートファジー活性化用組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/034285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<p>A61K 31/7034(2006.01)i; A61K 31/665(2006.01)i; A61K 31/7032(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i FI: A61K31/7034; A61K31/7048; A61K31/665; A61K31/7032; A61P25/28; A61P35/00; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/00; A61P1/04; A61K48/00</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>		
B. FIELDS SEARCHED		
<p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</p> <p>A61K31/7034; A61K31/665; A61K31/7032; A61K31/7048; A61K48/00; A61P1/04; A61P25/00; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28; A61P35/00</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>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</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CApus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHU, B. et al. Autophagic activation may be involved in the mechanism of hesperidin's therapeutic effects on cognitive impairment. Journal of the Neurological Sciences., 2015, 351, pp. 202-203 entire text	1-5, 11-16
A	entire text	6-10
Y	SAIPRASAD, G. et al. Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis. European Journal of Cancer., 2014, 50, pp. 2489-2507 entire text	1-5, 11-16
A	entire text	6-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
14 October 2021		26 October 2021
Name and mailing address of the ISA/JP		Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/034285

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2004-0065864 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 23 July 2004 (2004-07-23) entire text	1-5, 11-16
A	entire text	6-10
Y	JP 2018-58769 A (KOBAYASHI PHARMACEUTICAL CO LTD) 12 April 2018 (2018-04-12) claim 4, paragraphs [0012]-[0016]	1-5, 11-16
A	entire text	6-10
Y	JP 2020-125246 A (KAO CORP) 20 August 2020 (2020-08-20) paragraphs [0012]-[0019]	1-5, 11-16
A	entire text	6-10
P, X	RANJITHA, C. J. et al. Neuroprotective Effect of Hesperidin Methyl Chalcone against Aluminium Chloride Induced Alzheimer's Disease: In-Silico, In-Vitro, and In-Vivo Studies. International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research., 30 November 2020, 19(4), pp. 114-136 entire text	1-16
A	WO 2014/181716 A1 (SHOWA DENKO K.K) 13 November 2014 (2014-11-13) entire text	1-16
A	ALDONZA, M. B. D. et al. Suppression of MAPK Signaling and Reversal of mTOR-Dependent MDR1-Associated Multidrug Resistance by 21 α -Methylmelianodiol in Lung Cancer Cells. PLOS ONE., 2015, 10(6), e0127841(pp. 1-26) entire text	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/034285

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2004-0065864 A	23 July 2004	(Family: none)	
JP 2018-58769 A	12 April 2018	(Family: none)	
JP 2020-125246 A	20 August 2020	(Family: none)	
WO 2014/181716 A1	13 November 2014	(Family: none)	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 31/7034(2006.01)i; A61K 31/665(2006.01)i; A61K 31/7032(2006.01)i; A61K 31/7048(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; A61P 25/14(2006.01)i; A61P 25/16(2006.01)i; A61P 25/28(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i FI: A61K31/7034; A61K31/7048; A61K31/665; A61K31/7032; A61P25/28; A61P35/00; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/00; A61P1/04; A61K48/00</p>																	
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K31/7034; A61K31/665; A61K31/7032; A61K31/7048; A61K48/00; A61P1/04; A61P25/00; A61P25/14; A61P25/16; A61P25/28; A61P35/00</p> <p>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</p> <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> <p>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）</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			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																
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>ZHU, B. et al., Autophagic activation may be involved in the mechanism of hesperidin's therapeutic effects on cognitive impairment, Journal of the Neurological Sciences, 2015, 351, pp.202-203 全文</td> <td>1-5, 11-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>全文</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SAIPRASAD, G et al., Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis, European Journal of Cancer, 2014, 50, pp.2489-2507 全文</td> <td>1-5, 11-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>全文</td> <td>6-10</td> </tr> </tbody> </table>			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	ZHU, B. et al., Autophagic activation may be involved in the mechanism of hesperidin's therapeutic effects on cognitive impairment, Journal of the Neurological Sciences, 2015, 351, pp.202-203 全文	1-5, 11-16	A	全文	6-10	Y	SAIPRASAD, G et al., Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis, European Journal of Cancer, 2014, 50, pp.2489-2507 全文	1-5, 11-16	A	全文	6-10
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	ZHU, B. et al., Autophagic activation may be involved in the mechanism of hesperidin's therapeutic effects on cognitive impairment, Journal of the Neurological Sciences, 2015, 351, pp.202-203 全文	1-5, 11-16															
A	全文	6-10															
Y	SAIPRASAD, G et al., Hesperidin induces apoptosis and triggers autophagic markers through inhibition of Aurora-A mediated phosphoinositide-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin and glycogen synthase kinase-3 beta signalling cascades in experimental colon carcinogenesis, European Journal of Cancer, 2014, 50, pp.2489-2507 全文	1-5, 11-16															
A	全文	6-10															
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																	
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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	"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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				
* 引用文献のカテゴリー	"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																
"A" 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	"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																
"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	"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																
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献																
"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																	
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																
14.10.2021	26.10.2021																
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）																
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	伊藤 幸司 4C 9450																
	電話番号 03-3581-1101 内線 3452																

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	KR 10-2004-0065864 A (Lg Household & Health Care Ltd.) 23.07.2004 (2004 - 07 - 23)	1-5, 11-16
A	全文	6-10
Y	JP 2018-58769 A (小林製薬株式会社) 12.04.2018 (2018 - 04 - 12)	1-5, 11-16
A	請求項4, 段落[0012]-[0016] 全文	6-10
Y	JP 2020-125246 A (花王株式会社) 20.08.2020 (2020 - 08 - 20)	1-5, 11-16
A	段落[0012]-[0019] 全文	6-10
P, X	RANJITHA, C. J. et al., Neuroprotective Effect of Hesperidin Methyl Chalcone against Aluminium Chloride Induced Alzheimer's Disease: In-Silico, In-Vitro, and In-Vivo Studies, International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research, 2020.11.30, 19(4), pp.114-136 全文	1-16
A	WO 2014/181716 A1 (昭和電工株式会社) 13.11.2014 (2014 - 11 - 13)	1-16
A	ALDONZA, M. B. D. et al., Suppression of MAPK Signaling and Reversal of mTOR-Dependent MDRI-Associated Multidrug Resistance by 21 α -Methylmelianodiol in Lung Cancer Cells, PLOS ONE, 2015, 10(6), e0127841(pp.1-26) 全文	1-16

国際調査報告
特許ファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/034285

引用文献	公表日	特許ファミリー文献	公表日
KR 10-2004-0065864 A	23.07.2004	(ファミリーなし)	
JP 2018-58769 A	12.04.2018	(ファミリーなし)	
JP 2020-125246 A	20.08.2020	(ファミリーなし)	
WO 2014/181716 A1	13.11.2014	(ファミリーなし)	