

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5800368号
(P5800368)

(45) 発行日 平成27年10月28日(2015.10.28)

(24) 登録日 平成27年9月4日(2015.9.4)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 31/496 (2006.01) A 6 1 K 31/496
A 6 1 P 1/16 (2006.01) A 6 1 P 1/16

請求項の数 6 (全 16 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2012-515756 (P2012-515756) | (73) 特許権者 | 000163006 興和株式会社 愛知県名古屋市中区錦3丁目6番29号 |
| (86) (22) 出願日 | 平成23年5月18日 (2011.5.18) | (74) 代理人 | 100102668 弁理士 佐伯 憲生 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2011/002758 | (72) 発明者 | 柴田 治樹 東京都東村山市野口町2-17-43 興和株式会社東京創薬研究所内 |
| (87) 国際公開番号 | W02011/145340 | (72) 発明者 | 吉中 康展 東京都東村山市野口町2-17-43 興和株式会社東京創薬研究所内 |
| (87) 国際公開日 | 平成23年11月24日 (2011.11.24) | (72) 発明者 | 渋谷 公幸 東京都東村山市野口町2-17-43 興和株式会社東京創薬研究所内 |
| 審査請求日 | 平成26年2月24日 (2014.2.24) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 特願2010-115751 (P2010-115751) | | |
| (32) 優先日 | 平成22年5月19日 (2010.5.19) | | |
| (33) 優先権主張国 | 日本国(JP) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び／又は治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とする非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び／又は治療剤。

【請求項2】

2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物が、2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミドの一塩酸塩である請求項1記載の予防及び／又は治療剤。

【請求項3】

請求項1又は2に記載の化合物を有効成分とする非アルコール性脂肪性肝炎における肝臓中のコレステロールの低下剤。

【請求項4】

請求項1又は2に記載の化合物を有効成分とする肝臓中のトリグリセリドの低下剤。

【請求項5】

請求項1又は2に記載の化合物を有効成分とする肝臓中のTNF - 発現抑制剤。

【請求項 6】

請求項 1 又は 2 に記載の化合物を有効成分とする肝臓中のマクロファージ低下剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

2 型糖尿病等いわゆる生活習慣病の概念として、メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）が注目されている。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、脂質異常のうちいずれか 2 つ以上を併せ持つ状態と定義され、動脈硬化を進行させ、心筋梗塞や脳梗塞等の発症危険性を高めるものとされている。

10

【0003】

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease、以下 N A F L D と表記することがある。）は、飲酒や明らかな成因（ウイルスや自己免疫等）によらない脂肪性肝障害であり、近年はメタボリックシンドロームの肝における表現形として認識されているが、それ以外にも脂肪代謝やミトコンドリア代謝を障害する種々の病因が報告されている。N A F L D はさらに、肝細胞の脂肪沈着のみによる比較的予後の良好な単純性脂肪肝（simple steatosis）と、肝組織の線維化、肝硬変、肝細胞癌に至ることがある非アルコール性脂肪性肝炎（nonalcoholic steatohepatitis、以下 N A S H と表記することがある。）とに分類される（非特許文献 1）。

20

【0004】

N A S H の発生機序として、D a y らの「two hit theory」が広く知られている（非特許文献 2）。すなわち、脂肪肝の形成過程（1st hit）には、カロリー摂取・消費バランスの不均衡や、インスリン抵抗性を基盤とした代謝異常による肝細胞への脂質貯留が関与している。脂肪肝が N A S H に進むには、さらに 2nd hit として、エネルギー代謝負荷に基づく酸化ストレスの増大とそれに伴う自然免疫系の賦活が重要な役割を演じている。また、N A S H の病態を悪化させるものとして、代表的な炎症性サイトカインである T N F - α が知られている。肝組織中の T N F - α 発現を調べた報告によると、N A S H 以外の肥満患者（単純性脂肪肝を含む）に比べて N A S H 患者の T N F - α 発現は有意に上昇するという結果が得られている。さらに、N A S H 患者の中でも、肝線維化を伴う場合は、伴わない場合に比べて T N F - α 発現が有意に上昇していた。このように、N A S H 患者において、主に肝組織に浸潤したマクロファージや活性化 T リンパ球の分泌する T N F - α と、壊死性の炎症活性（necroinflammatory activity）及び線維化とは強い相関を示すことが報告されている（非特許文献 3）。

30

また、N A S H モデルマウスの肝臓では、マクロファージの異常な増加がみられることが報告されている（非特許文献 4）。

【0005】

N A S H の治療は、肥満、糖尿病、脂質異常症、高血圧といった生活習慣病に対する食事・運動療法を主体とした生活習慣改善が基本となる。しかし、実際には生活習慣の改善は難しく、N A S H の進展に重要な因子であると考えられている、インスリン抵抗性、酸化ストレス、脂質代謝異常、高血圧等を標的とした薬物治療が行われている。インスリン抵抗性改善薬としては、インスリン感受性の増強作用にかかわる核内受容体 P P A R γ のリガンドであるチアゾリジン系誘導体（ピオグリタゾンやロシグリタゾン等）、あるいは、インスリン抵抗性改善薬のピグアナイド系薬物（メトホルミン等）が、抗酸化剤としては、ビタミン E が、単独あるいはビタミン C との併用により治療薬として使用されている。また、脂質代謝異常の治療剤としては、P P A R α アゴニストであるフィブラート系薬物（フェノフィブラートやベサフィブラート等）、スタチン系製剤、プロブコール等が、高血圧治療剤としては、アンジオテンシン II タイプ 1 受容体拮抗薬（A R B）が、それぞれ治療薬として期待されている。特に、フィブラート系薬剤やスタチン系薬剤においては

40

50

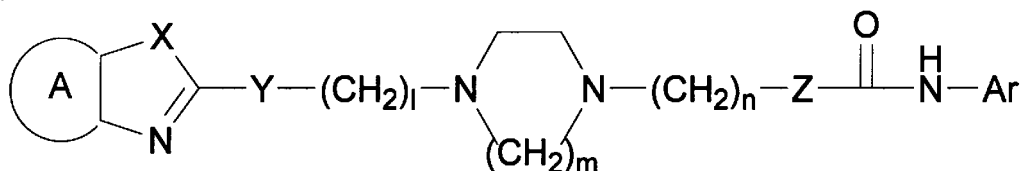
、それら薬剤がもつ抗炎症作用の面からも期待されている。しかし、エビデンスレベルの高い報告は少なく、推奨度の高い治療法は確立していない。世界的にメタボリックシンドロームの罹患者の増加が続いていることにより、NASHの患者数も今後増加することが予想され、治療法の確立が望まれている（非特許文献1、5）。

【0006】

一方、特許文献1には、次式(1)：

【0007】

【化1】



10

(1)

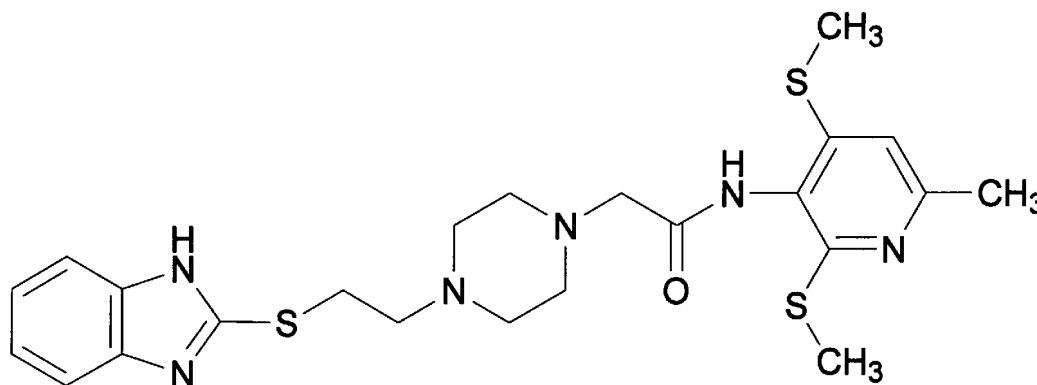
【0008】

で表される化合物、これらの塩又はこれらの溶媒和物が、アシル コエンザイム A コレステロール アシルトランスフェラーゼ (ACAT) 阻害作用を有しており、ACAT 阻害剤、細胞内コレステロール輸送阻害剤、血中コレステロール低下剤、マクロファージ泡沫化抑制剤として使用でき、高脂血症、動脈硬化症、頸部及び脳動脈硬化症、脳血管障害、虚血性心疾患、冠状動脈硬化症、腎硬化症、動脈硬化性腎硬化症、細動脈硬化性腎硬化症、悪性腎硬化症、虚血性腸疾患、急性腸間膜血管閉塞症、慢性腸管アンギーナ、虚血性大腸炎、大動脈瘤、閉塞性動脈硬化症 (ASO) 等の疾患の治療剤とし有用であることが記載されている。また、特許文献2には、次式(2)：

20

【0009】

【化2】



30

(2)

【0010】

で表される 2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミドこれらの塩又はこれらの溶媒和物が、粥状動脈硬化病巣の病変である不安定で破裂しやすいリッピドリッチプラークを安定化することが記載されており、リッピドリッチプラークの破裂に伴う血栓形成の防止、急性冠動脈症候群 (ACS) の予防及び / 又は治療、急性心筋梗塞の予防及び / 又は治療、不安定狭心症の予防及び / 又は治療、末梢動脈閉塞症の予防及び / 又は治療に有用であることが記載されている。しかしながら、いずれの特許文献においても、これらの化合物が NASH にどのような作用をするかについては記載も示唆もない。

40

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】WO1998/054153号パンフレット

【特許文献2】WO2005/020996号パンフレット

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Nugent C et al., Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol., 8, 432-41 (2007)

【非特許文献2】Day CP, et al, Gastroenterology, 114, 842-845 (1998)

【非特許文献3】Crespo J, et al., Hepatology, 34, 1158-63 (2001)

【非特許文献4】Kudo H, et al., Liver Int., 29, 988-996 (2009)

【非特許文献5】宇都浩文他, 最新医学, 97, 1683-87 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

世界的にメタボリックシンドロームの罹患者の増加が続いており、NASHの患者数も今後増加することが予想されているが、NASHの治療に関してはエビデンスレベルの高い報告は少なく、推奨度の高い治療法は確立されていないのが現状である。

本発明の課題は、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の予防、治療に有用な新たな非アルコール性脂肪性肝炎の予防、治療剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の予防、治療に有用な化合物を見出すべく、NASHのモデル動物であるLDL受容体ノックアウトマウスを用いてその予防、治療に有用な化合物の探索を行ったところ、全く意外にも2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド又はその塩が、血漿脂質に影響することなく、直接肝臓に作用し、肝臓中のコレステロール及びトリグリセリドを特異的に低下させ、NASHの特徴的病態である脂肪肝と肝の炎症を抑制することを見出し、本発明を完成した。

【0015】

すなわち、本発明は、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とする非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療剤を提供するものである。

【0016】

また、本発明は、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とする肝臓中のコレステロールの低下剤を提供するものである。

【0017】

さらに、本発明は、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とする肝臓中のトリグリセリドの低下剤を提供するものである。

【0018】

また、本発明は、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とする肝臓中のTNF-発現抑制剤を提供するものである。

10

20

30

40

50

【0019】

さらに、本発明は、2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とする肝臓中のマクロファージ低下剤を提供するものである。

【0020】

また、本発明は、必要な患者に2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物の有効量を投与することを特徴とする、非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療方法を提供するものである。

10

【0021】

さらに、本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療剤を製造するための、2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物の使用を提供するものである。

【発明の効果】

【0022】

本発明は、非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) の新たな予防・治療剤を提供するものである。

20

非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) は、エビデンスレベルの高い治療剤の報告は少なく、推奨度の高い治療法は確立されておらず、世界的にも患者数が今後増加することが予想されており、治療法の確立が望まれている。本発明は、血漿脂質に影響することなく、直接肝臓に作用し、肝臓中のコレステロール及びトリグリセリドを特異的に低化させることができ、さらに肝臓中の T N F - の発現を顕著に抑制し、肝臓中のマクロファージを顕著に減少させることができる新規な非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) の予防・治療剤を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、実施例1において、本発明の化合物A (3 m g / k g) を投与した時の血漿中総コレステロール (T C) (図1 A) 、及び血漿中トリグリセリド (T G) (図1 B) をそれぞれ示す図である。

30

【図2】図2は、実施例1において、本発明の化合物A (3 m g / k g) を投与した時の肝臓中の総コレステロール (T C) (図2 A) 、及び肝臓中のトリグリセリド (T G) (図2 B) を示す図である。

【図3】図3は、実施例1において、本発明の化合物A (3 m g / k g) を投与した時の肝臓中の炎症性のM1マクロファージマーカー (C D 1 1 c) の遺伝子発現量 (図3 A) 、及び肝臓中の炎症性サイトカイン (T N F -) の遺伝子発現量 (図3 B) を示す図である。

【図4】図4は、正常マウス群、C57BL/6N-NASHマウス(コントロール群)、及びC57BL/6N-NASHマウスに化合物Aを投与した群の血漿ALT値を示す。

40

【図5】図5は、正常マウス群、C57BL/6N-NASHマウス(コントロール群)、及びC57BL/6N-NASHマウスに化合物Aを投与した群の肝臓中TC含量を示す。

【図6】図6は、正常マウス群、C57BL/6N-NASHマウス(コントロール群)、及びC57BL/6N-NASHマウスに化合物Aを投与した群の肝臓中TG含量を示す。

【図7】図7は、正常マウス群、C57BL/6N-NASHマウス(コントロール群)、及びC57BL/6N-NASHマウスに化合物Aを投与した群の、それぞれの肝臓組

50

織（H E 染色）を写真撮影した結果を示す。原図はカラー写真である。図 7 中の は、脂肪滴を示す。

【図 8】図 8 は、M C D 食負荷 K K A ヲ マウスのコントロール群、及び M C D 食負荷 K K A ヲ マウスに化合物 A を投与した群の血漿 A L T 値を示す。

【図 9】図 9 は、M C D 食負荷 K K A ヲ マウスのコントロール群、及び M C D 食負荷 K K A ヲ マウスに化合物 A を投与した群の肝 T C 含量を示す。

【図 10】図 10 は、M C D 食負荷 K K A ヲ マウスのコントロール群、及び M C D 食負荷 K K A ヲ マウスに化合物 A を投与した群の肝 T G 含量を示す。

【図 11】図 11 は、M C D 食負荷 K K A ヲ マウスのコントロール群、及び M C D 食負荷 K K A ヲ マウスに化合物 A を投与した群の肝臓組織（H E 染色）を写真撮影した結果を示す。原図はカラー写真である。

10

【図 12】図 12 は、M C D 食負荷 K K A ヲ マウスのコントロール群、及び M C D 食負荷 K K A ヲ マウスに化合物 A を投与した群の肝臓組織（A z a n 染色）を写真撮影した結果を示す。原図はカラー写真である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明に用いる 2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和は、例えば、W O 1 9 9 8 / 0 5 4 1 5 3 号パンフレット、W O 2 0 0 5 / 0 2 0 9 9 6 号パンフレット、W O 2 0 0 4 / 0 7 6 4 4 1 号パンフレット等に記載の方法に従って製造することができる。また、これらの文献に記載の方法に準じて製剤化することもできる。

20

【0025】

本発明の、酸付加塩を形成する酸としては、薬学的に許容できるものであれば特に制限はないが、例えば、硫酸、塩酸、硝酸、リン酸、臭化水素酸等の無機酸；酢酸、乳酸、コハク酸、酒石酸、リンゴ酸、マレイン酸、クエン酸、フマル酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸等の有機酸等が挙げられる。好ましい酸としては無機酸を、より好ましい酸としては塩酸を挙げることができる。

【0026】

本発明の溶媒和物としては、水和物、アルコール和物（例えば、エタノール和物）等が挙げられる。好ましくは水和物を挙げることができる。

30

【0027】

本発明の 2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物としては、好ましくは、例えば 2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミドの一塩酸塩を挙げることができる。

【0028】

非アルコール性脂肪性肝炎（N A S H）においては、肝臓中の T C 及び T G が増加するだけでなく、肝臓中の炎症性サイトカイン T N F - の発現量が増加し（非特許文献 3 参照）、また肝臓中のマクロファージが増加すること（非特許文献 4 参照）が知られている。

40

後記実施例に示すとおり、本発明の 2 - [4 - [2 - (ベンズイミダゾール - 2 - イルチオ) エチル] ピペラジン - 1 - イル] - N - [2 , 4 - ビス (メチルチオ) - 6 - メチル - 3 - ピリジル] アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和は、N A S H のモデル動物である雄性 L D L 受容体 ノックアウトマウスにおいて、血漿中 T C 及び T G に有意な影響を与えない用量において、肝臓中の T C 及び T G の有意な低下、肝臓中の炎症性サイトカイン T N F - 発現、及びマクロファージ C D 1 1 c の有意な減少を示した。特に、血漿中 T C 及び T G に有意な影響を与えない用量において、肝臓中の T C 及び

50

T Gの有意な低下を示したことは(図1及び図2参照)、本発明の有効成分が従来報告されている作用とは異なる作用により、肝臓に直接作用していることを示すものであり、本発明により初めて見出された作用に基づくものであるということが出来る。

従って、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和は、ヒトを含む哺乳類の非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療剤として有用である。

【0029】

本発明は、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和物を有効成分とするものであり、本発明の有効成分は、後記する実施例に示すとおり、ヒトを含む哺乳類の非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療剤として有用であるだけでなく、同時にヒトを含む哺乳類の非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の予防及び/又は治療剤としても有用である。

また、後記する実施例に示すとおり、本発明の有効成分は、ヒトを含む哺乳類の肝臓中のコレステロールの低下剤、肝臓中のトリグリセリドの低下剤、肝臓中のTNF- α 発現抑制剤、及び肝臓中のマクロファージ低下剤としても有用である。

【0030】

本発明の医薬は、単独又は他の薬学的に許容される溶解剤、賦形剤、結合剤、希釈剤等の担体を用いて、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、粉末剤、ローション剤、軟膏剤、注射剤、座剤等の剤型とすることができる。これらの製剤は、公知の方法で製造することができる。例えば、経口投与用製剤とする場合には、トラガントガム、アラビアガム、ショ糖エステル、レシチン、オリーブ油、大豆油、PEG400等の溶解剤；澱粉、マンニトール、乳糖等の賦形剤；カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース等の結合剤；結晶セルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤；タルク、ステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤；軽質無水ケイ酸等の流動性向上剤；トウモロコシデンブンの希釈剤等を適宜組み合わせることで処方することにより製造することができる。

【0031】

本発明の医薬は、経口投与又は非経口投与により投与される。本発明の医薬の投与量は、患者の体重、年齢、性別、症状等によって異なるが、通常成人の場合、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミドとして、一日0.01~1000mg、好ましくは0.1~200mgを1~3回に分けて投与するのが好ましい。

【実施例】

【0032】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

【0033】

実施例1 LDL受容体ノックアウトマウスNASHモデルにおける作用

NASHの特徴的病態である脂肪肝と肝の炎症を発症することが知られている、Western diet負荷LDL受容体ノックアウトマウス(Yoshimatsu M. et al. Int J Exp Pathol., 85(6), 335-43 (2004))における効果を検討した。なお、本試験においては、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミドの一塩酸塩(以下、化合物Aという。)を用いた。

【0034】

1) 使用動物:

雄性LDL受容体ノックアウトマウス(B6.129S7-Ldlr^{tm1Her}/J、Jackson Laboratories)を実験に用いた。8週齢前後より12週間Western dietとしてTeklad Custom Research Diet (Harlan Teklad社、TD.88137)を自由摂取させ、NASHを発症させた。

2) 群構成:

群間で体重に差がない様に、コントロール群(塩酸加精製水)、及び化合物A 3 mg / kg (遊離体として)投与群に群分けした。

3) 薬物投与:

投与容量は10 mL / kg体重とし、コントロール群には塩酸加精製水を、化合物A投与群にはそれぞれの薬液を、6時間以上の間隔で午前・午後各1回経口投与した。8週齢前後よりWestern dietを負荷すると同時に投与を開始し、投与期間は12週間とした。

【0035】

4) 観察及び検査方法:

投与終了後、マウスを一晩絶食し、ペントバルビタールナトリウム(50 mg / kg)麻酔下に腹部大静脈より採血し、血漿を分取した。採血後肝臓を採取し、凍結保存した。一部は、遺伝子発現の解析のためISOGEN(ニッポンジーン(株))中で凍結保存した。

血漿中の総コレステロール(TC)及びトリグリセリド(TG)は、それぞれコレステロールEテストワコー及びトリグリセライドEテストワコー(いずれも和光純薬工業(株))を用いて測定した。肝脂質の測定は、以下の通り実施した。凍結保存した肝臓にクロロホルム:メタノール(2:1)を加え、ホモジナイズし、4℃で一晩以上静置した後、ろ過を行った。ろ液の一部を分取して蒸発乾固した後に、イソプロパノールで溶解してTC及びTG濃度を、それぞれコレステロールEテストワコー及びトリグリセライドEテストワコーを用いて測定した。

肝遺伝子の発現解析は、肝臓からRNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRでTNF- α の遺伝子、及びマクロファージのインテグリンファミリーに属する接着分子中のCD11cの遺伝子の、それぞれの発現を測定することにより行った。RNA抽出は、肝臓をISOGEN中でホモジナイズした後、説明書に従い行った。RNAの濃度は分光光度計(ND-1000、NanoDrop Technologies)を使用して測定した。total RNAよりHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)を用いてmRNAを逆転写し、cDNAを合成した。遺伝子発現解析は、SYBR green Iを用いたインターカラー法、またはTaqman Probeを用いた方法により行い、7900HT FastリアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)を使用して、realtime RT-PCRを行った。内部標準として β -actinを使用し、 β -actinによる補正を行い、各遺伝子の発現量を比較した。使用したプライマー及びプローブの配列は、以下に示した通りである。

β -actin:

forward (5' -AGCCATGTACGTAGCCATCCA-3')、
reverse (5' -TCACCGGAGTCCATCACAATG-3')、
probe (VIC5' -TGTCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCAC-3' TAMRA)、

CD11c:

forward (5' -CTGGATAGCCTTTCTTCTGCTG-3')、
reverse (5' -GCACACTGTGTCCGAATC-3')、

TNF- α :

forward (5' -CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3')、
reverse (5' -TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3')。

統計処理はWindows(登録商標)版SAS前臨床パッケージ(SAS Institute Japan)を使用して行った。

【0036】

5) 結果

化合物Aの3 mg / kg投与群は、図1に示すように、血漿中TC及びTGに有意な影響を与えなかったが、肝臓中のTC及びTGの有意な低下(図2)、肝臓中の炎症性サイ

10

20

30

40

50

トカインTNF - 発現及びマクロファージCD11cの有意な減少(図3)を示した。

すなわち、本発明の化合物Aは、血漿脂質に影響しない用量においても、直接肝臓に作用し、肝臓中のコレステロール及びトリグリセリドを低下させ、また、NASHの特徴的病態である脂肪肝と肝の炎症を抑制した。このことより、本発明の化合物AがNASHの予防・治療薬として有用であることが明らかとなった。

【0037】

実施例2 NASH - 肝癌モデルマウスにおける作用

NASH - 肝癌モデルマウス(商品名C57BL/6N - NASH マウス)は、株式会社ステリック再生医科学研究所で開発され(特開2009 - 178143号公報参照)、日本チャールスリバー株式会社で販売されているマウスである。このモデルマウスは、インスリン抵抗性の惹起と高脂肪食の負荷でNASHを発症する。また、このモデルマウスは、組織学的にヒトNASH病態を反映した変化を示し、脂肪肝(6週齢以前)からNASH(7週齢)、肝硬変(10週齢以降)、さらに肝癌(16週齢以降)へと進行するためNASHの治療薬の研究開発に有用なモデルであるといわれている(STAM Mice C57BL/6N-NASHモデルマウス資料(http://www.crj.co.jp/topics/pdf/69/6375030/B6N_NASH_leaflet_091019.pdf)参照)。

そこで、実施例1で用いたノックアウトマウスよりも、より重症度が高いとされているこのNASH - 肝癌モデルマウスを用いて化合物Aの作用を検討した。

1) 使用動物:

雄性C57BL/6N - NASH マウス(日本チャールスリバー)を実験に用いた。このマウスは、生後1 - 2日齢にストレプトゾトシンを投与し、4週齢より高脂肪食(D12492、Research Diet社)を負荷しているが、このマウスを6週齢で購入し、引き続き同じ高脂肪食で飼育した(以下、このマウスを、C57BL/6N - NASH マウスという。)。また、正常対照群として正常マウス(C57BL/6N、6週齢、日本チャールスリバー)を同時に購入し、普通食(CE - 2、日本クレア)で飼育した(以下、このマウスを、正常マウスという。)

2) 群構成:

C57BL/6N - NASHマウスをコントロール群、及び化合物A投与(100mg/kg)群として用いた。各群6匹とした。また、マウスの正常対照群として正常マウス(C57BL/6Nマウス)6匹を用いた。

3) 薬物投与:

化合物Aは、混餌投与した。投与は、すでにNASHを発症したC57BL/6N - NASHマウス7週齢より開始し、投与期間は5週間とした。

4) 観察及び検査方法:

投与終了後、マウスを4時間絶食させ、麻酔下に腹部大静脈より採血し、血漿を分取した。採血後肝臓を採取して、一部は凍結保存し、一部は常法通りパラフィン包埋を行った。血漿脂質・血漿ALTは、自動分析装置(Labospect003、日立)を用いて測定した。肝脂質の測定は、以下のように行った。すなわち、凍結保存した肝臓の一部にクロロホルム:メタノール(2:1)を加えてホモジナイズし、4で一晩以上静置した後、濾過を行った。濾液の一部を分取して蒸発乾固した後に、イソプロパノールで溶解して総コレステロール(TC)及びトリグリセリド(TG)濃度を、それぞれコレステロールEテストワコー及びトリグリセライドEテストワコーを用いて測定した。また、肝組織観察のためパラフィン切片を作成しHE染色標本作製した。

【0038】

5) 結果

これらの結果を図4から図7に示す。

化合物Aは血漿脂質に影響を与えなかった。肝障害の指標である血漿ALTは、正常マウスに比べNASH - 肝癌モデルマウスコントロール群で高値を示したが、これを化合物Aの100mg/kgは低下させた(図4)。肝中TCおよびTGも正常マウスに比べNASH - 肝癌モデルマウスのコントロール群で高値を示したが、これらを化合物Aは低

10

20

30

40

50

下させた(図5及び6)。さらに、NASH-肝癌モデルマウスのコントロール群で認められるNASHの特徴的病態である肝の脂肪滴沈着(図7中の矢印で示す)を化合物Aは抑制した(図7)。すなわち、本発明の化合物Aは、NASH発症後に投与を開始しても、血漿脂質に影響しない用量で直接肝臓に作用し、肝臓中のコレステロール及びトリグリセリドを低下させた。さらに、肝障害の指標である血漿ALTを低下させただけでなく、NASHの特徴的病態である脂肪肝を抑制した。このことより、本発明の化合物AがNASHの治療薬として有用であることが明らかとなった。

【0039】

実施例3 MCD食負荷KK-A^yマウスにおける作用

齧歯類にメチオニン-コリン欠乏食(MCD食)を負荷したモデルは、NASHのモデルとして汎用されている(Hebbard L, George J.: Animal models of nonalcoholic fatty liver disease Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2011 Jan;8(1):35-44. Epub 2010 Nov 30. 参照)。その中でも、KK-A^yマウスを用いたモデルは、著明な脂肪肝炎と線維化が生じることが知られており(Okumura K., Ikejima K., Kon K., Abe W., Yamashina S., Enomoto N., Takei Y. and Sato N. (2006) Exacerbation of dietary steatohepatitis and fibrosis in obese, diabetic KK-Ay mice Hepatology Research 2006 36:3 (217-228) 参照)、NASHに対する薬物の作用を検討するのに優れたモデルであると考えられる。

そこで、本モデルに対する化合物Aの作用を検討した。

1) 使用動物:

雄性KK-A^yマウス(KK-A^y/Tajcl、12週齢、日本クレアより購入)を実験に用いた。MCD食を7週間負荷しNASHを発症させた。

2) 群構成:

コントロール群、化合物Aの30mg/kg投与群、及び同200mg/kg投与群に群分けした。薬物は混餌投与した。投与期間は7週とした。

3) 薬物投与:

化合物Aは、混餌投与した。投与はMCD食負荷と同時に開始した。

4) 観察及び検査方法:

実施例2に記載のNASH-肝癌モデルマウスと同様に行ったが、肝組織観察HE染色標本に加え、Azan染色標本も作製した。

【0040】

5) 結果

これらの結果を図8から図12に示す。

化合物Aは血漿脂質に影響を与えなかった。肝障害の指標である血漿ALTを化合物A 200mg/kgは著明に低下させた(図8参照)。肝中TCおよびTGを化合物Aは著明に低下させた(図9及び図10参照)。さらに、NASHの特徴的病態である肝の脂肪滴沈着および線維化を化合物Aは抑制した(図11及び図12参照)。すなわち、本発明の化合物Aは、血漿脂質に影響しない用量において、直接肝臓に作用し、肝臓中のコレステロール及びトリグリセリドを低下させた。さらに、肝障害の指標である血漿ALTを低下させただけでなく、NASHの特徴的病態である脂肪肝・肝の線維化を抑制した。このことより、本発明の化合物AがNASHの予防・治療薬として有用であることが明らかとなった。

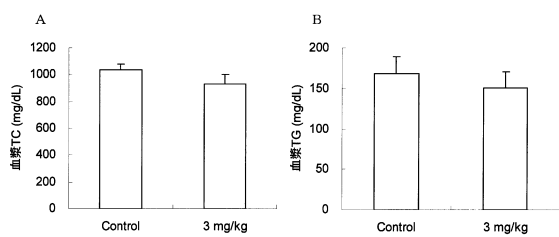
【産業上の利用可能性】

【0041】

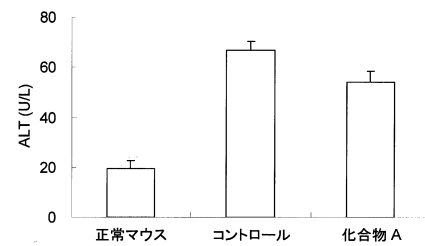
本発明は、2-[4-[2-(ベンズイミダゾール-2-イルチオ)エチル]ピペラジン-1-イル]-N-[2,4-ビス(メチルチオ)-6-メチル-3-ピリジル]アセトアミド若しくはその酸付加塩、又はこれらの溶媒和が、肝臓選択的な総コレステロール低下作用及びトリグリセリド低下作用を有していること、肝臓中の炎症性サイトカンの発現抑制及び炎症性マクロファージの減少作用を有していることを初めて見出し、低分子性の非アルコール性脂肪性肝炎の予防及び/又は治療剤を提供するものである。本発明は、

医薬品原体として利用可能であることから製薬工業において有用であり、産業上の利用可能性を有している。

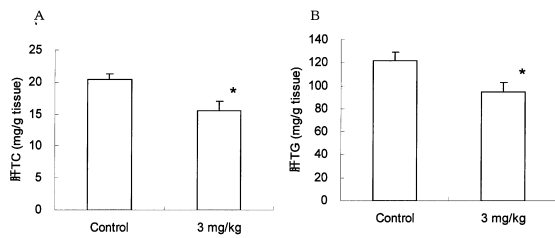
【図 1】



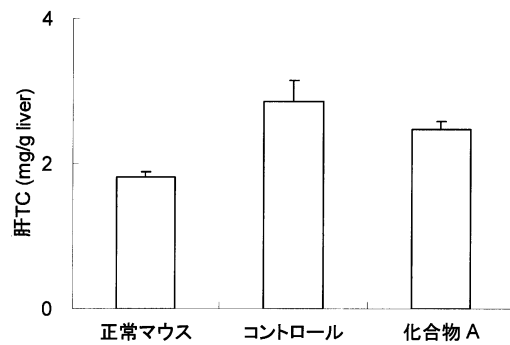
【図 4】



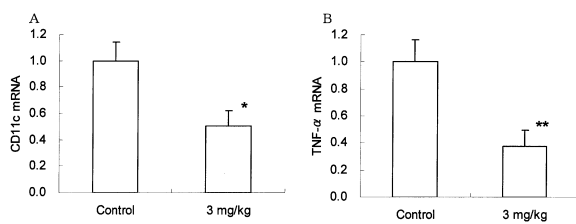
【図 2】



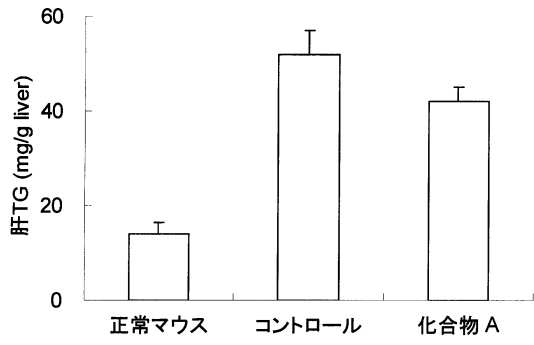
【図 5】



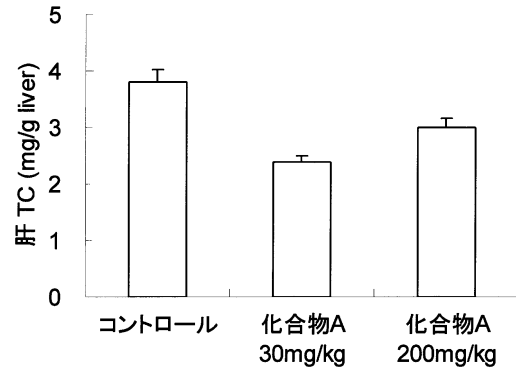
【図 3】



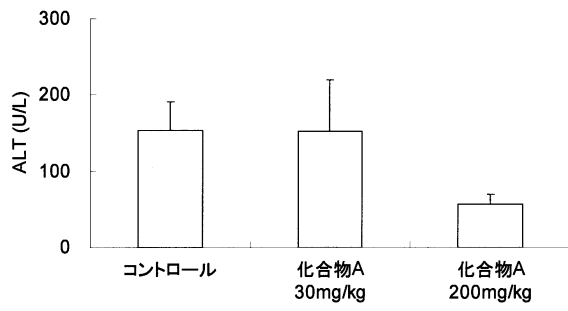
【 図 6 】



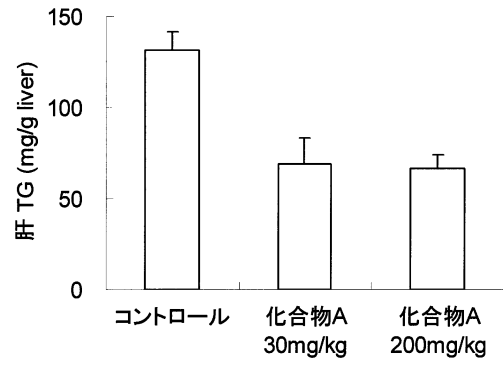
【 図 9 】



【 図 8 】

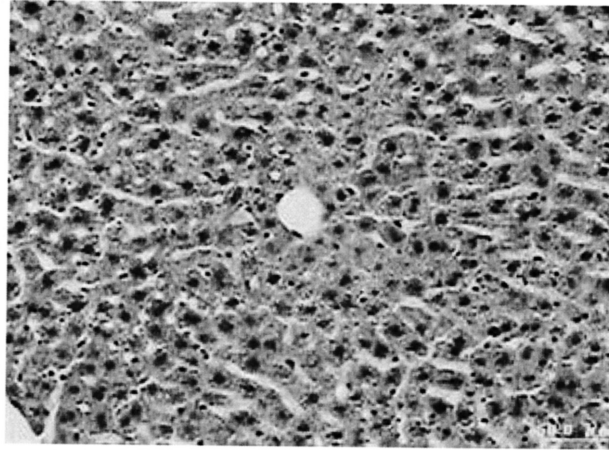


【 図 10 】

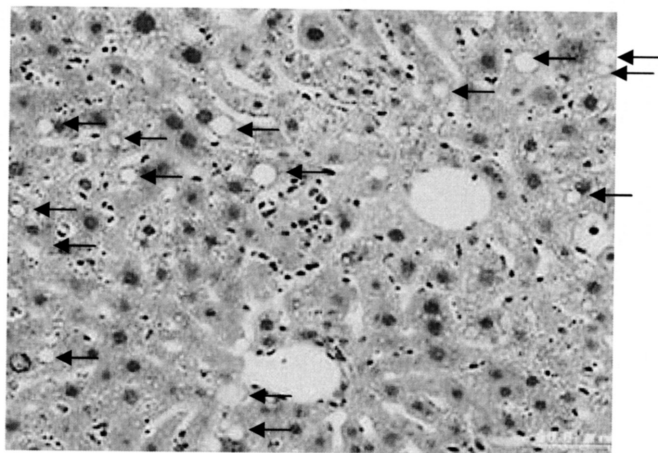


【図7】

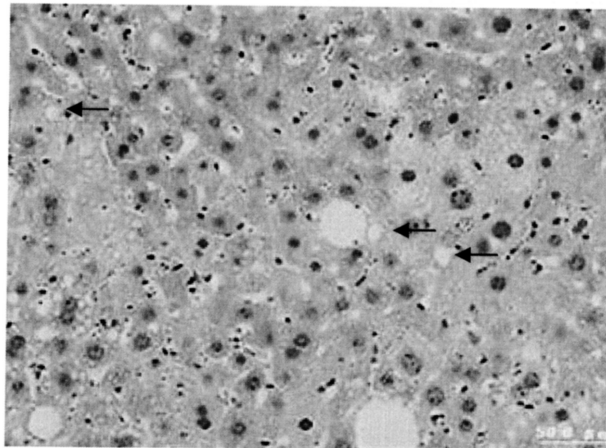
A)正常マウス



B)コントロール

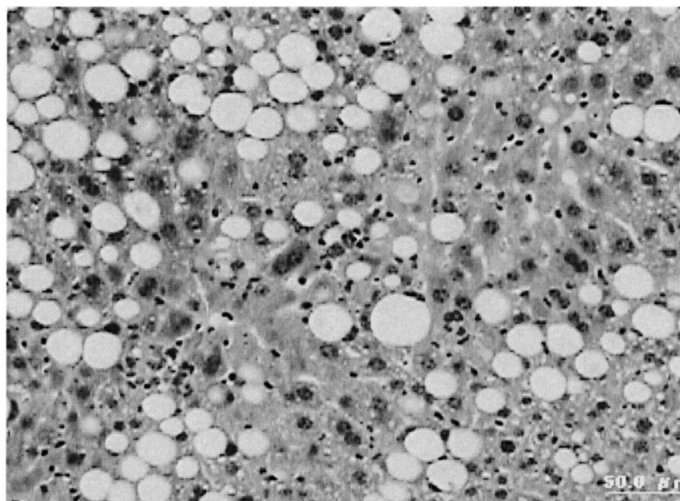


C)化合物 A

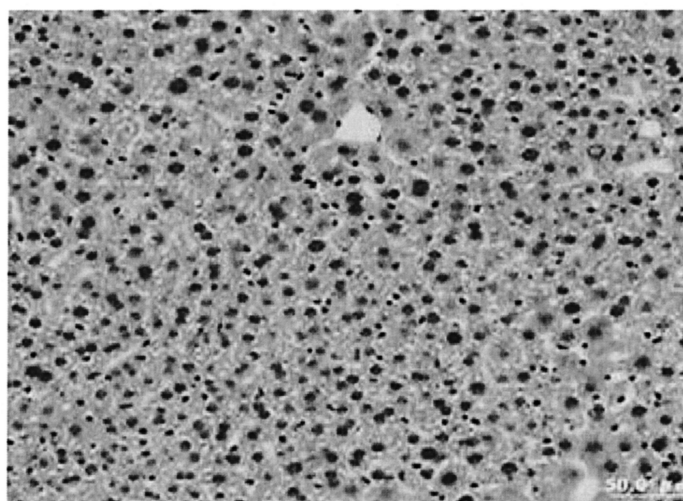


【図11】

A) コントロール

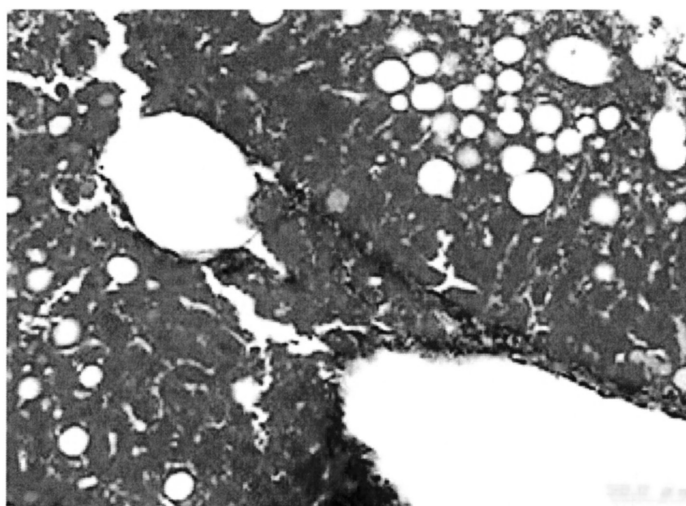


B) 化合物 A
200 mg/kg

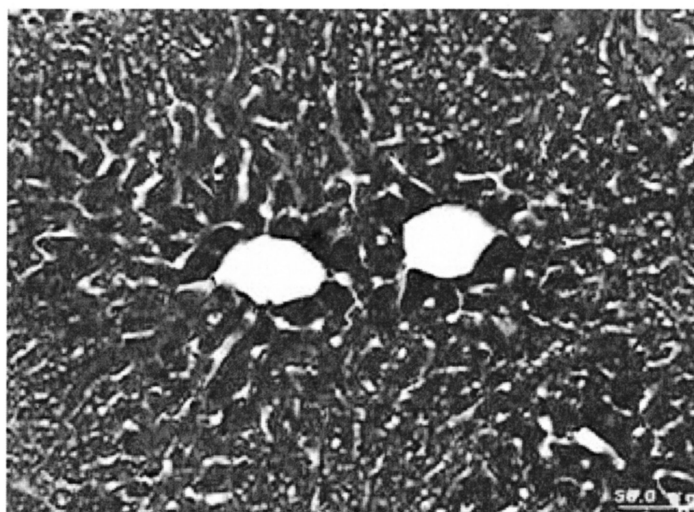


【図12】

A) コントロール



B) 化合物 A
200 mg/kg



フロントページの続き

審査官 井上 明子

- (56)参考文献 国際公開第98/054153(WO, A1)
国際公開第2005/020996(WO, A1)
Atherosclerosis, 2007年, Vol.191, No.2, p.290-297
日本臨牀, 2009年, 第67巻, 第2号, 第344 - 349頁
治療学, 2009年, 第43巻, 第10号, 第109 - 114頁
Therapeutic Research, 1998年, Vol.19, No.11, p.3447-3454

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 31/00 - 33/44
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)