

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-500841

(P2025-500841A)

(43)公表日 令和7年1月15日(2025.1.15)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/164 (2006.01)	A 6 1 K 31/164	4 C 0 7 6
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	4 C 2 0 6
A 6 1 P 3/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 K 47/14 (2017.01)	A 6 1 K 47/14	
A 6 1 K 47/44 (2017.01)	A 6 1 K 47/44	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全34頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2024-535342(P2024-535342)	(71)出願人	506115514
(86)(22)出願日	令和4年12月12日(2022.12.12)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシテ
(85)翻訳文提出日	令和6年7月5日(2024.7.5)		ィ オブ カリフォルニア
(86)国際出願番号	PCT/US2022/081372		The Regents of the U
(87)国際公開番号	WO2023/114722		niversity of Califo
(87)国際公開日	令和5年6月22日(2023.6.22)		rnia
(31)優先権主張番号	63/265,314		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9
(32)優先日	令和3年12月13日(2021.12.13)		4 6 0 7 - 5 2 0 0, オークランド, フ
(33)優先権主張国・地域又は機関			ランクリン ストリート 1 1 1 1, 1 2
	米国(US)		番 フロア
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100114775
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),		弁理士 高岡 亮一
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(	(74)代理人	100121511
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,		弁理士 小田 直
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(74)代理人	100202751
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オレオイルエタノールアミドの生物学的に利用可能な製剤による肝臓脂肪変性の治療方法

(57)【要約】

対象の肝臓における脂質蓄積を低減する生物学的に利用可能な製剤でオレオイルエタノールアミド(OEA)を送達するための組成物及び方法。本明細書に記載されるのは、この天然脂質アミドが抗脂肪変性効果を発揮する、肝実質への化合物の輸送を可能にする新規OEA製剤である。この製剤は、非製剤化OEAまたはOEAの異なる製剤(Levagen(登録商標)-OEA)のいずれよりも、経口生物学的利用能が著しく高い。さらに、新規OEA製剤の経口投与によって、ヒト代謝症候群のマウスモデルで生じる肝臓脂肪変性が減弱する。組成物は、ヒト非アルコール性肝臓脂肪変性の治療に有用である。

【選択図】 図7D

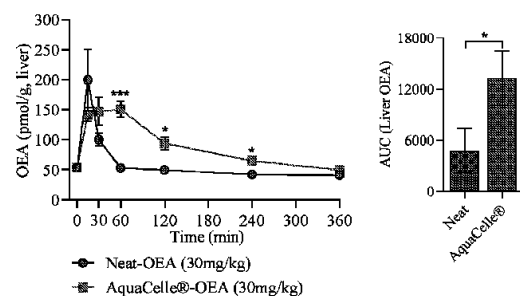


FIG. 7D

10

20

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

5～15重量%のオレオイルエタノールアミド（OEA）と、85～95%の自己乳化型薬物送達システム（SEDDS）とを含む組成物であって、前記SEDDSが、中鎖トリグリセリドを含むキャリアオイル、柑橘油、及びレシチンを含み、前記OEAの生物学的利用能の少なくとも2倍の増加を促進する、前記組成物。

【請求項 2】

前記SEDDSが、AquaCell（登録商標）を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

請求項2に記載の組成物であって、10～12%のOEA及び88～90%のAquaCell（登録商標）を含む、前記組成物。

【請求項 4】

請求項2に記載の組成物であって、11%のOEA及び89%のAquaCell（登録商標）を含む、前記組成物。

【請求項 5】

オレオイルエタノールアミド（OEA）を、それを必要とする対象の肝臓に送達する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物の経口投与を含む、前記方法。

【請求項 6】

対象における肝臓脂肪変性を軽減する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物の経口投与を含む、前記方法。

【請求項 7】

対象における非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）を治療する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物の経口投与を含む、前記方法。

【請求項 8】

対象における非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を治療する方法であって、請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物の経口投与を含む、前記方法。

【請求項 9】

前記対象が、ヒトである、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

請求項1～4のいずれか1項に記載の組成物が、腸溶コーティングカプセルで投与される、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

前記組成物が、4～24週間、1日1回投与される、請求項5～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

前記組成物が、4～24週間、1日2回投与される、請求項11に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2021年12月13日出願の米国仮特許出願第63／263,314号の利益を主張するものであり、その内容全体は参照により本出願に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は、西洋諸国における慢性肝疾患の最も一般的な原因である。非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は、C型肝炎に取って代わり、肝移植の主な適応症になると予測されている。NAFLDは肥満と関連しており、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）及び末期肝疾患に進行する場合がある。NAFLDまたはNASHに対する承認された薬物治療は存在しない。動物及びヒトの研究によると、オレオイルエタノールアミド（OEA）はNAFLDの治療に適用を見出す可能性があるこ

10

20

30

40

50

とが示唆されるが、この天然に存在する分子の臨床使用は、好ましくない物理化学的特性と急速な酵素媒介性分解との組み合わせにより生物学的利用能が不十分であることによって大きく制限されている。

【0003】

食後、上部小腸の吸収性上皮は、食事中脂質の加水分解から得られたオレイン酸の一部を、OEAの生成に転用する (Schwartz et al., 2008, DiPatrizio and Piomelli, 2015)。OEAは腸内の局所メッセンジャーとして作用し、末梢感覚求心性神経の動員 (Rodriguez de Fonseca et al., 2001) と、オキシトシン及びヒスタミンを神経伝達物質として利用する中枢経路の活性化 (Gaetani et al., 2010, Provensi et al., 2014) を伴う機序を通じて食物摂取量を低減させる。数連の証拠から、OEAは、リガンド作動性転写因子であるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体- α (PPAR- α) と会合することでこの応答を開始することが示唆されている。第1に、OEAは、これまでに同定されている最も強力な天然に存在するPPAR- α アゴニストの1つである (親和定数、KD、40 nM; 有効濃度の中央値、EC50、120 nM) (Fu et al., 2003, Astarita et al., 2006a)。第2に、OEAの満腹感誘発性効果は、PPAR- α の欠失により消失し、合成PPAR- α アゴニストにより模倣され、腸粘膜におけるPPAR- α 調節転写の増加と関連している (Fu et al., 2003)。第3に、ラット小腸におけるOEA生成のウイルス媒介性増強により、食物摂取量が減少し、同時に、PPAR- α 標的遺伝子の局所発現が増加する (Fu et al., 2008)。最後に、一魚、ヘビ、及びげっ歯類を含む種々の脊椎動物種の小腸におけるOEAレベルは、絶食状態の ≤ 50 nMから摂食後の ≥ 250 nMに上昇し (Astarita et al., 2006b, Fu et al., 2007, Tinoco et al., 2014, Igarashi et al., 2017)、これは、PPAR- α の活性化と適合する濃度範囲である (Fu et al., 2003, Astarita et al., 2006a)。要するに、入手可能なデータは、OEAが、満腹感の制御に関与する小腸PPAR- α の生理学的に関連する内因性アゴニストであることを示している (DiPatrizio and Piomelli, 2015)。

【0004】

摂食によって、肝臓でもOEA生成が調節されるが、腸で見られるものとは逆方向である：肝臓のOEAレベルは絶食状態で上昇し、摂食後に低下する (Fu et al., 2007, Izzo et al., 2010)。これらの変化の分子の根拠及び生理学的意義は、詳細に調査されてきた。研究により、絶食は、肝外の肥満細胞を刺激してヒスタミンを分泌させ、ヒスタミンが門脈循環を介して肝臓に入り、Gタンパク質結合H1受容体を活性化させて局所OEA生合成を誘発することが示されている (Misto et al., 2018)。このプロセスを妨害する遺伝的または薬理学的操作は脂肪分解には影響しないが、絶食誘発性ケトン体生成を著しく減弱させ、これにより、全身脂質恒常性における肥満細胞由来ヒスタミン及び肝臓OEA生成のこれまで考えられなかった調節的役割が明らかになった (Misto et al., 2018)。このような役割と一致して、OEAの亜慢性腹腔内投与によって、肥満Zuckerラット (Fu et al., 2005) 及び非アルコール性脂肪肝疾患のラットモデル (Li et al., 2015) における肝臓脂肪変性が減弱される。さらに、腹腔内OEA投与によって、単離ラット肝細胞における脂肪酸酸化が刺激され、生きたラットにおけるケトン体生成 (ケトン生成) が促進される (Guzman et al., 2004)。最後に、亜慢性腹腔内OEA投与によって、食餌誘発性肥満マウスの肝臓における脂質蓄積、炎症反応、及び線維症が低減する (Lin et al., 2022; PMID: 35691287)。

【0005】

腹腔内OEA投与は、肝臓脂肪変性のげっ歯類モデルでは明らかに有益であるが、NA

10

20

30

40

50

F L Dの経口治療薬としてのO E Aの臨床適用は、2つの重要な要因によって妨げられている：(1)経口投与後、O E Aは脂肪酸アミドヒドロラーゼ及びその他の脂質アミダーゼによって触媒され、インビボで急速に分解される(P i o m e l l i , 2 0 1 3 ; P M I D : 2 3 5 6 7 0 5 8) ; 及び(2) O E Aは、薬物様特性が限定されている親油性分子である。

【0006】

O E Aが生物学的に利用可能となる様式で、特に、O E Aを肝臓に対して有効かつ利用可能にする様式で、O E Aを送達する手段が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

本明細書に記載の組成物及び方法は、対象の肝臓における脂質の蓄積を低減する生物学的に利用可能な製剤でO E Aを送達する手段を提供する。本明細書に記載されるのは、この天然脂質アミドが抗脂肪変性効果を発揮する、肝実質への化合物の輸送を可能にする新規O E A製剤である。この製剤は、非製剤化(「ニート」) O E AまたはO E Aの異なる製剤(L e v a g e n (登録商標) - O E A)のいずれよりも、経口生物学的利用能が著しく高い。さらに、新規O E A製剤の経口投与によって、ヒト代謝症候群のマウスモデルで生じる肝臓脂肪変性が減弱する。本明細書に記載のデータは、N A S Hを含むヒトN A F L Dの治療における組成物の使用の裏付けとなる。

【0008】

本明細書では、5～15重量%のO E Aと85～95%の自己乳化型薬物送達システム(S E D D S)を含む組成物について説明する。いくつかの実施形態では、S E D D Sは、中鎖トリグリセリドを含むキャリアオイル、柑橘油、及びレシチンを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、O E Aの生物学的利用能の少なくとも2倍の増加を促進する。いくつかの実施形態では、組成物は、O E Aの生物学的利用能の少なくとも3倍の増加を促進する。いくつかの実施形態では、S E D D Sは、A q u a C e l l e (登録商標)を含む。

【0009】

A q u a C e l l e (登録商標)として市販されているS E D D Sは、2019年12月12日に公開された米国特許公開第20190374494号に記載されている。B r e m m e l l , K . E . ; e t a l , A s e l f - e m u l s i f y i n g O m e g a - 3 e t h y l e s t e r f o r m u l a t i o n (A q u a C e l l e) s i g n i f i c a n t l y i m p r o v e s e i c o s a p e n t a e n o i c a n d d o c o s a h e x a e n o i c a c i d b i o a v a i l a b i l i t y i n h e a l t h y a d u l t s . E u r . J . N u t r . 2 0 1 9 , 5 9 , 2 7 2 9 - 2 7 3 7も参照のこと。栄養補助食品の送達方法に関するさらなる情報は、S u b r a m a n i a n , P . L i p i d - B a s e d N a n o c a r r i e r S y s t e m f o r t h e E f f e c t i v e D e l i v e r y o f N u t r a c e u t i c a l s . M o l e c u l e s 2 0 2 1 , 2 6 , 5 5 1 0 <https://doi.org/10.3390/molecules26185510>に見出すことができる。

【0010】

いくつかの実施形態では、組成物は、10～12%のO E A及び88～90%のA q u a C e l l e (登録商標)を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、11%のO E A及び89%のA q u a C e l l e (登録商標)を含む。いくつかの実施形態では、キャリアオイルは最大約11重量%を占め、柑橘油は最大約10重量%を占め、及びレシチンは最大約11重量%を占める。

【0011】

いくつかの実施形態では、S E D D Sの組成パーセンテージは、組成物が水性環境中に分散した場合に、平均直径約1～20マイクロメートルを有するミセルの集団を形成するようなものである。いくつかの実施形態では、組成物は、平均直径約5～15マイクロメ

10

20

30

40

50

ートルを有するミセルの集団を形成する。いくつかの実施形態では、組成物は、平均直径約12～13マイクロメートルを有するミセルの集団を形成する。

【0012】

いくつかの実施形態では、組成物は抗酸化剤をさらに含む。代表的な抗酸化剤としては、レシチン、パルミチン酸アスコルビル、d-アルファートコフェロール、d-ル-アルファートコフェロール、d-アルファートコフェリルアセテート、d-ル-アルファートコフェリルアセテート、コハク酸d-アルファートコフェリル、コハク酸d-ル-アルファートコフェリル、ビタミンE及びその誘導体、オリーブポリフェノール、藻類ポリフェノール、及びそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、0～0.5重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.01重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.02重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.1重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.5重量%の濃度で存在する。

10

【0013】

いくつかの実施形態では、組成物は、賦形剤をさらに含む。代表的な賦形剤としては、コロイダルシリカ、コーンスターチ、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、マルトデキストリン、ステアリン酸マグネシウム、水酸化マグネシウム、微結晶性セルロース、デキストリン、ソルビトール、マンニトール、及びトレハロースが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、賦形剤は、約30重量%～約90重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、賦形剤は、約30重量%～約90重量%の濃度で存在する。

20

【0014】

本明細書ではまた、オレオイルエタノールアミド（OEA）を、それを必要とする対象の肝臓に送達する方法が記載される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の組成物の経口投与を含む。また、対象における肝臓脂肪変性を軽減する方法、ならびに対象における非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）を治療する方法、及び対象における非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を治療する方法が記載される。いくつかの実施形態では、これらの方法はそれぞれ、本明細書に記載の組成物の経口投与を含む。

【図面の簡単な説明】

30

【0015】

【図1】門脈循環及び肝臓における絶食誘発性ヒスタミンシグナル伝達に対するHFD曝露の効果を示す。（A、B）門脈血漿中のヒスタミン同定を示す。（A）門脈血漿中の真正 $[^2\text{H}_4]$ -ヒスタミン及びネイティブヒスタミンの溶出を示す代表的なLC/MS-MSトレースである。（B）門脈血漿中の診断イオン $[\text{M}-\text{NH}_3]^+$ （ $m/z=95.1$ 及び $m/z=99.1$ ）の存在を示すネイティブ及び $[^2\text{H}_4]$ -ヒスタミンの質量スペクトルである。（C～E）飼料給餌マウス（白抜き記号）及びHFD給餌（塗りつぶし記号）マウスにおける自由摂食（丸）、食物欠乏（正方形）、及び食物欠乏／再摂食（三角形）の効果を示す。（C）門脈血漿中のヒスタミン濃度を示す。（D）肝臓におけるヒスタミン H_1 受容体（ H_1r ）の転写を示す。（E）肝臓におけるヒスタミン H_2 受容体（ H_2r ）の転写を示す。（F）肝臓におけるヒスタミン H_4 受容体（ H_4r ）の転写を示す。データは、平均 $\pm$ SEM（ $n=4\sim6$ ）として表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定を使用して分析した。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 。

40

【図2】肝臓組織における絶食誘発性OEAシグナル伝達へのHFD曝露の効果を示す。

（A）肝臓におけるOEA及びその局所異性体VEAの存在を示す代表的なLC/MS-MSトレースを示す。（B～F）飼料給餌マウス（白抜き記号）及びHFD給餌マウス（塗りつぶし記号）における自由摂食（丸）、食物欠乏（正方形）、及び食物欠乏／再摂食（三角形）の効果を示す。（B）肝臓におけるOEA含有量である。（C）肝臓におけるAEA含有量である。（D）肝臓におけるPEA含有量である。（E）肝臓におけるNA

50

PE-PLD (Napepld) 転写を示す。(F) 肝臓におけるFAAH (Faah) 転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~9) として表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定を使用して分析した。*または# p<0.05、**または## p<0.01、***または### p<0.001。VEA、バクセノイルエタノールアミド。

【図3A】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。インサイチュの肝臓(左)と、オイルレッドO(左から2番目)、BODIPY(左から3番目)、及びPSR(右)で染色した肝臓切片の代表的画像である。

【図3B】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。HFDに曝露したVEH治療(白抜き記号)またはOEA治療(塗りつぶし記号)マウスの肝臓におけるBODIPY蛍光の定量を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3C】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。HFDに曝露したVEH治療(白抜き記号)またはOEA治療(塗りつぶし記号)マウスの肝臓におけるPSR蛍光の定量を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3D】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。HFDに曝露したVEH治療(白抜き記号)またはOEA治療(塗りつぶし記号)マウスの肝臓における総トリグリセリド含有量である。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3E】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。インターロイキンIL6タンパク質を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3F】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。IL1bの肝臓転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3G】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Ccl2の肝臓転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3H】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Ccl1a1の肝臓転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3I】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Hmox1の肝臓転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3J】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Nrf1の肝臓転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*** p<0.001。VEH、ビヒクル。

【図3K】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Tnfαの肝臓転写を示す。データは、平均±SEM (n=4~6) として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* p<0.05、** p<0.01、*

10

20

30

40

50

* * $p < 0.001$ 。VEH、ビヒクル。

【図3L】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Tgf β 1の肝臓転写を示す。データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 4 \sim 6$)として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* $p < 0.05$ 、* * $p < 0.01$ 、* * * $p < 0.001$ 。VEH、ビヒクル。

【図3M】HFD給餌マウスの肝臓に対するVEHまたはOEA投与の効果を示す。Nqo1の肝臓転写を示す。データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 4 \sim 6$)として表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。* $p < 0.05$ 、* * $p < 0.01$ 、* * * $p < 0.001$ 。VEH、ビヒクル。

【図4】HFDに曝露された雄型C57BL/6Jマウスは、肥満、高血糖、及び肝臓脂肪変性を発症する。(A)定型的な飼料(白抜き記号)またはHFD(塗りつぶし記号)に曝露されたマウスの体重増加の経時変化。(B)飼料給餌マウスまたはHFD給餌マウスの心血漿中の絶食グルコース濃度。(C)飼料給餌またはHFD給餌マウスの肝臓における総トリグリセリド含有量。(D)オイルレッドOで染色した、飼料給餌マウス(左)またはHFD給餌マウス(右)の肝臓組織切片の代表的画像を示す。データは平均 $\pm$ SEM (A、 $n = 20 \sim 26$ 、B $\sim$ C、 $n = 4 \sim 7$)として表され、2元配置ANOVAに続いてシダックの多重比較検定(A)または対応のない両側スチューデントt検定(B、C)を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、* * $P < 0.01$ 。* * * $P < 0.001$ 。

【図5】HFD給餌マウスの体重増加に対するOEA投与の効果。(A)OEA治療開始前の体重軌跡を示す。(B)OEA治療開始後の体重軌跡を示す。データは、平均 $\pm$ SEMとして表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定を使用して分析した。* $p < 0.05$ 、* * $p < 0.01$ 、* * * $p < 0.001$ 。

【図6】食餌誘発性肥満マウスの肝臓組織学に対するビヒクル(VEH)またはOEAの効果を示す肝臓切片のH&E染色である。

【図7A】マウスにおける非製剤化OEA(ニート-OEA)、Levagen(登録商標)-OEA、及びAquacelle(登録商標)-OEAの薬物動態(PK)プロファイルを示す。投与量は30mg/kgの遊離OEAに相当した。挿入図は、曲線下面積(AUC)値を示す。血漿における、ニートOEA対Levagen(登録商標)-OEAのPKプロファイルの比較である。データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 9 \sim 11$)として表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定または対応のないt検定を使用して分析した。* $p < 0.05$ 、* * $p < 0.01$ 、* * * $p < 0.001$ 。

【図7B】マウスにおける非製剤化OEA(ニート-OEA)、Levagen(登録商標)-OEA、及びAquacelle(登録商標)-OEAの薬物動態(PK)プロファイルを示す。投与量は30mg/kgの遊離OEAに相当した。挿入図は、曲線下面積(AUC)値を示す。肝臓における、ニートOEA対Levagen(登録商標)-OEAのPKプロファイルの比較である。データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 9 \sim 11$)として表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定または対応のないt検定を使用して分析した。* $p < 0.05$ 、* * $p < 0.01$ 、* * * $p < 0.001$ 。

【図7C】マウスにおける非製剤化OEA(ニート-OEA)、Levagen(登録商標)-OEA、及びAquacelle(登録商標)-OEAの薬物動態(PK)プロファイルを示す。投与量は30mg/kgの遊離OEAに相当した。挿入図は、曲線下面積(AUC)値を示す。血漿におけるニートOEA対Aquacelle(登録商標)-OEAの比較PKプロファイルである。データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 9 \sim 11$)として表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定または対応のないt検定を使用して分析した。* $p < 0.05$ 、* * $p < 0.01$ 、* * * $p < 0.001$ 。

【図7D】マウスにおける非製剤化OEA(ニート-OEA)、Levagen(登録商標)-OEA、及びAquacelle(登録商標)-OEAの薬物動態(PK)プロファイルを示す。投与量は30mg/kgの遊離OEAに相当した。挿入図は、曲線下面積(AUC)値を示す。肝臓におけるニートOEA対Aquacelle(登録商標)-O

10

20

30

40

50

EAの比較PKプロファイルである。データは、平均±SEM ($n=9\sim11$)として表し、2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定または対応のないt検定を使用して分析した。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 。

【図8】(A)研究設計を要約したスキームを示す。(B)高脂肪食(HFD)に3週間曝露させた後、対照群(AquaCellle(登録商標)単独、円)及びOEA治療群(AquaCellle(登録商標)-OEA、三角形)に無作為化する前の研究に含めたすべての動物対象の体重を示す。(C)AquaCellle(登録商標)単独及びAquaCellle(登録商標)-OEAによる治療中のマウスの体重増加を示す。データは、平均±SEM ($n=9$ /群)として表し、対応のないt検定または2元配置ANOVAとそれに続くシダックの多重比較検定を使用して分析した。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 。

10

【図9A】肝臓脂肪変性を有する食餌誘発性肥満マウスにおけるAquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAの経口投与の効果を示す。切除した肝臓(左)、BODIPYで染色した肝臓切片(中央)、及びオイルレッドOで染色した肝臓切片(右)の代表的な画像である。データは平均±SEMとして表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

【図9B】肝臓脂肪変性を有する食餌誘発性肥満マウスにおけるAquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAの経口投与の効果を示す。AquaCellle(登録商標)単独(丸)またはAquaCellle(登録商標)-OEA(三角形)で治療したマウスの平均肝臓重量($n=8/9$)である。データは平均±SEMとして表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

20

【図9C】肝臓脂肪変性を有する食餌誘発性肥満マウスにおけるAquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAの経口投与の効果を示す。AquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAで治療したマウスの肝臓におけるBODIPY蛍光の定量($n=4$ /群)を示す。データは平均±SEMとして表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

【図9D】肝臓脂肪変性を有する食餌誘発性肥満マウスにおけるAquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAの経口投与の効果を示す。AquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAで治療したマウスの肝臓切片における液滴径分布を示す。データは平均±SEMとして表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

30

【図10A】AquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。トリグリセリド(TAG)を示す。ビヒクル、AquaCellle(登録商標)単独、OEA、AquaCellle(登録商標)-OEA、データは、平均±SEM ($n=6/7$)として表され、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

40

【図10B】AquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。AST、アスパラギン酸トランスアミナーゼを示す。ビヒクル、AquaCellle(登録商標)単独、OEA、AquaCellle(登録商標)-OEA、データは、平均±SEM ($n=6/7$)として表され、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。 $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $***P<0.001$ 。

【図10C】AquaCellle(登録商標)単独またはAquaCellle(登録商標)-OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。ALT、アラニントランスアミナーゼを示す。ビヒクル、AquaCellle

50

(登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図10D】AquaCellle (登録商標) 単独またはAquaCellle (登録商標) - OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。コレステロールを示す。ビヒクル、AquaCellle (登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図10E】AquaCellle (登録商標) 単独またはAquaCellle (登録商標) - OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。グルコースを示す。ビヒクル、AquaCellle (登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図10F】AquaCellle (登録商標) 単独またはAquaCellle (登録商標) - OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。アルブミンを示す。ビヒクル、AquaCellle (登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図10G】AquaCellle (登録商標) 単独またはAquaCellle (登録商標) - OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。グロブリンを示す。ビヒクル、AquaCellle (登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図10H】AquaCellle (登録商標) 単独またはAquaCellle (登録商標) - OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。アミラーゼを示す。ビヒクル、AquaCellle (登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【図10I】AquaCellle (登録商標) 単独またはAquaCellle (登録商標) - OEAで治療した、肝臓脂肪変性を伴う食餌誘発性肥満マウスの血漿血液プロファイルを示す。CPK、クレアチンキナーゼを示す。ビヒクル、AquaCellle (登録商標) 単独、OEA、AquaCellle (登録商標) - OEA、データは、平均 $\pm$ SEM ($n = 6 / 7$) として表され、対応のない両側スチューデント t 検定を使用して分析した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ 。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書に記載の組成物及び方法は、この天然脂質アミドが抗脂肪変性効果を発揮する、肝実質への化合物の輸送を可能にする新規OEA製剤を提供する。この製剤は、非製剤化OEAまたはLevagen (登録商標) - OEAのいずれよりも、経口生物学的利用能が著しく高い。さらに、新規OEA製剤の経口投与によって、ヒト代謝症候群のマウスモデルで生じる肝臓脂肪変性が減弱する。本明細書に記載のデータは、ヒト非アルコール性肝臓脂肪変性の治療における組成物の使用の裏付けとなる。

【0017】

定義

本出願で使用される全ての科学用語及び技術用語は、別途明記しない限り、当技術分野

10

20

30

40

50

で一般的に使用される意味を有する。本出願で使用される場合、以下の単語または語句は、指定された意味を有する。

【0018】

本明細書で使用される場合、「対照」または「参照」試料は、正常、健常対照対象、または比較のために使用され得るベースライン量のマーカーから得られるような、それぞれのマーカーの正常な測定値を代表する試料を意味する。典型的には、ベースラインは同じ対象または患者から得られた測定値となる。試料は、検査のために使用される実際の試料、または対応するマーカーの既知の通常の測定値に基づく参照レベルもしくは範囲であり得る。

【0019】

本明細書で使用される場合、「有意差」とは、統計的有意差など、当業者によって信頼できると考えられる方法で検出することができる差、またはその状況下にて妥当なレベルの信頼性で検出することができる程度の大きさの差を意味する。一例では、参照試料と比較して10%の増加または減少が有意差である。他の例では、参照試料と比較して20%、30%、40%、または50%の増加または減少が有意差と考えられる。さらに別の例では、参照試料と比較した2倍の増加が有意であると考えられる。

【0020】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」または「賦形剤」には、活性成分と組み合わせると、その成分が生物学的活性を保持し、対象の免疫系と反応しない任意の材料が含まれる。このような担体を含む組成物は、周知の従来の方法によって製剤化される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990を参照のこと）。

【0021】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語には、任意のヒトまたは非ヒト動物が含まれる。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば、哺乳動物及び非哺乳動物、例として非ヒト霊長類、ウマ、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタ、ニワトリ、及び他の獣医学的対象などを含む。典型的な実施形態では、対象とはヒトである。

【0022】

本明細書で使用される場合、「a」または「an」は、明確に別様に示されない限り、少なくとも1つを意味する。

【0023】

組成物

本明細書では、5～15重量%のOEAと85～95%の自己乳化型薬物送達システム（SEDDS）を含む組成物について説明する。いくつかの実施形態では、SEDDSは、中鎖トリグリセリドを含むキャリアオイル、柑橘油、及びレシチンを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、対象に投与された場合、ニートOEAの投与と比較して、OEAの生物学的利用能の少なくとも2倍の増加を促進する。いくつかの実施形態では、組成物は、OEAの生物学的利用能の少なくとも3倍の増加を促進する。いくつかの実施形態では、SEDDSは、AquaCelle（登録商標）を含む。

【0024】

AquaCelle（登録商標）として市販されているSEDDSは、2019年12月12日に公開された米国特許公開第20190374494号に記載されている。Bremmell, K. E.; et al, A self-emulsifying Omega-3 ethyl ester formulation (AquaCelle (登録商標)) significantly improves eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid bioavailability in healthy adults. Eur. J. Nutr. 2019, 59, 2729-2737も参照のこと。栄養補助食品の送達方法に関するさらなる情報は、Subramanian, P. Lipid-Based Na

10

20

30

40

50

nocarrier System for the Effective Delivery of Nutraceuticals. Molecules 2021, 26, 5510 <https://doi.org/10.3390/molecules26185510>に見出すことができる。

【0025】

いくつかの実施形態では、組成物は、10～12%のOEA及び88～90%のAquaCell（登録商標）を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、11%のOEA及び89%のAquaCell（登録商標）を含む。いくつかの実施形態では、キャリアオイルは最大約11重量%を占め、柑橘油は最大約10重量%を占め、及びレシチンは最大約11重量%を占める。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、SEDDSの組成パーセンテージは、組成物が水性環境中に分散した場合に、平均直径約1～20マイクロメートルを有するミセルの集団を形成するようなものである。いくつかの実施形態では、組成物は、平均直径約5～15マイクロメートルを有するミセルの集団を形成する。いくつかの実施形態では、組成物は、平均直径約12～13マイクロメートルを有するミセルの集団を形成する。

【0027】

いくつかの実施形態では、組成物は、例えば腸溶性コーティングカプセルなどの腸溶性コーティングでの送達のために製剤化される。腸溶コーティングカプセルは、胃内でインタクトなままであり、腸内で活性物質を放出するように設計されている。腸溶性コーティングは、顆粒、ペレット、カプセル、または錠剤などの固形剤形に適用して、酸または胃酵素不安定性薬物の分解を防止することにより、生物学的利用能を改善することができる。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、組成物は抗酸化剤をさらに含む。代表的な抗酸化剤としては、レシチン、パルミチン酸アスコルビル、d-アルファートコフェロール、d-リ-アルファートコフェロール、d-アルファートコフェリルアセテート、d-リ-アルファートコフェリルアセテート、コハク酸d-アルファートコフェリル、コハク酸d-リ-アルファートコフェリル、ビタミンE及びその誘導体、オリーブポリフェノール、藻類ポリフェノール、及びそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、0～0.5重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.01重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.02重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.1重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、抗酸化剤は、約0.5重量%の濃度で存在する。

30

【0029】

いくつかの実施形態では、組成物は、賦形剤をさらに含む。代表的な賦形剤としては、コロイダルシリカ、コーンスターチ、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、マルトデキストリン、ステアリン酸マグネシウム、水酸化マグネシウム、微結晶性セルロース、デキストリン、ソルビトール、マンニトール、及びトレハロースが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、賦形剤は、約30重量%～約90重量%の濃度で存在する。いくつかの実施形態では、賦形剤は、約30重量%～約90重量%の濃度で存在する。

40

【0030】

方法

OEAの送達を必要とする対象の肝臓にOEAを送達する方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載の組成物の経口投与を含む。また、対象における肝臓脂肪変性を軽減する方法、対象におけるNAFLDを治療する方法、及び対象におけるNASHを治療する方法が記載される。いくつかの実施形態では、これらの方法はそれぞれ、本明細書に記載の組成物の経口投与を含む。下記の実施例において示されるよう

50

に、組成物の投与は、肝臓における脂質蓄積の減少、循環トリグリセリドの減少、ならびに肝酵素、すなわちAST及びALTのレベルの低下をもたらす。

【0031】

いくつかの実施形態では、投与量は、1回の投与あたり30～90mgである。いくつかの実施形態では、投与量は、90～300mgである。さらに他の実施形態では、投与量は、300～600mgである。投与は、経口、頬側、直腸、または胃内投与経路を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の経路を介して組成物を対象に提供することを含む。ある特定の実施形態では、組成物を投与する経口経路が好ましい。組成物は、単独で、または食物もしくは飲料と組み合わせて送達することができる。いくつかの実施形態では、組成物は、腸溶性コーティングカプセルなどの腸溶性コーティングで投与される。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、組成物は、毎日投与される。いくつかの実施形態では、投与は、1日2回である。いくつかの実施形態では、組成物は、4～6週間投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、5週間投与される。いくつかの実施形態では、組成物は、4～24週間投与される。

【実施例】

【0033】

以下の実施例は、本発明を例示し、当業者が本発明を製造及び使用するのを支援するために提示される。実施例は、本発明の範囲を別様に限定することを決して意図するものではない。

20

【0034】

実施例1：食餌誘発性肥満は、マウス肝臓におけるヒスタミン依存性オレオイルエタノールアミドシグナル伝達を妨害する

本実施例は、亜慢性OEA投与が、HFD曝露マウスの肝臓における脂質蓄積及び炎症誘発性遺伝子及び線維化誘発性遺伝子の転写を減少させることを実証する。本明細書で報告するデータは、肝臓におけるヒスタミン依存性OEAシグナル伝達の妨害が、肥満関連非アルコール性脂肪肝疾患の病態の一因となり得ることを示している。

【0035】

オレオイルエタノールアミド(OEA)は、エネルギー平衡の重要な脂質由来調節因子である[1]。その機能が広範に研究されている小腸では、OEAは、食事由来のオレイン酸から食後に生成され[2]、満腹感を促進する局所メッセンジャーとして作用する[3～5]。この効果は、リガンド作動性転写因子、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体- α (PPAR- α)によって媒介され、これはOEAに高い親和性で結合する[6、7]。食物摂取は肝臓でもOEA動員を調節するが、小腸で観察されるものとは逆方向である。肝臓のOEA含有量は絶食状態で増加し、摂食後に減少する[8、9]。これらの変化の生理学的重要性は、最近の研究で調査されている[10]。その結果、絶食によって肝外の肥満細胞を刺激してヒスタミンを放出させ、ヒスタミンが門脈循環を介して肝臓に入り、H1型受容体を活性化させて局所OEA生成を増強することが示唆される。このシグナル伝達プロセスを妨害する介入により、絶食誘発性ケトン体生成が約50%減少する[10]。この効果は、ケトン体生成の制御においてPPAR- α が果たす重要な役割[11]、及びOEAがPPAR- α に会合して脂肪分解を刺激し、脂肪酸酸化を促進し、肥満ラット及びマウスの体重増加及び肝臓トリアシルグリセロール含有量を低下させることを示すデータ[12～15]と一致している。上にまとめた知見は、肥満細胞から門脈循環への絶食誘発性ヒスタミン放出、肝臓におけるOEA形成の刺激、及びOEAによるPPAR- α 媒介性ケトン体生成の増強を伴うパラクリンシグナル伝達プロセスを詳述している。ここでは、小腸における摂食依存性OEA生成を妨害することが知られている食餌誘発性肥満[16]が、このようなプロセスに影響を与える可能性があるかどうかを問題提起した。

30

40

【0036】

50

材料及び方法

化学物質

【0037】

OEA、パルミトイルエタノールアミド (PEA)、アナンダミド、及びそれらの重水素含有類似体を Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) から購入した。バクセノイルエタノールアミド (VEA、 $18:1\Delta^{11}$) は、[16] で説明されているように調製した。ヒスタミン及び [$^2\text{H}_4$] -ヒスタミンは Toronto Research Chemicals Canada (Toronto, CA) 製であり、エタノールアミン及びオイルレッドOは Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) 製であり、ならびに BODIPY 及び DAPI (4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) を伴う ProLong (商標) Gold 退色防止用封入剤は、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) 製であった。すべての溶媒及び試薬は、入手可能な最高グレードのものであった。

10

【0038】

動物

雄型 C57BL/6J マウス (17週) を、Charles River (Wilmington, MA) から購入した。特に明記しない限り、それらを換気ケージ内で群飼育し (4~5/ケージ)、食餌及び水を自由に摂取させた。マウスは、管理された温度 ($22\pm1^\circ\text{C}$) 及び相対湿度 ($55\pm10\%$) にて、12時間の明暗サイクル (午前6時30分に点灯) 下で維持し、実験前に1週間取り扱った。飼育、動物の維持、及びすべての手順を、実験動物の飼育及び使用に関する米国国立衛生研究所のガイドライン (the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals) に従って実施し、これらは、the University of California, Irvine の動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって承認された。

20

【0039】

食餌誘発性肥満

18週齢のマウスを2つの群に無作為化した；一方の群は標準飼料 (6.5% kcal 脂肪、Envigo 2020X, Livermore, CA) を受け、もう一方の群は高脂肪食 (HFD、60% kcal 脂肪、D12492, Research Diets, New Brunswick, NJ) を受けた。どちらも11週間自由に摂取できた。体重及び食物摂取量を、週3回記録した。両群からの動物を、3つのコホートに無作為に割り当てた：a) 自由摂食、b) 絶食 (午後6時から翌日の午後12時まで)、c) 絶食/再摂食 (絶食から2時間後の食物へのアクセス)。絶食群及び絶食/再摂食群に割り当てられたマウスは、糞食を防止するために底部にワイヤーを取り付けたケージ内で飼育した。

30

【0040】

OEA 調製

OEA を、実験の直前に 95% 生理食塩水 / 5% Tween 80 (v/v) のビヒクル中に溶解させた。これを、10 mL / kg の容積で 5 mg / kg の腹腔内 (i.p.) 注射により投与した。

40

【0041】

組織収集

【0042】

カリウム-EDTA ($\text{K}_2\text{-EDTA}$) でコーティングした 23G x 1 針 (0.6 mm x 25 mm) を取り付けた 1 mL シリンジを使用して、麻酔したマウスから門脈血を収集した。試料を、 $\text{K}_2\text{-EDTA}$ でコーティングした 0.5 mL ポリプロピレンチューブに移し、氷上に置いた。チューブを 4°C にて $490 \times g$ で 15 分間遠心分離し、血漿層を収

50

集して -80°C で保存し、さらに処理した。動物は、断頭して安楽死させ、肝臓を摘出し、ドライアイスで急速冷凍し、分析まで -80°C で保存した。

【0043】

肝臓トリグリセリド測定

比色アッセイキット (Cayman Chemicals) を使用して、肝臓トリグリセリドを定量した。簡潔に述べると、約30mgの右肝葉を0.2mLのアッセイ緩衝液と混合し、製造元の指示に従って処理した。

【0044】

血糖値測定

飼料給餌マウス及びHFDマウスの群 ($n=7\sim 8$) を、底部にワイヤーを取り付けたケージに移し、一晚絶食させた。尾部血糖値は、Accu-Chek Avivaメータ及び試験片 (Roche Diabetes Care, Indianapolis, IN) を使用して測定した。

【0045】

他の生化学分析

包括的な血液化学パネルを、Antech Diagnostics (Irvin, CA) で実行した。

【0046】

組織学的分析

オイルレッドO染色：肝臓試料を型に埋め込み、クライオスタットで $7\mu\text{m}$ の厚さの切片に切断し、それらを4%パラホルムアルデヒド (PFA) で15分間固定した。固定後、切片をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に2分間浸漬し、それらをイソプロパノール (60%) に2分間入れ、オイルレッドO (イソプロパノール中60%) で30分間インキュベートした。最後に、切片を60%イソプロパノール40%水に浸漬し、50%グリセロールでスライドガラスに封入した。画像は、20倍の倍率で撮影した。

【0047】

BODIPY染色：肝臓切片 ($7\mu\text{m}$ 厚) をPBSに5分間浸漬し、4% PFAで15分間固定し、PBSで洗浄した。各試料を疎水性ペンで囲み、BODIPY (ホウ素ジピロメテン; $1/1000$ 希釈) で30分間染色した。試料を、PBSに浸漬し、DAPI (CAT: P36931) を伴う退色防止封入剤で封入した。画像は、20倍の倍率でキャプチャした。

【0048】

脂質分析

分析物抽出

【0049】

凍結肝臓試料 (約30~40mg) を、2mLのPrecellys (登録商標) 軟組織バイアル中に移し、内部標準 ($[^2\text{H}_4]$ -OEA、 $[^2\text{H}_4]$ -PEA及び $[^2\text{H}_4]$ -アナンダミド、各々100nM) を含有する氷冷アセトン (1mL) で希釈した。Bertinホモジナイザーを使用して、1分間、 4°C にて15秒/サイクルで、サイクル間で20秒間一時停止させて2サイクルで、試料を均質化させた。ホモジネートを 4°C にて $490\times g$ で15分間遠心分離し、上清を8mLのガラスバイアル中に移し、 N_2 下で乾燥させた。各試料をクロロホルム/メタノール/水 (2mL/1mL/1mL、体積) で希釈し、ボルテックスし、 4°C にて $490\times g$ で15分間、遠心分離した。有機相を収集し、 N_2 下で乾燥させた。ペレットをアセトニトリル ($100\mu\text{L}$) 中で再構成し、不活性化ガラスインサートに移し、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS-MS) 分析用に琥珀色のガラスバイアルに入れた。ヒスタミン抽出用に、門脈血漿試料 ($50\mu\text{L}$) を1.5mLプラスチックバイアルに移し、 $[^2\text{H}_4]$ -ヒスタミン ($50\mu\text{L}$ 、 $0.5\mu\text{g/mL}$) を含有する氷冷アセトニトリル (0.4mL) を加えてタンパク質を沈殿させた。 $[^2\text{H}_4]$ -ヒスタミンは、ガラスとの結合を防止するために蒸留水及びEDTAの溶液で調製した [17]。試料を30秒間ボルテックスし、 4°C にて $490\times g$ で

10

20

30

40

50

10分間、遠心分離した。上清を不活性化ガラスインサートに移し、LC/MS-MS分析用に琥珀色のガラスバイアルに入れた。

【0050】

LC/MS-MS分析

OEAの定量：1260シリーズLCシステム（Agilent Technologies、Santa Clara、CA）を使用して脂肪酸アシルエタノールアミドを分離した。Poroshell 120カラム（1.9 μ m、2.1 x 100 mm；Agilent Technologies、Wilmington、DE）で、溶媒Aとして水中0.1%ギ酸、及び溶媒Bとしてアセトニトリル中0.1%ギ酸からなる移動相を使用して、段階勾配分離を実行した。直線勾配を使用した：0.0～9.5分は80%B；9.51～11.0分は95%B；及び11.1～15.50分は55%Bに維持した。カラム温度は40℃、オートサンプラー温度は9℃に維持した。注入体積は2 μ lであり、流量は0.3 ml/分であり、総分析時間は15.5分であった。注入針を、水/メタノール/イソプロパノール/アセトニトリル（1：1：1：1、容量）中10%アセトンから構成される洗浄液を使用して、オートサンプラーポートで20秒間洗浄した後、各注入を行った。質量分析計は、正の Elektrosプレーイオン化モードで動作させた。表1に示す取得パラメータを使用して、分析物を多重反応モニタリングによって定量した。キャピラリー電圧及びノズル電圧は、それぞれ3500 V及び300～500 Vであった。乾燥ガスの温度は300℃であり、流量は10 L/分であった。シースガス温度は300℃であり、流量は10 L/時間であった。ネブライザー圧力は、40 psiに設定した。機器制御、データ取得、及び分析には、MassHunterソフトウェア（Agilent Technologies）を使用した。

10

20

【0051】

【表1】

表1：質量分析取得パラメータ

分析物	前駆体イオン (m/z)	生成物イオン (m/z)	断片化電圧(V)	衝突エネルギー(V)
アナンダミド	348.3	62.2	132	14
[² H]-アナンダミド	352.3	66.2	127	14
ヒスタミン	112	95	112	13
[² H]-ヒスタミン	116	99	108	13
OEA	326.3	62.2	148	14
[² H]-OEA	330.3	66.2	143	14
VEA	326.3	62.2	148	14
PEA	300.3	62.2	132	14
[² H]-PEA	304.3	66.2	127	13

30

【0052】

ヒスタミン定量：BEH Amideカラム（1.7 μ m、2.1 x 50 mm、Waters Corporation、Milford、MA）を使用した。移動相は、溶媒Aとしてギ酸を用いてpH 3.0に調整された40 mM ギ酸アンモニウム、及び、溶媒Bとしてアセトニトリル中0.1%ギ酸からなる。直線勾配を使用した：75%Bで0.0～1.5分 65%Bで1.51～2.5分；及び75%Bで2.51～5.50分維持した。流量は、0.5 ml/分であった。カラム温度は40℃に、オートサンプラー温度は9℃に維持した。注入体積は、2 μ lであった。質量分析計は、正のモードで動作させた。表1に報告したMRM遷移を使用して、定量を実行した。キャピラリー電圧は、2.8 kVであった。供給源パラメータは、以下の通りであった：乾燥ガス温度は230℃であり、流量は9 L/分であった；ネブライザー圧力を30 psiに設定した；シース

40

50

ガス温度は300℃であった；流量は12L／分であった；キャピラリー電圧を2000Vに設定した。

【0053】

リアルタイムPCR

TRIzol（商標）試薬（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS）を使用して肝臓から全RNAを抽出し、PureLink（商標）RNA Mini Kit（Invitrogen, Waltham, MS）で供給元の指示に従って精製した。精製の前に、試料をgDNA Eliminatorスピンカラム（Qiagen, Germantown, CA）に通した。NanoDrop 2000／2000-c分光光度計（Thermo Fisher Scientific）を使用して、RNAを定量した。cDNAは、RNase阻害剤を含む高容量cDNA RTキット（Applied Biosystems, Foster City, CA）を使用して、製造元の指示に従って、2mgの全RNAから合成した。第1鎖cDNAは、TaqMan（商標）Universal PCR Master Mixture（Thermo Fisher Scientific）を使用して増幅させた。リアルタイムPCR反応は、CFX96（商標）リアルタイムシステム（Bio-Rad, Hercules, CA）を使用して96ウェルプレートで実行した。熱サイクリング条件は以下の通りであった：最初の変性を95℃で10分間設定し、続いて45サイクルを設定し、各サイクルを95℃で30秒間、続いて55℃で60秒間実行した。 ΔC_t 値は、3つの異なるハウスキーピング遺伝子の幾何平均を使用して計算し、対照群（無飼料給餌）に対する相対倍数変化は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法[18]を使用して計算した。リアルタイムPCRプライマー及び蛍光原性プローブは、Applied Biosystems（TaqMan（R）Gene Expression Assays, Foster City, CA）から購入した。マウスのActb（Mm00607939__s1）、Hprt（Mm00446968__m1）、Gapdh（Mm99999915__g1）、Tnf α （Mm00443258__m1）、Il1b（Mm00434228__m1）、Tgfb1（Mm__01178820__m1）、Ccl2（Mm__00441242__m1）、Hmox1（Mm__00516005__m1）、Col1a1（Mm__00801666__g1）、Nqo1（Mm__01135606__m1）、Nrf1（Mm01135606__m1）、Faah（Mm__00515684__m1）、及びNapepld（Mm__00724596__m1）（Applied Biosystems, Foster City, CA）について、TaqMan遺伝子発現アッセイを使用した。

10

20

30

【0054】

統計分析

データは、GraphPad Prismバージョン8.0 for Windows（GraphPad Software, San Diego, CA）を使用して分析した。統計的有意性は、必要に応じて、両側スチューデントt検定、一元配置または二元配置分散分析（ANOVA）、ならびに多重比較のためのボンフェローニ事後検定を使用して決定した。群間の差は、 $p < 0.05$ の値で統計的に有意であると考えられた。結果を平均 $\pm$ SEMとして表す。

40

【0055】

結果

高脂肪食は、肝門脈系への絶食誘発性ヒスタミン放出を妨害する

【0056】

絶食によって、内臓肥満細胞が刺激されて、門脈循環にヒスタミンが放出される[10]。食餌誘発性肥満がこの応答に影響を与えるかどうかを判断するために、マウスを12週間HFDまたは定型的飼料に曝露し（図4）、アドホックに開発されたLC-MS/MSアッセイを使用して門脈血漿中のヒスタミン濃度を測定した（図1a、b）。以前の結果[10]を確認すると、飼料給餌マウスでは、食物欠乏により門脈ヒスタミン濃度が大幅に増加し、絶食マウスでは自由摂食マウスよりも4倍高く、2時間の再摂食後にベース

50

ラインに戻った（図 1 c）。HFD 給餌動物ではそのような増加は生じず、その自由摂食ヒスタミンレベルは、飼料給餌対照よりおよそ 3 倍高く、絶食に应答して変化しなかった（図 1 c）。また、飼料給餌マウス及び HFD 給餌マウスの肝臓における H_1 及び H_2 ヒスタミン受容体の転写に対する食物欠乏の影響も調べた。図 1 d 及び 1 e に示すように、絶食によって、飼料給餌対照において H_1 及び H_2 受容体 mRNA のレベルが 2 倍上昇したが、HFD 給餌マウスには影響はなかった。これらの結果は、HFD への曝露が、門脈系への絶食誘発性ヒスタミンの放出、ならびにマウス肝臓におけるヒスタミン受容体の絶食誘発性発現を妨害することを示唆している。

【0057】

高脂肪食は、肝臓の絶食誘発性 OEA 生成を妨害する

肥満細胞由来ヒスタミンは、 H_1 受容体の活性化を介して、肝臓における OEA 生合成を刺激する [10]。この応答に対する食餌誘発性肥満の影響を評価するために、OEA（18:1 Δ^9 ）をその局所異性体であり、OEA 定量を妨げる可能性があるバクセノイルエタノールアミド（VEA、18:1 Δ^{11} ）から分離可能である LC-MS/MS アッセイを使用して、飼料給餌マウス及び HFD 給餌マウスの肝臓における OEA 含有量を測定した（図 2 a）[16、19]。以前に報告されたように [8、11]、飼料給餌マウスでは、絶食により肝臓の OEA 含有量が有意に増加し、再摂食後にベースラインに戻った（図 2 b）。HFD 給餌マウスでは、そのような応答は観察されなかった（図 3 b）。同様に、断食により、飼料給餌マウスでは肝臓のエンドカンナビノイドであるアナンダミドのレベルが増加したが、HFD 給餌マウスでは増加しなかった（図 2 b）。第 3 の生物活性脂質アミドである PEA の含有量は、HFD 曝露によって食物欠乏による影響を受けず、わずかに減少した（図 2 d）。RT-PCR 分析により、OEA 形成を触媒する NAE-PLD（マウスでは *Napepld* 遺伝子によってコードされている）の転写 [20] は、HFD によってわずかに増加したが、OEA 分解を触媒する FAAH（*Faah*）の転写 [20] は、変化がないままであったことが明らかになった（図 2 e、f）。まとめると、これらの知見は、HFD 曝露によって、マウス肝臓における絶食誘発性 OEA 生成が無効になることを示している。

【0058】

外因性 OEA は、肥満マウスの肝臓における脂質蓄積を是正する。

【0059】

食餌誘発性肥満は、肝臓脂肪変性症及び線維症の発症と関連している [21]。内因性 OEA 生成に欠陥のある HFD 給餌マウスにおいて、OEA 補給がこれらの変化を是正できるかどうかを検討した。マウスを 5 週間 HFD に曝露し、それらを 2 つの群に無作為化し、OEA（5 mg/kg、1 日 1 回）またはビヒクルのいずれかで治療してさらに 6 週間 HFD 曝露に供した。予想通り [2、12、22~26]、OEA 投与は体重増加を減少させ、循環総コレステロール及び肝臓トランスアミナーゼレベルを低下させた（表 2、図 5）。これらの効果は、肝臓脂質プロファイルの改善を伴っていた（図 3）。肝臓切片のオイルレッド O 及び BODIPY 染色により、OEA 治療マウスでは対照マウスと比較して脂質含有量が減少していることが示された（図 3 a、b）。これらの結果と一致して、肝臓トリグリセリド含有量は、対照マウスよりも OEA 治療マウスの方が低かった（図 3 c）。さらに OEA の保護作用を示唆するものとして、肝臓の炎症及び線維化に関連する遺伝子 *C-C* モチーフケモカインリガンド 2（*Ccl2*）[27]、インターロイキン 1β （*Il1b*）[28]、コラーゲン I 型 $\alpha 1$ （*Col1a1*）[29] などへの転写が、OEA 治療マウスでは対照マウスと比較して減弱している（図 3 d~f）のに対し、保護因子ヘムオキシゲナーゼ 1（*Hmox1*）の転写は増強されている（図 3 g）。他の関連遺伝子（*Nrf1*、*Tnfa*、*Tgfb1*、*Nqo1*）の転写は、影響を受けなかった（図 3 h~j）。

【0060】

表 2. ビヒクル（VEH）または OEA 投与による HFD 給餌マウスの体重増加及び血液化学に対する効果。略語：AST：アスパラギン酸トランスアミナーゼ、ALT：アラ

ニトランスアミナーゼ、SGOT：血清グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ、SGPT：血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ。データは平均±S.E.Mとして表し、対応のない両側スチューデントt検定を使用して分析した。*P<0.05。

【表2】

	ビビクル(n=8)	OEA(n=7)
Δ体重(g)	4.26±0.59	2.27±0.5*
AST(SGOT)(IU/L)	129.8±11.6	86.1±9.9*
ALT(SPGT)(IU/L)	71.6±7.5	45.4±6.9*
コレステロール(mg/dL)	201.4±5.9	173.6±7.6*
トリグリセリド(mg/dL)	89.6±6.1	81.0±4.9
グルコース(mg/dL)	249.7±12.1	250.5±19.1

10

20

【0061】

考察

絶食マウスでは、内臓肥満細胞から門脈系に分泌されたヒスタミンが、肝臓のGq結合H₁受容体を活性化し、局所OEA生合成を刺激する[10]。このプロセスを無効にする遺伝的または薬理的な操作、一例えば、肥満細胞の除去、H₁受容体の遮断、及びヒスタミンまたはOEA生成酵素の欠失などにより、絶食誘発性ケトン体生成がおおよそ50%減少する。これらの知見により、ヒスタミン依存性OEAシグナル伝達が、マウス肝臓におけるケトン体生成の有意な寄与因子として特定される[10]。本明細書では、食餌誘発性肥満によりこのパラクリンシグナル伝達機構が妨害され、絶食によってヒスタミン放出がもはや誘発されなくなり、肝臓でのOEA生合成を誘発できなくなることが報告される。さらに、OEA投与により、肥満げっ歯類における肝臓脂肪変性が軽減されることを確認する新しい証拠が提供される[13、14、22～24]。同様の結果が、ヒトにおいて報告された[25、26]。まとめると、本知見は、HFD誘発性ヒスタミン放出及び肝臓OEA動員の不足が、世界中の成人の約25%が罹患している状態である、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)の病態の一因となる可能性があることを示唆している[30]。

30

【0062】

結果は、マウスの肥満が、門脈ヒスタミンにおける2つの顕著な変化を伴うことを示している(図1c)。第1に、自由摂食条件下では、ヒスタミンレベルは、飼料給餌動物よりもHFD給餌動物の門脈血中でより高かった。第2に、一迷走神経入力によって媒介され得るプロセスである一絶食誘発性ヒスタミン分泌[31、32]が、HFD曝露動物では抑制された。これらの変化の背後にある機序は不明だが、HFDへの曝露によって腸内に生成される炎症誘発性環境が関与している可能性が高い。リンパ瘻ラットモデルを使用した研究では、高脂肪食の腸管吸収は粘膜肥満細胞の活性化を伴い、その結果ヒスタミン及びプロスタグランジンD₂が放出されることが実証されている[33～35]。腸管肥満細胞の脱顆粒はまた、食餌誘発性肥満マウスでも報告されている[36]。したがって、肥満自由摂食マウスの門脈血におけるヒスタミン放出の上昇は、炎症を起こした粘膜組織における異常な肥満細胞の活動に起因することは妥当であるが、依然として確定されていない。肥満細胞機能の炎症に関連する変化はまた、細胞が絶食に適切に応答できないことを説明し得る。

40

50

【0063】

肥満細胞からのヒスタミン放出を抑制することに加え、HFDは肝臓におけるH₁及びH₂受容体の絶食誘発性転写を鈍化させ（図1d、e）、これにより臓器のOEA生成能力がさらに損なわれる可能性がある。モルモット及びラット肝細胞は、H₁及びH₂受容体を発現しており、インビトロでは、それらの活性化によりグリコーゲン分解、糖新生、及び尿素生成が促進される〔37、38〕。これらのデータと一致して、研究によって、H₁受容体アンタゴニストによる長期投与及びH₂受容体の遺伝子欠失によって、マウスの肝脂肪変性を悪化させることが示されている〔39、40〕。

【0064】

以前の研究〔13、14〕を確認すると、OEAによる亜慢性治療によって、肝臓脂肪変性が軽減されることが見出された。ヒトでは、肥満は、NAFLD発症の主要な危険因子であり、非アルコール性脂肪肝炎（NASH）及び肝硬変などの病態に進行する可能性がある〔41〕。肥満を軽減する介入により、この進行は遅くなる〔42〕が、現在NAFLDまたはNASHのいずれに対しても薬理的療法は承認されていない〔43〕。以前の研究では、OEA補給により、脂肪臓器及び肝臓におけるPPAR- α が活性化されて脂肪分解が促進〔12、44〕され、おそらく脂肪酸酸化及びケトン体生成が促進され〔12、44〕、局所炎症が緩和され〔45～47〕、NAFLDを有する患者の予後が改善される場合があること〔24、25〕が示唆されている。本結果は、その提案と一致しており、肝臓におけるヒスタミン依存性OEAシグナル伝達が、潜在的な病態機序及び治療作用の標的としてさらに同定されている。

【0065】

参考文献

- DiPatrizio NV, Piomelli D. *J Clin Invest*. 2015;125(3):891-8.
- Schwartz GJ, et al. *Cell Metab*. 2008;8(4):281-8.
- Gaetani S, Oveisi F, Piomelli D. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28(7):1311-6.
- Proulx K, et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(3):R729-37.
- Rodriguez de Fonseca F, et al. *Nature*. 2001;414(6860):209-12.
- Fu J, et al. *Nature*. 2003;425(6953):90-3.
- Astarita G, et al. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(2):563-70.
- Fu J, et al. *J Biol Chem*. 2007;282(2):1518-28.
- Izzo AA, et al. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(1):55-62.
- Misto A, et al. *Cell Metab*. 2019;29(1):91-102 e5.
- Montagner A, et al. *Gut*. 2016;65(7):1202-14.
- Guzman M, et al. *J Biol Chem*. 2004;279(27):27849-54.
- Fu J, et al. *Neuropsychopharmacology*. 2005;48(8):1147-53.
- Li L, et al. *J Pharmacol Sci*. 2015;127(3):244-50.
- Romano A, et al. *Nutrients*. 2021;13(2).

Igarashi M, et al. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851 (9) :1218-26.

Verburg KM, et al. *Agents Actions*. 1984;14 (5-6) :633-6.

Livak KJ, et al. *Methods*. 2001;25 (4) :402-8.

Rohrig W, et al. *Anal Bioanal Chem*. 2016;408 (22) :6141-51.

Piomelli D. *Trends Endocrinol Metab*. 2013;24 (7) :332-41.

Wang CY, Liao JK. *Methods Mol Biol*. 2012;821 :421-33.

Giudetti AM, et al. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10 (8) .

Romano A, et al. *Nutrients*. 2021;13 (2) .

Hu J, et al. *Front Pharmacol*. 2020;11 :605065.

Tutunchi H, et al. *Health Promot Perspect*. 2020;10 (4) :373-82.

Tutunchi H, et al. *J Cell Physiol*. 2021;236 (1) :417-26.

Roh YS, et al. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1061 :45-53.

An SY, et al. *Front Pharmacol*. 2021;12 :645703.

Ortiz C, et al. *Curr Tissue Microenviron Rep*. 2021 :1-12.

Sayiner M, et al. *Clin Liver Dis*. 2016;20 (2) :205-14.

Stead RH, et al. *Auton Neurosci*. 2006;125 (1-2) :53-61.

Gottwald TP, et al. *Neuroreport*. 1995;7 (1) :313-7.

Zhou A, et al. *Front Physiol*. 2020;11 :4.

Ji Y, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012;302 (11) :G1292-300.

Ji Y, et al. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14 (4) :315-21.

Gu Y, et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 2021 :1-13.

Garcia-Sainz JA, et al. *Mol Pharmacol*. 1987;31 (3) :253-8.

Garcia-Sainz JA, et al. *Eur J Pharmacol*. 1992;227 (3) :325-31.

Raveendran VV, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307 (2) :G219-28.

Yamada S, et al. *Pathol Int*. 2016;66 (12) :661-71.

Sheka AC, et al. *JAMA*. 2020;323 (12) :117

10

20

30

40

50

5-83。

Vilar-Gomez E, et al. Gastroenterology. 2015;149(2):367-78 e5; quiz e14-5。

Thiagarajan P, Aithal GP. J Clin Exp Hepatol. 2019;9(4):515-21。

Suarez J, et al. Dis Model Mech. 2014;7(1):129-41。

Montecucco F, et al. Thromb Haemost. 2015;113(4):838-50。

Payahoo L, et al. Adv Pharm Bull. 2018;8(3):479-87。 10

Lama A, et al. Biomed Pharmacother. 2020;129:110368。

【0066】

実施例2：AquaCelle（登録商標）-OEAは、Levagen（登録商標）-OEAより経口生物学的利用能が高い

本実施例は、脂質の生物学的利用能を増加させるように設計された全ての製剤が互換的に使用できるわけではないことを示している。本実施例に示すように、AquaCelle（登録商標）-OEAは、非製剤化（「ニート」）OEAまたはOEAの異なる製剤（Levagen（登録商標）-OEA）のいずれよりも、経口生物学的利用能が著しく高い。 20

【0067】

材料及び方法

化学物質

真正オレオイルエタノールアミド（OEA）及びその重水素含有類似体 [2H4]-OEAを、Cayman Chemicals（Ann Arbor、MI）から入手した。3つのOEA製剤を試験した：（1）非製剤化OEA（「ニート-OEA」）；（2）Levogen-Plus（登録商標）技術を用いて製剤化されたOEA（「Levogen-OEA」）；及び（3）AquaCelle（登録商標）技術を用いて製剤化されたOEA（「AquaCelle-OEA」）。すべての製剤を実験の直前に滅菌生理食塩水/Tween-80（95%/5%、体積/体積）に懸濁し、総体積10mL/kgで強制経口投与した。エタノールアミン及びオイルレッドOは、Sigma Aldrich（St. Louis、MO）から入手し、BODIPY及びDAPI（4', 6-ジ 30
アミジノー2-フェニルインドール）を伴うProLong（商標）Gold退色防止用封入剤は、Thermo Fisher Scientific（Waltham、MA）から入手した。他の試薬及び分析溶媒はすべて、利用可能な最高グレードであった。

【0068】

動物

雄型C57BL/6Jマウス（13週齢）を、Charles River（Wilmington、MA）から購入した。特に明記しない限り、マウスを換気ケージ（ケージ 40
あたり4～5匹）内で群飼育し、食餌（標準飼料、6.5% kcal脂肪、Envigo 2020X、Livermore、CA）及び水を自由に摂取させた。マウスは、管理された温度（22±1°C）及び相対湿度（55±10%）にて、12時間の明暗サイクル（午前6時30分に点灯）下で維持し、実験前に1週間取り扱った。飼育、動物の維持、及びすべての他の手順を、実験動物の飼育及び使用に関する米国国立衛生研究所のガイドライン（the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals）に従って実施し、これらは、the University of California、Irvineの動物実験委員会（Institutional Animal Care and Use Committee）によって承認された。 50

【0069】

組織収集

心臓穿刺によりエチレンジアミンデルター四酢酸（EDTA）ですすいだシリンジに血液を採取し、スプレーコーティングカリウム-EDTA（K2-EDTA）を含有する1 mL ポリプロピレンチューブに移した。4℃にて1450×gで15分間遠心分離して血漿を調製し、ポリプロピレンチューブに移し、直ちに凍結し、-80℃で保存した。動物を断頭により安楽死させ、それらの肝臓を迅速に採取し、各肝臓の右葉を他の葉から分離し、ドライアイス上で凍結し、分析まで-80℃で保存した。

【0070】

OEA製剤の薬物動態

18週齢のマウスに、ニート-OEA、Levagen-OEA、またはAquaCell-OEAを、30mg/kgの用量で強制経口投与した。投与後の種々の時点で動物をイソフルランで麻酔し（分単位=0、15、30、45、60、120、240、360；1時点あたりn=9~11匹のマウス）、上記のように血液及び肝臓を処理した。

【0071】

血液化学

包括的な血液化学パネルを、Antech Diagnostics（Irvin, CA）で実行した。

【0072】

組織学的分析

オイルレッドO染色：肝臓試料（右葉）を型に埋め込み、クライオスタットで7µmの厚さの切片に切断し、切片を4%パラホルムアルデヒド（PFA）で15分間固定した。固定後、切片をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に2分間浸漬し、それらをイソプロパノール（60%）に2分間入れ、オイルレッドO（イソプロパノール中60%）で30分間インキュベートした。最後に、切片を60%イソプロパノール40%水に浸漬し、50%グリセロールでスライドガラスに封入した。画像は、20倍の倍率で撮影した[Linet al. 2022]。

【0073】

BODIPY染色：肝臓切片（7µm厚）をPBSに5分間浸漬し、4% PFAで15分間固定し、PBSで洗浄した。各試料を疎水性ペンで囲み、BODIPY（1/1000希釈、体積/体積）で30分間染色した。試料を、PBSに浸漬し、DAPI（CAT: P36931）を伴う退色防止封入剤で封入した。画像は、20倍の倍率でキャプチャした[Linet al. 2022]。

【0074】

脂質抽出

凍結肝臓試料（約30~40mg）を、2mLのPrecellys（登録商標）軟組織バイアル中に移し、内部標準（[2H4]-OEA、100nM）を含有する氷冷アセトン（1mL）で希釈した。Bertinホモジナイザーを使用して、1分間、4℃にて15秒/サイクルで、サイクル間で20秒間一時停止させて2サイクルで、試料を均質化させた。ホモジネートを4℃にて490×gで15分間遠心分離し、上清を8mLのガラスバイアル中に移し、N2下で乾燥させた。各試料をクロロホルム/メタノール/水（2mL/1mL/1mL、体積/体積）で希釈し、ボルテックスし、4℃にて490×gで15分間、遠心分離した。有機相を収集し、N2下で乾燥させた。ペレットをアセトニトリル（100µL）中で再構成し、不活性化ガラスインサートに移し、液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS-MS）分析用に琥珀色のガラスバイアルに入れた。

【0075】

OEA定量

クロマトグラフィー分離は、バイナリポンプ、デガッサー、温度制御オートサンプラー、及びカラムコンパートメントから構成され、JetStreamエレクトロスプレーイオン化（ESI）インターフェースを備えた6460Cトリプル四重極質量分析検出器に

10

20

30

40

50

接続された1260シリーズLCシステム (Agilent Technologies、Santa Clara、California) を使用して実施した。Poroshell 120 カラム ($1.9\mu\text{m}$ 、 $2.1\times 100\text{mm}$; Agilent Technologies、Wilmington、DE) で、溶媒Aとして水中0.1%ギ酸、及び溶媒Bとしてアセトニトリル中0.1%ギ酸からなる移動相を使用して、段階勾配分離を実行した。直線勾配を使用した: 0.0~9.5分は80%B; 9.51~11.0分は95%B; 及び11.1~15.50分は55%Bに維持した。カラム温度は40℃、オートサンプラー温度は9℃に維持した。注入体積は2 μL であり、流量は0.3mL/分であり、総分析時間は15.5分であった。注入針を、水/メタノール/イソプロパノール/アセトニトリル (1:1:1:1、容量) 中10%アセトンから構成される洗浄液を使用して、オートサンプラーポートで20秒間洗浄した後、各注入を行った。質量分析計を正の Elektrospray イオン化モードで操作し、以下のMRM遷移 (m/z) をモニタリングした: OEA、326.3>62.0; [2H4]-OEA、330.3>66.0。OEA断片化電圧及び衝突電圧は、それぞれ148及び14に設定し、[2H4]-OEAでは、OEA断片化電圧及び衝突電圧は、それぞれ143及び14であった。キャピラリー電圧及びノズル電圧は、それぞれ3500V及び500Vであった。乾燥ガスの温度は300℃であり、流量は10L/分であった。シースガス温度は300℃であり、流量は10L/時間であった。ネブライザー圧力は、40psiに設定した。定量下限は0.6ng/mL (3.7fmol/2.0 μL の注入) であった。機器制御、データ取得、及び分析には、MassHunterソフトウェア (Agilent Technologies、Santa Clara、CA) を使用した。

10

20

【0076】

統計分析

データは、Graphpad Prismバージョン8.0 for Windows (GraphPad Software、San Diego、CA) を使用して分析した。統計的有意性は、必要に応じて、両側スチューデントt検定、一元配置または二元配置分散分析 (ANOVA)、ならびに多重比較のためのボンフェローニ事後検定を使用して決定した。群間の差は、 $p<0.05$ の値で統計的に有意であると考えられた。結果を平均 $\pm$ SEMとして表す。

【0077】

30

結果

AquaCell (登録商標) - OEAの薬物動態プロファイル

3つの異なるOEA調製物-未製剤化 (「ニート」) OEA、Levogen (登録商標) - OEA、及びAquaCell (登録商標) - OEAの薬物動態特性を、雄型C57BL/6マウス (1群あたり $n=X$) における単回経口 (強制) 投与 (遊離OEA 1kgあたり30mgに相当) の後で比較した。血漿OEAプロファイルは、ニートOEA及びLevogen (登録商標) - OEAを与えられた動物において類似していた (図7A、挿入図は曲線下面積、AUCを示す)。肝臓におけるOEA含有量にわずかな差が観察され、Levogen (登録商標) - OEAを受けたマウスでは、未製剤化合物を与えられたマウスと比較して、60分時点で有意に高くなった ($P<0.05$) (図7B)。それにもかかわらず、AUC値は、2つの群で類似していた (図7B)。対照的に、ニートOEAとAquaCell (登録商標) - OEAとの間に有意差が認められ、後者では、血漿 (図7C) 及び肝臓 (図7D) の両方で有意に高いOEAレベルが生じた。実際、OEAへの全体的な肝臓曝露 (AUC) は、AquaCell (登録商標) - OEAで治療したマウスでは、未製剤化合物で治療したマウスよりもおよそ3倍高くなった (図7D)。これらの結果は、AquaCell (登録商標) 製剤技術によって、経口投与OEAが肝臓に効果的に輸送されることを示している。

40

【0078】

実施例3: オレオイルエタノールアミドの生物学的に利用可能な経口製剤による肝臓脂肪変性の治療

50

内因性脂質由来メディエーターであるOEAの全身投与によって、食餌誘発性肥満ラット（PMID：15910890）または脂肪酸結合タンパク質L-FABPを欠いた変異マウス（PMID：22327204）における脂肪変性を予防する。OEAの脂肪分解特性は、食餌誘発性肥満のマウスモデルを使用した、実施例1に記載の研究で確認した。これらの知見を治療に適用するうえでの主な障害は、OEAの生物学的利用能が極めて不十分なことであり、そのため、経口薬としてのOEAの使用はほとんど不可能である。Gencor Pacific（<https://www.gencorapacific.com>）は、親油性分子の生物学的利用能を最適化するように特に設計された自己乳化型送達システムを開発した。この技術（AquaCelle（登録商標））は、ミセル形成を最適化し、油-水界面の表面積を増加させることにより、生物学的利用能の増加を達成する。これは、消化液中でエマルジョンを自然に形成し、腸上皮を介した輸送を補助する脂質、界面活性剤、共界面活性剤、及び共溶媒からなる。

10

【0079】

本実施例は、実施例2と併せて、AquaCelle（登録商標）-OEA製剤（11% OEA及び89% AquaCelle（登録商標））からなる）が、OEAの全体的な経口生物学的利用能を増加させ、それによってその治療効果を増強することを実証する。これらの結果は、AquaCelle（登録商標）-OEAの反復経口投与によって、食餌誘発性肥満のマウスモデルにおける肝脂質蓄積が有意に減弱されることを示している。これらの知見は、AquaCelle（登録商標）-OEAがヒト非アルコール性肝臓脂肪変性の治療に臨床適用されていることを示唆している。

20

【0080】

食餌誘発性肥満

マウス（18週齢）を、高脂肪食（HFD、60% kcal脂肪、D12492、Research Diets, New Brunswick, NJ）に3週間曝露した。動物を2つの群に無作為化し、高脂肪食曝露を継続しながら、AquaCelle OEA（90mg/kg）またはそのビヒクル（OEAを伴わないAquaCelle）を、1日2回、5週間、強制経口投与した。個体の体重増加及びケージ食物摂取量を、週3回記録した。

【0081】

マウス肝臓における脂質蓄積に対するAquaCelle（登録商標）-OEAの効果

30

研究プロトコルの概略図を図8Aに示す。雄型C57BL/6マウスを、高脂肪食（HFD、脂肪由来60% kcal）に3週間曝露した後、ほぼ等しい体重の2つの群（1群あたりn=9）に無作為化した（図8B）。HFD曝露を継続しながら、動物にAquaCelle（登録商標）-OEA（1kgあたり90mgの遊離OEAに相当）またはAquaCelle（登録商標）単独（媒体）のいずれかを、強制経口投与により1日2回さらに5週間与えた。次に、マウスを安楽死させ、それらの肝臓及び心臓血液を分析のために収集した。

【0082】

AquaCelle（登録商標）-OEAの投与は体重増加に影響を与えず、これは2つの群において同様であった（図8C）。それにもかかわらず、平均肝臓重量は、AquaCelle（登録商標）-OEAで治療したマウスでは、AquaCelle（登録商標）単独で治療したマウスより有意に低かった（ $P < 0.05$ 、 $n = 8 = 9$ ）（図9B）。さらに、臓器の外表面は、後者の群ではより白色に見えた（図9A、左）。両方の観察結果は、AquaCelle（登録商標）-OEAの抗脂肪変性効果と一致しているため、強力な蛍光性の親油性フルオロフォアであるBODIPY（登録商標）を使用して、肝臓実質の切片における脂質蓄積を測定した。結果は、AquaCelle（登録商標）-OEAの投与によって、AquaCelle（登録商標）単独と比較して、肝臓切片におけるBODIPY（登録商標）の蛍光が有意に（ $P < 0.05$ ； $n = 4$ ）減少したことを示す（図9A、中央；図9C）。図9Dに示される頻度分布分析は、AquaCelle（登録商標）-OEAによる治療によって、脂肪滴の平均サイズ及びそれらの数の両方が

40

50

減少したことをさらに示している。親油性色素であるオイルレッド O で染色して、これらの結果を確認した（図 9 C、右）。まとめると、これらの知見は、AquaCellle（登録商標）-OEA の垂慢性経口投与によって、体重の軌跡を変化させることなく、食餌誘発性肥満マウスの肝臓における脂質蓄積を防止することを示している。肝脂肪変性の改善と一致して、AquaCellle（登録商標）-OEA による治療によって、トリグリセリドの循環濃度が低下し（ $P < 0.01$ 、 $n = 7$ ）（図 10 A）、肝酵素である、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）及びアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の循環濃度が低下した（図 10 B、C）。循環総コレステロール、グルコース、アルブミン、グロブリン、アミラーゼ、及びクレアチンホスホキナーゼ（CPK）に対する統計的に検出可能な効果は見られなかった（図 10 D-I）。

10

【0083】

本出願を通じて、種々の刊行物が参照されている。本発明が関連する分野の現状をさらに十分に説明する目的で、これらの刊行物の開示内容は、本出願での参照により、その全体が、本明細書に組み込まれる。

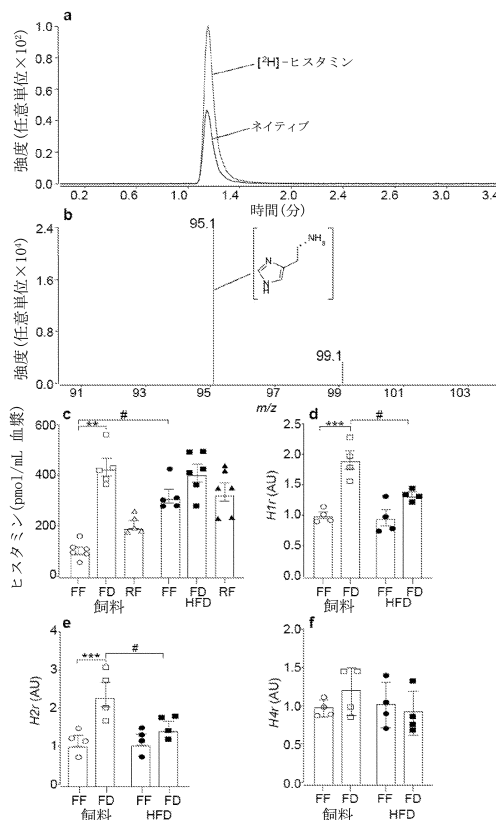
【0084】

当業者であれば、前述の説明に開示された概念及び特定の実施形態が、本発明の同じ目的を実行するために、他の実施形態を修正または設計するための基礎として容易に利用することができることを理解するであろう。当業者はまた、そのような同等の実施形態が、添付の特許請求の範囲に記載されている本発明の精神及び範囲から逸脱しないことを理解するであろう。

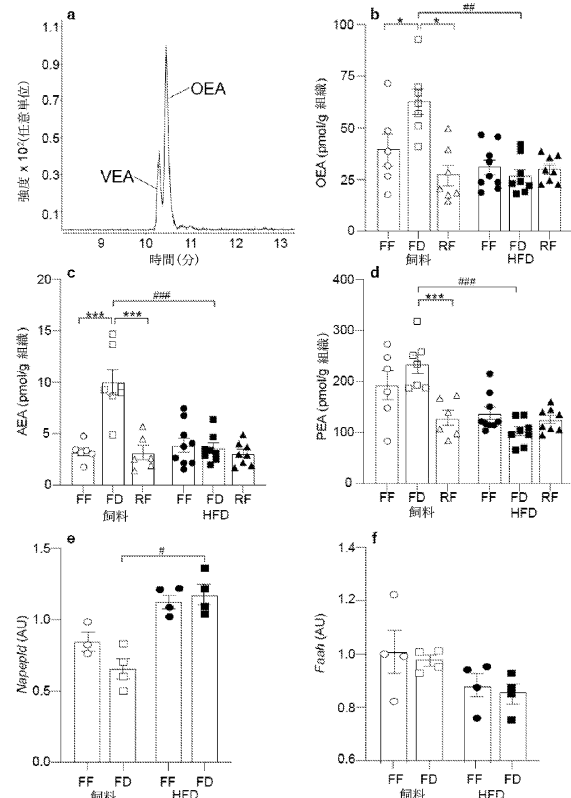
20

【図面】

【図 1】



【図 2】

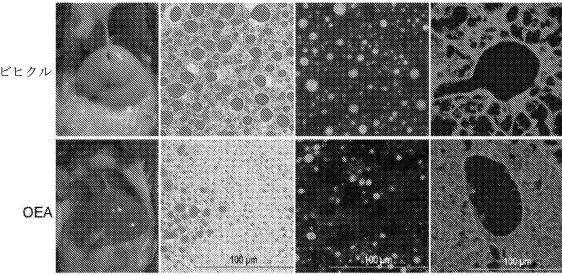


30

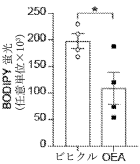
40

50

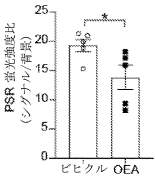
【図 3 A】



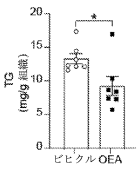
【図 3 B】



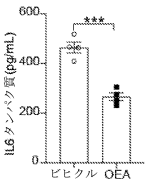
【図 3 C】



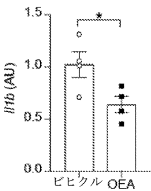
【図 3 D】



【図 3 E】



【図 3 F】



10

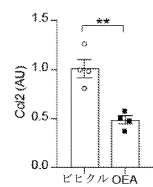
20

30

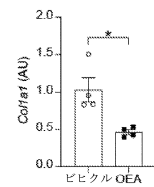
40

50

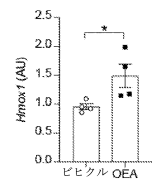
【図 3 G】



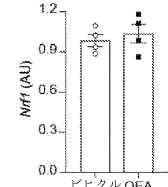
【図 3 H】



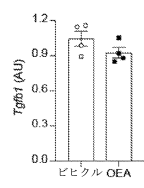
【図 3 I】



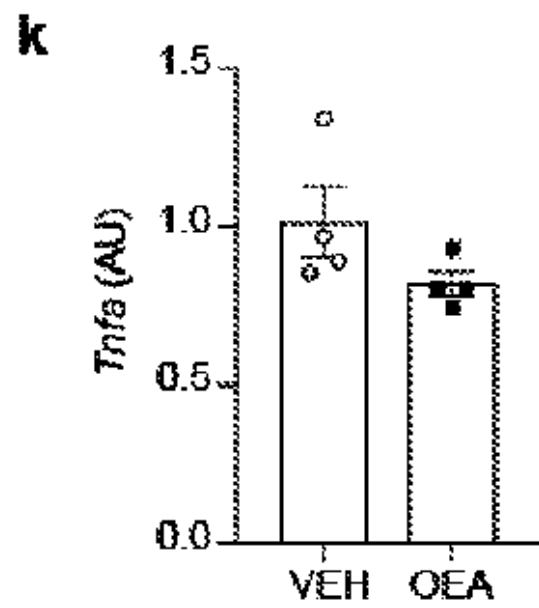
【図 3 J】



【図 3 K】



【図】



10

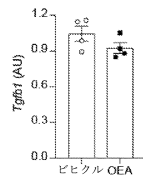
20

30

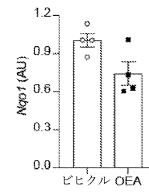
40

50

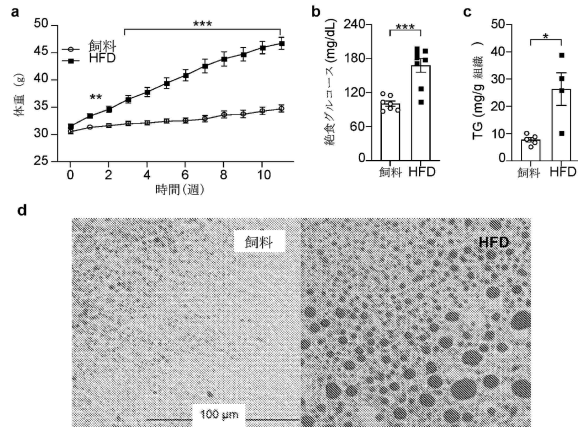
【図 3 L】



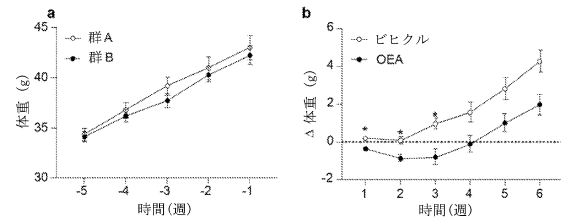
【図 3 M】



【図 4】



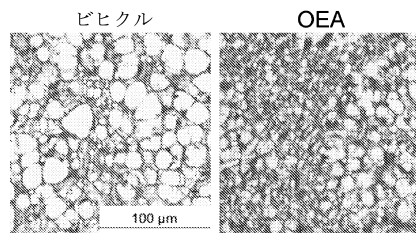
【図 5】



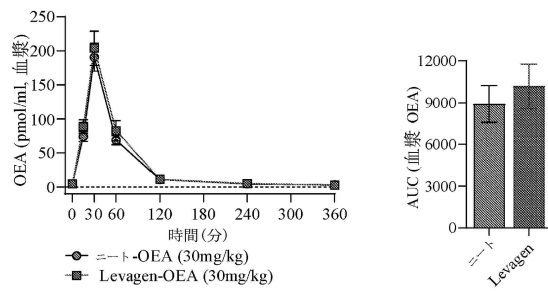
10

20

【図 6】



【図 7 A】

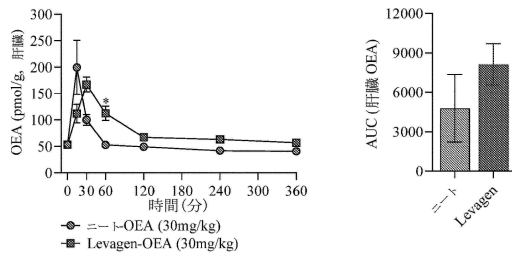


30

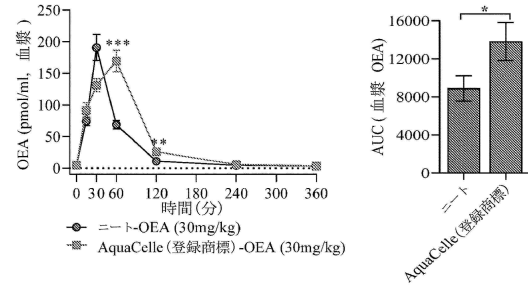
40

50

【図 7 B】

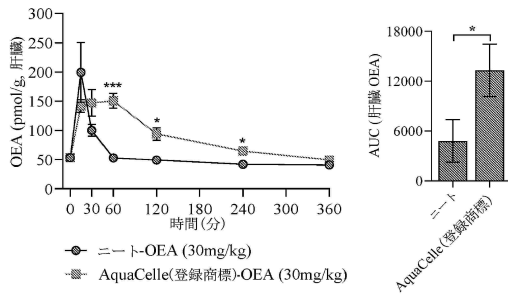


【図 7 C】

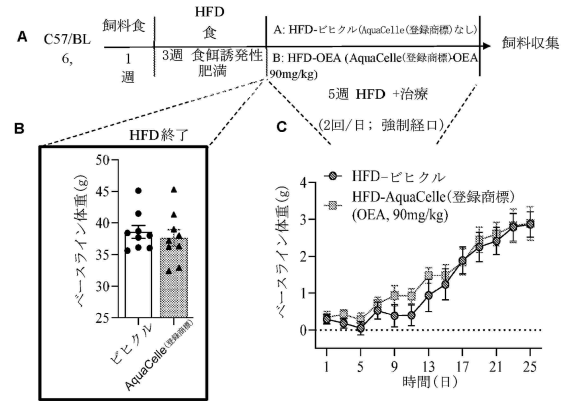


10

【図 7 D】

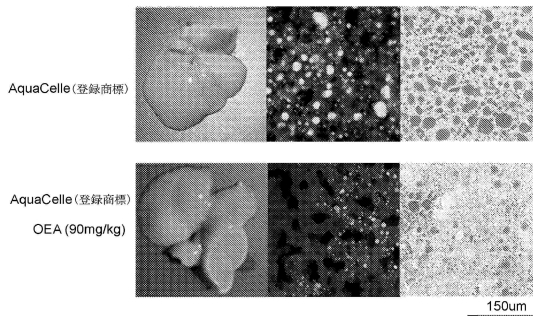


【図 8】

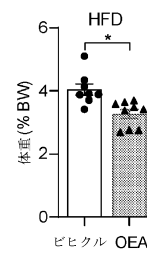


20

【図 9 A】



【図 9 B】

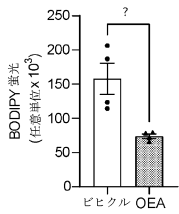


30

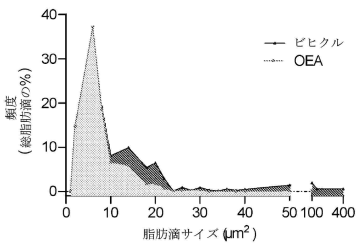
40

50

【図 9 C】

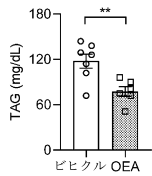


【図 9 D】

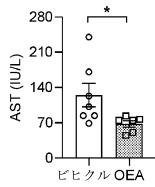


10

【図 10 A】

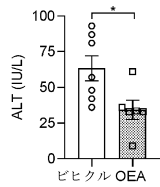


【図 10 B】

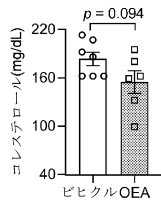


20

【図 10 C】



【図 10 D】

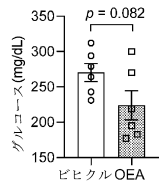


30

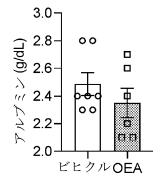
40

50

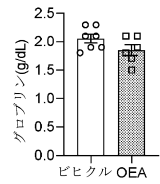
【図 1 0 E】



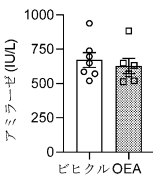
【図 1 0 F】



【図 1 0 G】

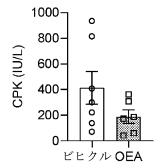


【図 1 0 H】



10

【図 1 0 I】



20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. A61K 31/16, A61K 47/44, A23L 33/115 (2023.01) ADD. A23L 33/10 (2023.01) CPC - INV. A61K 31/16, A61K 47/44, A23L 33/115 ADD. A23L 33/10 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2020/0155455 A1 (Pharmako Biotechnologies Pty Limited) 21 May 2020 (21.05.2020) para [0009], [0021], [0031]-[0032], [0034], [0060], [0067]	1 — 2-8
Y	Bremmell et al. A self-emulsifying Omega-3 ethyl ester formulation (AquaCelle) significantly improves eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid bioavailability in healthy adults. title, abstract,	2-4, (5-8)/(2-4)
A	US 2019/0054046 A1 (Frimline Private Limited) 21 February 2019 (21.02.2019) para [0060], [0094]	5-8
A	CN 102579413 A (Fu) 18 July 2012 (10.07.2012) abstract	5-8
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 February 2023		Date of mailing of the international search report MAR 16 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Karl Rodriguez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 22/81372

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 9-12
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 47/24 (2006.01)

F I

A 6 1 K 47/24

テーマコード (参考)

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,
ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,C
O,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,I
R,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ビオメリ, ダニエレ

アメリカ国, カリフォルニア州 9 2 6 9 7, アーバイン, スイート 1 0 0, 5 2 7 0 カリフォ
ルニア アベニュー, ユーシーアイ ビオール アプライド イノベーション内

(72)発明者 リン, リン

アメリカ国, カリフォルニア州 9 2 6 9 7, アーバイン, スイート 1 0 0, 5 2 7 0 カリフォ
ルニア アベニュー, ユーシーアイ ビオール アプライド イノベーション内

F ターム (参考) 4C076 AA60 BB01 CC16 CC21 DD46 DD63 EE53 FF25 FF34

4C206 AA01 AA02 GA03 GA26 MA03 MA05 MA57 MA72 NA11 NA13

NA14 ZA75 ZC33