

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7294756号

(P7294756)

(45)発行日 令和5年6月20日(2023.6.20)

(24)登録日 令和5年6月12日(2023.6.12)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

T

A 6 1 K 31/455 (2006.01)

A 6 1 K 31/455

A 6 1 K 31/706 (2006.01)

A 6 1 K 31/706

A 6 1 K 36/74 (2006.01)

A 6 1 K 36/74

A 6 1 P 21/00 (2006.01)

A 6 1 P 21/00

請求項の数 14 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-538781(P2020-538781)

(86)(22)出願日 平成31年1月14日(2019.1.14)

(65)公表番号 特表2021-511497(P2021-511497
A)

(43)公表日 令和3年5月6日(2021.5.6)

(86)国際出願番号 PCT/EP2019/050819

(87)国際公開番号 WO2019/141627

(87)国際公開日 令和1年7月25日(2019.7.25)

審査請求日 令和3年12月23日(2021.12.23)

(31)優先権主張番号 18152186.5

(32)優先日 平成30年1月17日(2018.1.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18187656.6

(32)優先日 平成30年8月7日(2018.8.7)

最終頁に続く

(73)特許権者 500282999

ユニヴァーシティ・オブ・サウザンプト
ンUNIVERSITY OF SOUTH
AMPTONイギリス国、ハンプシャー・エスオー1
7・1ビージェイ、サウザンプトン、ハ
イフィールドHighfield, Southam
pton, Hampshire SO1
7 1BJ, United Kingd
om

(73)特許権者 503231882

エージェンシー フォー サイエンス、テ
クノロジー アンド リサーチ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 サルコペニア及びN A D欠乏のリスクの予測及び階層化の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象がサルコペニアを有するかの判定を補助するための方法であって、

(a) 前記対象から得た血液由来のサンプル中のアントラニル酸のレベルを測定する工
程と、

(b) 前記サンプル中のアントラニル酸のレベルを基準値と比較する工程と、

を含み、前記サンプル中のアントラニル酸のレベルが前記基準値と比較して増加してい
ることが、サルコペニアの指標である、方法。

【請求項2】

前記血液は空腹時の血液である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

サルコペニアが、筋肉量低下、筋力低下、及び身体パフォーマンス低下のうちの1つ以
上によって評価される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

(i) 筋肉量がD X A、M R I又はD 3クレアチン希釈法によって測定され、(i i)
筋力が握力又は膝伸展筋力によって測定され、(i i i) 身体パフォーマンスが歩行速度
、S P P B、4 0 0 m歩行テスト、T U Gテスト、又は階段昇段テストによって測定され
る、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

アントラニル酸の前記レベルが質量分析によって測定される、請求項1～4のいずれか一

項に記載の方法。

【請求項 6】

前記対象がヒト対象である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記ヒト対象が高齢者又は高齢者である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記基準値が、同じ対象から得たサンプル又は対象の群から得たサンプルから決定される、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

対象におけるサルコペニアの治療又は予防に使用するための、NAD 前駆体を含む栄養組成物であって、前記対象が高齢であり、かつ、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法に従ってサルコペニアを有するものとして識別されている、栄養組成物。

10

【請求項 10】

サルコペニアを有する対象の、栄養組成物に対する応答性を予測するための方法であって、

(a) 前記対象から得た血液由来のサンプル中のアントラニル酸のレベルを検出する工程と、

(b) 前記サンプル中のアントラニル酸のレベルを基準値と比較する工程と、

(c) 工程 (b) の結果に基づいて、前記対象の前記栄養組成物に対する応答性を予測する工程と、

20

を含む、方法。

【請求項 11】

前記サンプル中のアントラニル酸のレベルが前記基準値と比較して増加していた場合、前記対象は前記栄養組成物に対して応答性であると予測されることとなる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記栄養組成物がビタミン B3 を含む、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記栄養組成物が NAD 前駆体を含む、請求項 10 又は 11 に記載の方法。

【請求項 14】

前記 NAD 前駆体がニコチンアミドリボシドである、請求項 13 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

加齢に伴う筋肉量及び筋機能の低下は、全ての個体において避けられないものであるが、その進行は、遺伝的要因並びに身体活動及び栄養摂取などの環境要因によって大きく異なる。

【0002】

サルコペニアは、加齢に伴う筋肉量及び筋機能の低下が悪化して、生活の質に影響を及ぼすようになっている状態であるとして定義されている。対照的に、フレイルは、加齢に伴う身体機能の衰えという別の分類であり、筋肉量ではなく、筋力及び筋機能の低下を特徴とする。サルコペニアは、可動性が病的状態にある個体について高齢集団を階層化する区切りを使用して、筋肉量及び筋機能の低下により臨床的に定義される。サルコペニアからは将来的な身体障害及び死亡が予測され、サルコペニアには、2016 年に公式の ICD-10 疾病コードが割り当てられている (Anker ら、2016)。

40

【0003】

サルコペニアは、65 歳を超える男女のいずれもで一般的であり、実施された操作的定義によると、世界での有病率は 3 ～ 30 % と推定される。サルコペニアは、フレイル、障害、肥満、糖尿病、及び骨粗鬆症を含む数多くの有害な身体的及び代謝的転帰に関連する。結果として、サルコペニアに起因するかなりの医療コストが存在する。年齢、性別、体

50

格、遺伝率及び身体活動は、確認されている成人影響 (adult influences) であるが、高齢個体の間には、筋肉量及び筋力について説明のつかないばらつきがなおも存在する。

【0004】

サルコペニアは、神経筋伝達障害、興奮収縮連関の変化、幹細胞枯渇に関連した再生能の低下、筋線維におけるミトコンドリア代謝及びエネルギー代謝の不全並びに最終的な骨格筋の大理石様脂肪化及び線維化などの病態生理学的変化に関連する多因性症候群である。したがって、この症候群の病因は、複雑であり、また十分に解明されていないが、身体活動の低下、タンパク同化ホルモン (アンドロゲン、IGF-1) のホルモン減少及び栄養不良／栄養失調が強く関与している。

【0005】

MEMOSA (Multi-Ethnic Molecular Determinants of Human Sarcopenia) 研究は、ヒトにおいてサルコペニアと関連付けられている分子上の変化及び栄養上の変化を決定するために設計された。

【0006】

本出願の発明者らは、体内のアントラニル酸及びトリゴネリンのレベル、並びにトリゴネリンレベル：アントラニル酸レベルの比は、対象におけるサルコペニア、又はサルコペニア発症リスク増加の指標であることを発見した。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】血清中のトリゴネリンレベルは、サルコペニア患者において異なっており、除脂肪筋肉量、握力、及び歩行と正の相関があることを示す図である。

【図2】血清中のアントラニル酸レベルは、サルコペニア患者において異なっており、除脂肪筋肉量、握力、及び歩行と負の相関があることを示す図である。

【図3】血清中のトリゴネリンレベル：アントラニル酸レベルの比は、サルコペニア患者において異なっており、除脂肪筋肉量、握力、及び歩行と正の相関があることを示す図である。

【図4A】サルコペニアの筋肉の対照の筋肉に対する遺伝子セットエンリッチメント解析 (GSEA) である。

【図4B】図4Aから選択された酸化リン酸化遺伝子セットのGSEAエンリッチメントプロットである。ヒトサルコペニアの骨格筋のRNA配列は、ミトコンドリア機能不全がサルコペニア下の転写における主な変化であることを明らかにしている。

【図5A】サルコペニアの筋肉の対照の筋肉に対する遺伝子セットエンリッチメント解析である。

【図5B】図5Aから選択された酸化リン酸化遺伝子セットのGSEAエンリッチメントプロットである。骨格筋ミトコンドリアの機能遺伝子の発現と血清中トリゴネリンレベルとの正の相関を示す。

【図6A】サルコペニアの筋肉の対照の筋肉に対する遺伝子セットエンリッチメント解析である。

【図6B】図6Aから選択された酸化リン酸化遺伝子セットのGSEAエンリッチメントプロットの図である。骨格筋ミトコンドリアの機能遺伝子の発現と血清中アントラニル酸レベルとの負の相関を示す。

【図7A】サルコペニアの筋肉の対照筋肉に対する遺伝子セットエンリッチメント解析の図である。

【図7B】図7Aから選択された酸化リン酸化遺伝子セットのGSEAエンリッチメントプロットの図である。骨格筋ミトコンドリアの機能遺伝子の発現と血清中トリゴネリンレベル：アントラニル酸レベルの比との正の相関を示す。

【図8】ヒトサルコペニア筋肉では、NMAT1、NAMPT、及びPNPなどの遺伝子の発現が低下していることを示す図である。

【図9】対照及びサルコペニアの参加者の筋生検におけるNAD⁺レベルである。

【図10】血清中のトリゴネリンレベル：アントラニル酸レベルの比は、除脂肪筋肉量指

10

20

30

40

50

数と正の相関を有することを示す図である。

【発明の詳細な説明】

【0008】

本発明は、対象がサルコペニアを有するか、又はサルコペニア発症リスクが高いかを判定する方法であって、

(a) 対象から得たサンプル中のアントラニル酸のレベルを測定する工程と、

(b) サンプル中のアントラニル酸のレベルを基準値と比較する工程と、

を含み、サンプル中のアントラニル酸のレベルが基準値と比較して増加していることが、サルコペニア又はサルコペニア発症リスクの指標である、方法に関する。

【0009】

一実施形態では、方法は、

(a) 対象から得たサンプル中のトリゴネリンのレベルを測定する工程と、

(b) サンプル中のトリゴネリンのレベルを基準値と比較する工程と、

を更に含み、サンプル中のトリゴネリンのレベルが基準値と比較して減少していることが、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスクの指標である。

【0010】

本発明はまた、対象がサルコペニアを有するか、又はサルコペニア発症リスクが高いかを判定する方法であって、

(a) 対象から得たサンプル中のトリゴネリン及びアントラニル酸のレベルを測定する工程と、

(b) サンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比を決定する工程と、

(c) サンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比を基準値と比較する工程と、

を含み、サンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比と基準値との比較が、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスクの指標である、方法に関する。

【0011】

一実施形態では、対象から得たサンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比が基準値と比較して減少していることは、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスク増加の指標である。

【0012】

本発明はまた、対象がサルコペニアを有するか、又はサルコペニア発症リスクが高いかを判定する方法であって、

(a) 対象から得たサンプル中のトリゴネリン及びアントラニル酸のレベルを測定する工程と、

(b) サンプル中のアントラニル酸：トリゴネリンの比を決定する工程と、

(c) サンプル中のアントラニル酸：トリゴネリンの比を

基準値と比較する工程と、

を含み、サンプル中のアントラニル酸：トリゴネリンの比と基準値との比較が、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスクの指標である、方法に関する。

【0013】

一実施形態では、対象から得たサンプル中のアントラニル酸：トリゴネリンの比が基準値と比較して増加していることが、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスク増加の指標である。

【0014】

本発明はまた、対象がサルコペニアを有するか、又はサルコペニア発症リスクが高いかを判定する方法であって、

(a) 対象から得たサンプル中のトリゴネリン及びアントラニル酸のレベルを測定する工程と、

(b) サンプル中のアントラニル酸及びトリゴネリンの相対量又は組み合わせを決定する工程と、

(c) サンプル中のアントラニル酸及びトリゴネリンの相対量又は組み合わせを基準値

10

20

30

40

50

と比較する工程と、

を含み、サンプル中のアントラニル酸及びトリゴネリンの相対量又は組み合わせの基準値との比較が、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスクを示し、

上記組み合わせが、 $n * f(A) + m * g(B)$ [式中、A及びBは、トリゴネリン及びアントラニル酸の濃度であり、 $f()$ 及び $g()$ は数学的変換を表し、 n 及び m は正又は負であり得る数値係数である]として定義される、方法に関する。

【0015】

例えば、組み合わせは、 $1 * \log_2(A) + (-1) * \log_2(B) = \log_2(A/B)$ 又は $1 * \log_2(A) - 2 \log_2(B) = \log_2(A/(B)^2)$ として定義され得る。

10

【0016】

一実施形態では、数学的変換は、対数変換を含む。

【0017】

一実施形態では、対象から得たサンプル中のアントラニル酸のトリゴネリンに対する相対量が基準値と比較して増加していることが、対象におけるサルコペニア又はサルコペニア発症リスク増加の指標である。

【0018】

一実施形態では、本発明は、対象がサルコペニアを有するかを判定する方法に関する。

【0019】

一実施形態では、本発明は、対象のサルコペニア発症リスクが高いかを判定する方法に関する。

20

【0020】

サルコペニアは、筋肉量低下、筋力低下、及び身体パフォーマンス低下のうちの1つ以上によって評価される。より好ましくは、サルコペニアは、筋肉量低下、筋力低下、及び身体パフォーマンス低下のうちの2つ以上によって評価される。最も好ましくは、サルコペニアは、筋肉量低下、筋力低下、及び身体パフォーマンス低下によって評価される。これらは全て、当業者に周知の方法によって測定できる。

【0021】

筋肉量は、CT（コンピュータ断層撮影）、DXA（二重エネルギーX線吸収測定）、MRI（磁気共鳴映像法）又はD3クレアチン希釈法によって測定できる。

30

【0022】

筋力は、握力（例えば、ハンドヘルドダイナモメトリーを使用）又は膝伸展筋力（例えば、四頭筋トルク測定を使用）によって測定できる。

【0023】

身体パフォーマンスは、歩行速度、SPPB、400m歩行試験、TUG（time up and go）テスト、又は階段昇段テストによって測定できる。

【0024】

一実施形態では、トリゴネリン及びアントラニル酸のレベルは質量分析によって測定される。好ましくは、トリゴネリン及びアントラニル酸のレベルは、液体クロマトグラフィーに続く質量分析によって測定される。

40

【0025】

一実施形態では、対象はヒト対象である。

【0026】

一実施形態では、ヒト対象は高齢者である。一実施形態では、ヒト対象は老齢である。

【0027】

一実施形態では、対象は、コンパニオンアニマル、好ましくはイヌである。

【0028】

本発明は、対象が筋消耗状態若しくは筋疾患を有するか、又は筋消耗状態又は筋疾患の発症リスクが高いかを判定する方法であって、

(a) 対象から得たサンプル中のアントラニル酸及び／又はトリゴネリンのレベルを測

50

定する工程と、

(b) サンプル中のアントラニル酸及び／又はトリゴネリンのレベルを基準値と比較する工程と、

を含み、サンプル中のアントラニル酸のレベルが基準値と比較して増加していること、又はサンプル中のトリゴネリンのレベルが基準値と比較して減少していることが、筋消耗状態若しくは筋疾患、又は筋消耗状態若しくは筋疾患の発症リスクの指標である、方法に関する。

【0029】

本発明はまた、対象が筋消耗状態若しくは筋疾患を有するか、又は筋消耗状態若しくは筋疾患の発症リスクが高いかを判定する方法であって、

(a) 対象から得たサンプル中のトリゴネリン及びアントラニル酸のレベルを測定する工程と、

(b) サンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比を決定する工程と、

(c) サンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比を基準値と比較する工程と、

を含み、サンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比の基準値との比較が、対象における筋消耗状態若しくは筋疾患、又は筋消耗状態若しくは筋疾患の発症リスク増加の指標である、方法にも関する。

一実施形態では、対象から得たサンプル中のトリゴネリン：アントラニル酸の比が基準値と比較して減少していることが、対象における筋消耗状態若しくは筋疾患、又は筋消耗状態若しくは筋疾患の発症リスク増加の指標である。

【0030】

筋消耗状態は、不使用、不動、長期臥床、ICU（集中治療室）滞在によって引き起こされ得る。

【0031】

筋疾患は、サルコペニア、悪液質（癌、COPD、心不全、腎疾患などの慢性疾患によって引き起こされる）、遺伝的筋障害、及びデュシェンヌ型筋ジストロフィーなどのジストロフィー、コルチコステロイド若しくはスタチンのような薬物によって誘発される筋毒性又は横紋筋融解であり得る。

【0032】

好ましくは、筋疾患はサルコペニアである。

【0033】

以下の実施形態は、本発明の上記の方法のうちの1つ以上に関する。

【0034】

一実施形態では、基準値は、同じ対象から得たサンプル又は対象の群から得たサンプルから決定される。

【0035】

一実施形態では、基準値は、同じ対象からのサンプルで測定される。

【0036】

一実施形態では、基準値は、同じ対象において、例えば栄養組成物を用いた栄養療法の前に測定され、栄養療法後の測定値と比較される。

【0037】

一実施形態では、基準値は、対象の群、例えば、年齢の近い対象の群から得たサンプルで測定される。

【0038】

一実施形態では、対象は高齢者である。

【0039】

一実施形態では、対象は老齢である。

【0040】

一実施形態では、対象から得たサンプルは、血漿サンプルである。

【0041】

10

20

30

40

50

一実施形態では、対象から得たサンプルは、血清サンプルである。

【0042】

一実施形態では、対象から得たサンプルは尿サンプルである。

【0043】

本発明はまた、対象におけるサルコペニアの治療又は予防に使用するための栄養組成物にも関する。

【0044】

一実施形態では、対象はサルコペニアを有するものとして識別されている、又はサルコペニア発症リスクが高い。

【0045】

一実施形態では、対象は、本発明による方法によって、サルコペニアを有するものとして識別されている、又はサルコペニア発症リスクが高い。

【0046】

一実施形態では、栄養組成物はNAD前駆体を含む。一実施形態では、栄養組成物はトリゴネリンを含む。一実施形態では、栄養組成物はトリゴネリンの前駆体を含む。一実施形態では、栄養組成物は、トリゴネリンの誘導体を含む。トリゴネリンは、化学式C₇H₇NO₂及びCAS番号535-83-1を有するアルカロイドである。

【0047】

一実施形態では、対象は高齢者である。

【0048】

一実施形態では、対象は老齢である。

【0049】

一実施形態では、対象は、本発明による方法によってサルコペニアを有するものとして識別され、栄養組成物はNAD前駆体を含み、対象は老齢である。

【0050】

一実施形態では、対象は、本発明による方法によってサルコペニアを有するものとして識別され、栄養組成物はトリゴネリンを含み、対象は老齢である。

【0051】

本発明はまた、対象におけるサルコペニアの治療又は予防の方法にも関する。

【0052】

一実施形態では、対象はサルコペニアを有するものとして識別されている、又はサルコペニア発症リスクが高い。

【0053】

一実施形態では、対象は、本発明による方法によって、サルコペニアを有するものとして識別されている、又はサルコペニアの発症リスクが高いものとして識別される。

【0054】

一実施形態では、本方法は、対象の生活習慣を改善することを含む。

【0055】

一実施形態では、生活習慣を改善することは、身体活動、例えば、体重負荷運動、レジスタンス運動又は持久運動を含む。

【0056】

一実施形態では、対象の生活習慣を改善することは、食生活の変更を含む。

【0057】

一実施形態では、食生活の変更は、サルコペニアを治療又は予防する食生活の一部として、少なくとも1種の栄養組成物を対象に投与することを含む。

【0058】

一実施形態では、栄養組成物はNAD前駆体を含む。

【0059】

一実施形態では、対象は高齢者である。

【0060】

10

20

30

40

50

一実施形態では、対象は老齢である。

【0061】

本発明はまた、筋消耗若しくは筋疾患を有する対象、又は筋消耗若しくは筋疾患の発症リスクが高い対象の、栄養組成物に対する応答性を予測するための方法にも関する。

【0062】

一実施形態では、栄養組成物はNAD前駆体を含み、対象は老齢であり、筋疾患はサルコペニアである。

【0063】

本発明はまた、サルコペニアを有する対象、又はサルコペニアの発症リスクが高い対象の、栄養組成物に対する応答性を予測するための方法にも関する。

【0064】

一実施形態では、栄養組成物はNAD前駆体を含み、対象は老齢である。

【0065】

一実施形態では、本発明の方法は、

(a) 対象から得たサンプル中の1種以上のバイオマーカーのレベルを検出する工程と、

(b) サンプル中の1種以上のバイオマーカーのレベルを基準値と比較する工程と、

(c) 工程(b)の結果に基づいて、対象の栄養組成物に対する応答性を予測する工程と、を含み、

1種以上のバイオマーカーは、アントラニル酸及び／又はトリゴネリンである。

【0066】

対象は、サンプル中のアントラニル酸のレベルが基準値と比較して増加していた場合、栄養組成物又は栄養療法に対して応答性であると予測されることとなる。対象は、サンプル中のトリゴネリンのレベルが基準値と比較して減少していた場合、栄養組成物又は栄養療法に対して応答性であると予測されることとなる。

【0067】

一実施形態では、バイオマーカーはアントラニル酸である。

【0068】

一実施形態では、バイオマーカーはトリゴネリンである。

【0069】

一実施形態では、バイオマーカーは、アントラニル酸とトリゴネリンとの組み合わせである。

【0070】

一実施形態では、バイオマーカーは、アントラニル酸、トリゴネリン、3-ヒドロキシ-アントラニル酸、トリプトファン、キヌレニン、又はこれらの代謝産物の組み合わせである。

【0071】

一実施形態では、栄養組成物はビタミンB3である。

【0072】

一実施形態では、栄養組成物はNAD前駆体、例えばニコチンアミドリボシド、ニコチンアミドモノヌクレオチド、及びニコチンアミドである。

【0073】

一実施形態では、栄養組成物はトリプトファン、キヌレニン、及びこれらの代謝産物である。

【0074】

一実施形態では、栄養組成物はトリゴネリンである。

【0075】

一実施形態では、栄養組成物は、コーヒー、例えば、コーヒー豆抽出物又はコーヒー飲料から誘導される。一実施形態では、上記コーヒー抽出物は、カフェイン酸、トリゴネリン、キノリン酸、及びキノリン酸の前駆体のうちの1つ以上を含む。

【0076】

10

20

30

40

50

対象

用語「対象」は、ヒト及びコンパニオンアニマルを含む任意の動物を意味する。概して、対象は、ヒト、又は鳥類、ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、ヤギ、ネズミ、ヒツジ若しくはブタの動物である。対象は、ウマ又はコンパニオンアニマル、例えば、ネコ又はイヌであり得る。好ましくは、対象は、ヒトである。用語「老齢」は、ヒトに関連して、少なくとも60歳、より好ましくは64歳超、最も好ましくは68歳超の年齢を意味する。用語「高齢者」は、ヒトに関連して、少なくとも45歳、好ましくは50歳超、より好ましくは55歳超の年齢を意味し、老齢の対照を含む。

【0077】

サルコペニア

サルコペニアは、筋肉量低下、筋力低下、及び身体パフォーマンス低下のうちの1つ以上によって評価することができる。

【0078】

対象において、サルコペニアは、例えばChen et al., 2014に記載のように、AWGSOP (Asian Working Group for Sarcopenia in Older People) の定義に基づいて診断できる。筋肉量低下は、概ね、体脂除脂肪量を身長²に対して正規化した値 (ALM指数) が低いこと、具体的には、男性は 7.00 kg/m^2 未満、女性は 5.40 kg/m^2 未満のALM指数を基準とすることができる。身体パフォーマンス低下は、概ね、歩行速度、具体的には $<0.8 \text{ m/秒}$ の歩行速度を基準とすることができる。筋力低下は、概ね、握力低下、具体的には男性 26 kg 未満及び女性 18 kg 未満の握力を基準とすることができる。

【0079】

対象において、サルコペニアは、例えばCruz-Jentoft et al., 2010に記載のように、EWGSOP (European Working Group for Sarcopenia in Older People) の定義に基づいて診断することができる。筋肉量低下は、概ね、体脂除脂肪量を身長²に対して正規化した値 (ALM指数) が低いこと、具体的には、男性は 7.23 kg/m^2 未満、女性は 5.67 kg/m^2 未満のALM指数を基準とすることができる。身体パフォーマンス低下は、概ね、歩行速度、具体的には $<0.8 \text{ m/秒}$ の歩行速度を基準とすることができる。筋力低下は、概ね、握力低下、具体的には男性 30 kg 未満及び女性 20 kg 未満の握力を基準とすることができる。

【0080】

対象において、サルコペニアは、例えば Studenski et al., 2014に記載のように、FNIH (Foundation for the National Institutes of Health) の定義に基づいて診断することができる。筋肉量低下は、概ね、体脂除脂肪量 (ALM) を体格指数 (BMI; kg/m^2) に対して正規化した値が低いこと、具体的には男性は 0.789 未満、女性は 0.512 未満のALM対BMIを基準とすることができる。身体パフォーマンス低下は、概ね、歩行速度、具体的には $<0.8 \text{ m/秒}$ の歩行速度を基準とすることができる。筋力低下は、概ね、握力低下、具体的には男性 26 kg 未満及び女性 18 kg 未満の握力を基準とすることができる。筋力低下はまた、概ね、握力対体格指数の低下、具体的には男性 1.00 未満及び女性 0.56 未満の握力対体格指数を基準とすることができる。

【0081】

D3クレアチン希釈法は、筋肉量を測定する別のアプローチである。この方法は、ロバスタな標準であり、将来のDXA代替法となり得る方法として、より広く受け入れられている。D3クレアチン希釈法は、Clark et al. (2014) 及びStimpson et al. (2013) によって既に記載されている。

【0082】

本方法は、対象から得たサンプル中のトリゴネリンのレベル、アントラニル酸のレベル、及び／又はこれらのレベルの比を測定することを含む。これは、「試験サンプル」と呼

10

20

30

40

50

ばれることもある。したがって、本方法は、典型的には、ヒト又は動物の身体の外側で、例えば、試験を行う対象から事前に得た体液サンプルに対して行われる。

【0083】

サンプルは、例えば、血清、血漿又は尿サンプルであってよい。サンプルは、血液から得てもよく、すなわち、サンプルは、全血又は血液画分を含んでもよい。サンプルは、血漿又は血清を含むことができる。好ましくは、サンプルは血清サンプルである。

【0084】

血液サンプルを採取し、血液画分を分離する手法は、当該技術分野において周知である。例えば、静脈血サンプルは、針を用いて患者から採取し、プラスチック管中に保管することができる。採取管は、例えば、スプレーコーティングしたシリカ、及び血清分離のためのポリマーゲルを含んでいてもよい。血清は、1300RCFにおいて室温で10分間の遠心分離によって分離し、小型プラスチック管中、 -80°C で保管することができる。

【0085】

基準値との比較

本方法は、アントラニル酸及びトリゴネリンのレベルと、アントラニル酸及びトリゴネリンの基準値レベルとの比較を含む。用語「基準値」は、「対照値」と同義であり、技術的データの正確な解釈を促すために当業者が使用するデータを広く含む。

【0086】

対象から得たサンプル中のアントラニル酸のレベル、トリゴネリンのレベル、及び／又はトリゴネリンレベル：アントラニル酸レベルの比を、同じ対象のレベル及び／若しくは比、又は対照対象者の1つ以上のコホート（集団／群）のレベル及び／若しくは比と比較することができる。

【0087】

基準値は、同じ対象からのサンプルを、例えば反復サンプルのアッセイによって分析することによって確立され得る。基準値は、一般集団又は選択集団中の個体のサンプルを分析し、陽性判定基準を選択するための予測的中率法又は最適な特異度（最も高い真陰性率）及び感度（最も高い真陽性率）を定義する受信者操作特性曲線などの統計モデルを使用することによって確立することができる。これは、Knapp, R. G., and Miller, M. C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*. William and Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, Pa. に記載されているとおりである（この文献を参考として本明細書に援用する）。

【0088】

基準値は、少なくとも1つの個体、より好ましくは少なくとも5つの個体、より好ましくは少なくとも10の個体、より好ましくは少なくとも15の個体、最も好ましくは少なくとも20の個体を分析することによって確立され得る。上記個体の全て又はかなりの数が、好ましくはサルコペニアを有さない。

【0089】

正しい基準値をどのように割り当てるについては、当業者に知られているが、これらは、例えば、性別、人種、遺伝的遺産、健康状態又は年齢に応じて変わる。

【0090】

栄養組成物

本発明による栄養組成物は、栄養補助組成物、機能性食品、機能性栄養製品、薬物として規制される医療用食品、医療栄養製品、又は栄養補助食品であってもよい。

【0091】

用語「栄養補助食品」（nutraceutical）は、単語「栄養」（nutrition）と「医薬」（pharmaceutical）を組み合わせたものである。栄養補助食品は、疾患の予防及び処置を含む、健康及び医学的利益をもたらす食品又は食品製品である。栄養補助食品は、通常は食品と関連しない医薬品の形態で一般に販売されており、食品から分離された又は精製された製品である。栄養補助食品は、生理学的効果を有すること、又は慢性疾患に対する保

10

20

30

40

50

護をもたらすことが実証されている。このような製品は、分離された栄養素、健康補助食品、及び特別食から、遺伝子操作された食品、ハーブ製品、並びにシリアル、スープ、及び飲料などの加工食品にまで及び得る。

【0092】

本明細書で使用する時、用語「栄養補助食品」は、栄養分野及び医薬品分野の両方において有用であることを意味する。したがって、栄養補助組成物は、食品及び飲料への栄養補助剤として、並びにカプセル若しくは錠剤などの固体製剤、又は溶液若しくは懸濁液などの液体製剤であり得る経腸若しくは非経口適用の医薬製剤として使用できる。

【0093】

本発明による栄養組成物は、トリゴネリン、トリゴネリンの前駆体、及び／又はトリゴネリンの誘導体を含み得る。トリゴネリンの前駆体は、例えば、キノリン酸、ニコチン酸、及び／又はニコチンアミドであってもよい。

10

【0094】

好ましくは、本発明による栄養組成物は、NAD前駆体、例えばニコチンアミドリボシド、ニコチンアミドモノヌクレオチド、及びニコチンアミド及び／又はニコチン酸を含む。

【0095】

本発明による栄養組成物は、保護親水コロイド（ガム、タンパク質、改質デンプンなど）、結合剤、被膜形成剤、封入剤／封入材、壁／シェル材料、マトリックス化合物、コーティング、乳化剤、表面活性剤、可溶化剤（油、脂肪、ワックス、レシチンなど）、吸着剤、担体、充填剤、共化合物、分散剤、湿潤剤、加工助剤（溶媒）、流動剤、矯味剤、増量剤、ゼリー化剤、ゲル形成剤、酸化防止剤及び抗菌剤を更に含んでもよい。

20

【0096】

更に、マルチビタミン及びミネラルサプリメントを本発明の栄養組成物に添加して、一部の食生活で欠けている必須栄養素を適量得ることができる。マルチビタミン及びミネラルサプリメントはまた、疾患予防並びに生活習慣のパターンによる栄養の減少及び栄養失調に対する補償に有用であり得る。

【0097】

本発明の栄養組成物は、身体への投与に適した任意のガレヌス製剤の形態（galenic form）であってもよく、特に従来経口投与に用いられる任意の形態、例えば、食品又は飼料（そのための添加剤／栄養補助剤）、食品又は飼料プレミックス、強化食品又は飼料、錠剤、丸剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、並びに粉末及び錠剤などの発泡性製剤などの固体形態、又は溶液、エマルジョン若しくは懸濁液（例えば、飲料、ペースト、及び油性懸濁液として）などの液体形態であってもよい。ペーストは、ハード又はソフトシェルカプセルに組み込まれてもよく、それにより、カプセルは、例えば、（魚、ブタ、家禽、ウシ）ゼラチン、植物タンパク質、又はリグニンスルホネートのマトリックスを特徴とする。他の適用形態の例は、経皮、非経口、又は注射可能な投与のための形態である。栄養組成物は、制御（遅延）放出製剤の形態であってもよい。

30

【0098】

栄養組成物は飲料を含んでもよい。用語「飲料」は、非アルコール飲料及びアルコール飲料並びに飲用水及び液体食品に添加される液体製剤を包含する。非アルコール飲料は、例えば、ソフトドリンク、スポーツドリンク、果汁、茶、及び乳ベースのドリンクである。液体食品は、スープ及び乳製品を含んでもよい。本発明の化合物を含む栄養補助組成物は、ソフトドリンク、エネルギーバー、又はキャンディに添加されてもよい。

40

【0099】

栄養組成物が栄養補助製剤であり、組成物が、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤又は補助剤を更に含有する場合、その配合には標準的な技術、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition Williams & Wilkins, PA, USAに開示されている技術を使用してもよい。経口投与の場合、好適な結合剤（例えばゼラチン又はポリビニルピロリドン）、好適な充填剤（例えばラクトース又はデンプン）、好適な潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム）

50

、及び任意に追加の添加剤を含有する、錠剤及びカプセルが好ましくは使用される。

【0100】

「機能性食品」、「機能性栄養製品」、「医療用食品」、及び「医療用栄養製品」は、栄養素を供給するという基本機能を超える健康増進又は疾患予防特性を有すると主張する任意の健康食品に関連する。機能性食品の一般的なカテゴリーには、「ビタミン強化」製品のような、健康増進添加剤で強化された加工食品又は食品類が含まれる。

【0101】

栄養補助食品は、食品補助剤又は栄養補助剤としても知られ、食生活を補うこと、及びビタミン、ミネラル、繊維、脂肪酸、又はアミノ酸など、個人の食生活で欠けている場合がある又は十分な量で消費されていない場合がある栄養素を補給することを目的とした配合物である。栄養補助食品を食品として定義している国もあれば、薬物又は天然健康製品として定義している国もある。ビタミン又は食事性ミネラルを含有する栄養補助食品は、食品、食品生産、及び食品安全性に関する国際的に認識された規格、実施規準、ガイドライン、及びその他の勧告を集めたものであるコーデックス規格 (Codex Alimentarius) に、食品の1カテゴリーとして含まれている。コーデックス規格は、国際連合食糧農業機関 (FAO) と世界保健機関 (WHO) が後援する組織であるコーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission) によって作成されている。

【0102】

疾患の予防又は治療

「予防」は、状態又は疾患のリスク及び／又は重症度を低減させることを含む。用語「治療」、「治療する」、「軽減する」及び「緩和する」には、予防若しくは予防的治療 (標的とする病態若しくは障害の発現を予防する及び／又は遅らせる) と、治癒的、治療的若しくは疾患改善的な治療の両方が含まれ、例えば、診断された病態又は障害の治癒、遅延、症状の緩和、及び／又は進行の停止のための治療的手段、並びに、疾患のリスクがある患者又は疾患に罹患する疑いのある患者、及び体調不良の患者又は疾患若しくは医学的症状に罹患していると診断された患者の治療が含まれる。この用語は、完治するまで対象が治療されることを必ずしも意味するものではない。これらの用語の全てはまた、疾患を患っていないが、不健康な状態を起こしやすい対象の健康維持及び／又は促進も意味する。これらの用語はまた、1つ以上の主たる予防的又は治療的手段の相乗作用あるいは増進を含むことを意図するものである。用語「治療」、「治療する」、「軽減する」及び「緩和する」は更に、疾患若しくは症状に対する食事療法、又は疾患若しくは症状の予防 (prophylaxis) 若しくは予防 (prevention) のための食事療法を含むことを意図するものである。治療は患者に関連するものであってもよく、又は医師に関連するものであってもよい。

【0103】

実施例により本発明を更に説明するが、これらの実施例は、当業者が本発明を実施するのに役立てるために提供することを意味するものであり、本発明の範囲を限定することを決して意図するものではない。

【実施例】

【0104】

実施例1

血清中の代謝産物の測定

65～79歳の主に中国系の男性の参加者20人と、サルコペニアと診断されていない同年齢群の20人の対照対象者を、シンガポールの健康なコミュニティに居住する高齢者に関する2つの研究 (Singapore Sarcopenia Group及びAgeing in a Community Environment Study [ACES]) から募集した。サルコペニアは、Asian Working Group for Sarcopenia in Older People (Chen et al., 2014) の定義を用いて、サルコペニアの標準化された操作的定義 (Cruz-Jentoft et al., 2010) に従って診断された。

【0105】

NHG DSRB (National Healthcare Group Domain Specific Research Board) は、この研究 (参照番号 2014/01304) を承認し、各参加者は書面によるインフォームド・コンセントを提出した。体重及び身長は、0.1 kg 又は 1 cm 単位で測定した。総除脂肪量は、二重エネルギー X 線吸収測定 (DXA) 走査 (APEX Software version 4.0.1, Discovery Wi DXA system) により測定した。標準化されたプロトコルを使用して、等尺性ハンドグリップを Jamar ハンドヘルドダイナモメーターで測定し、利き手の 3 回の試行の平均を最終測定値として使用した。身体パフォーマンスは、通常ペースの 6 m 歩行テストにおける歩行速度を測定することによって評価した。サルコペニアの診断は、総体肢除脂肪量を身長に対して正規化した値が 7.00 kg/m² 未満として定義された AWG SOP の定義、歩行速度 < 0.8 m/秒を基準とした身体パフォーマンスの低下又は握力 < 26 kg を基準とした筋力低下のいずれかのエビデンスに基づいて行った。人体計測パラメータは、対照群及びサルコペニア群において、次のとおりであった。

【表 1】

	対照 (n=20)			サルコペニア (n=20)			p 値
	平均	+/-	標準偏差	平均	+/-	標準偏差	
身長 (m)	1.67	+/-	0.06	1.63	+/-	0.07	N. S.
体重 (kg)	63.08	+/-	6.06	57.60	+/-	5.45	0.005
体格指数 (kg/m ²)	22.70	+/-	1.01	21.47	+/-	1.54	0.005
年齢 (歳)	70.20	+/-	4.10	72.75	+/-	4.18	N. S.
総除脂肪体重 (二重エネルギー X 線吸収測定による) (kg)	44.53	+/-	3.86	38.36	+/-	3.01	2.18E-06
脂肪量 (二重 エネルギー X 線吸収 測定法による) (kg)	15.39	+/-	3.67	15.73	+/-	4.02	N. S.
体肢除脂肪量指数 (kg/m ²)	7.42	+/-	0.39	6.20	+/-	0.48	1.44E-08
握力 (kg)	35.11	+/-	5.93	24.91	+/-	2.56	2.02E-08
歩行速度 (m/s)	1.40	+/-	0.23	1.09	+/-	0.29	0.0006

【0106】

空腹時血液サンプルを、真空容器管及び留置した 20 ゲージ翼状針を使用して、肘前窩から採取した。血液を 4℃、3000 rpm で 10 分間遠心分離し、次いで血清を分割し、更に分析するまで -80℃ で凍結した。血清中のアントラニル酸及びトリゴネリンのレベルを、BEVITAL laboratories (Bergen, Norway) において、液体クロマトグラフィーに続く質量分析 (LC-MS/MS) により測定した。ストローク長を 3 段階で調節できる (13 mm、23 mm、33 mm) Biopince (商標) (Angiotech) 16 G フルコア生検針を使用して、20 人の男性参加者及び 20 人の同年齢対照から外側広筋の半開放筋生検を採取し、液体窒素中で急速冷凍し、更に分析するまで -80℃ で保管した。

【0107】

血清中トリゴネリンレベル、アントラニル酸レベル及びこれらの比 (トリゴネリン: アントラニル酸) について、サルコペニア症例と対照との間の差を、ウィルコクソン検定及び log₂ 変換後のスチューデント t 検定を用いて試験した。本発明者らは、これらの検体と、サルコペニアの評価に使用した連続する臨床的変数 (体肢除脂肪筋肉量指数 (AL

$\text{Mi} ; \text{kg} / \text{m}^2$ ）、握力及び歩行速度）との間の相関を、血清中の検体濃度の $\log 2$ 変換後にスピアマンの順位相関及びピアソン相関の両方を適用して調べた。

【0108】

図1～3は、血清中のトリゴネリンレベル、アントラニル酸レベル及びトリゴネリン：アントラニル酸の比がサルコペニア患者において異なっており、除脂肪筋肉量、握力、及び歩行との正の相関があることを示す。トリゴネリン（図1）、アントラニル酸（図2）及びトリゴネリン／アントラニル酸比（図3）を、20人のサルコペニア患者のヒトコホート及び20人の同年齢対照（全員が65歳超）の血清において測定した。左側のパネルは、サルコペニア患者及び対照患者の血清中の検体の $\log 2$ 値を表す。右側のパネルは、血清中の検体と、筋肉量、握力、及び歩行速度の代用としてDXAによって測定した体脂肪除脂肪体格指数（ALMi）との相関性を表す。オレンジ色の線は、検体に対する臨床的変数の当てはめ回帰直線を示し、灰色の部分は、当てはめたモデルの95%信頼区間を示す。報告されたp値は、 $\log 2$ 変換値に対するスチューデントT統計（症例対照）又はピアソン相関（相関分析）を用いて計算した。

【0109】

実施例2

筋肉の遺伝子発現の解析

筋肉の遺伝子発現を解析するために、製造元による使用説明に従ってQiagenのキットを使用して、筋肉生検から全RNAを抽出した。RNA量はRibogreen（Life Technologies）で測定し、RNAの質は標準感度のRNA分析キットを用いてフラグメントアナライザー（Advanced Analytical Technologies）で確認した。全てのRNAサンプルは均質であり、260/280nm比>1.8及びRINスコア>7で品質管理に合格した。RNAの配列決定のために、各サンプルから250ngの全RNAをライブラリー調製の出発材料として用い、Ribo-Zero magnetic Kit（Illumina）を使用してリボソームRNAを除去した。TruSeq Stranded RNA HT及びRibo-Zero Goldキット（Illumina）を使用して配列決定ライブラリーを調製した後、KAPA HiFi HotStart ReadyMix（Kapa Biosystems）を用いPCR増幅工程を13サイクル実施した。ライブラリーは、Picogreen（Life Technologies）で定量し、サイズパターンはDNA高感度試薬キットを用いてLabChip GX（Perkin Elmer）で管理した。次いで、ライブラリーを等モル比でプールし、ペアエンド法で配列決定フローセル（Illumina）にて7pmolの濃度でクラスター形成させた。配列決定は、V3ケミストリーを用いHiSeq 2500（Illumina）で2×101サイクル実施した。生成されたデータに、Casavaを使用してデマルチプレックスを行った。STAR（Dobin et al., 2013）を使用してリードをヒトゲノム（hs_GRCh38.p2）にアラインし、遺伝子内にマッピングされたリードの数をHTSeqによって定量した（Anders et al., 2015）（version HTSeq-0.6.1p1、モードunion、strand reverse、quality alignment>10）。サンプルは、1サンプル当たり7500万～1億400万リードのシーケンス深度を有しており、このうち3400万～7700万リードは1か所のみマップされた。

【0110】

対照及びサルコペニアのサンプル間の差次的発現遺伝子は、limmaパッケージ（Myth, 2004）を使用することによって定義した。簡潔に述べると、平均発現が20リード未満である遺伝子を除外した後、edgeR関数のcalcNormFactors（Robinson et al., 2010）に実装されているtrimmed mean of M value（TMM）法によってデータを正規化し、voomWithQualityWeights関数を適用して、平均分散関係をモデル化し、サンプル固有のquality weightsを推定した（Liu et al., 2015）。B

enjamini-Hoehberg法を使用して、複数の試験についてp値を補正した。遺伝子発現と連続パラメータ又はカテゴリ型パラメータ（ALMi、握力及び歩行速度）との間の相関を評価する際には、サルコペニアを定義するために使用したのと同じ手順を適用した。遺伝子セットエンリッチメント解析は、CAMERA（Wu and Smyth, 2012）を使用して実施した。この解析は、Molecular Signatures Database（MSigDB）（Subramanian et al., 2005）においてアノテーションされている遺伝子のセットが差次的発現遺伝子において増加しているかを照会する競合的遺伝子セットのテストである。MSigDB v5.2コレクションのH（ホールマーク遺伝子セット）、C2（キュレーションされた遺伝子セット）及びC5（GO遺伝子セット）を使用してパスウェイ解析を行った。

10

【0111】

図4A～4Bでは、ヒトサルコペニア骨格筋のRNA配列決定から、ミトコンドリアの機能不全がサルコペニア時の主な転写変化であることがわかる。（4A）CAMERA及びMSigDBからのホールマーク遺伝子のセットコレクションを使用した、サルコペニアの筋肉と対照の筋肉の遺伝子セットエンリッチメント解析。赤色のバーは、サルコペニアの筋肉で増加していた遺伝子セットを表し、青色のバーは、サルコペニアの筋肉で減少していた遺伝子セットを表す。遺伝子セットは、エンリッチメントの有意性（significance）の順に並んでいる。（4B）Aから選択された酸化的リン酸化遺伝子セットのGSEAエンリッチメントプロット。

【0112】

20

TMM正規化した筋遺伝子発現と、対象となる各血清検体（トリゴネリン、アントラニル酸及びトリゴネリン：アントラニル酸比）との間のスピアマンの順位相関を計算し、このスピアマンの順位相関を使用して、生物学的ホールマークとなる遺伝子セットコレクションを用いた遺伝子セットエンリッチメント解析を実施した。

【0113】

図4Aの説明：1．酸化的リン酸化、2．脂肪酸代謝、3．MYCターゲットV1、4．同種移植片拒絶、5．MTORC1シグナル伝達、6．ペルオキシソーム、7．脂肪生成、8．上皮間葉転換、9．頂端結合、10．G2Mチェックポイント、11．胆汁酸代謝、12．小胞体ストレス応答、13．反応性酸素種パスウェイ、14．紡錘体、15．UV応答増加、16．UV応答低下、17．PI3K/Akt/mTORシグナル伝達、18．MYCターゲットV2、19．KRASシグナル伝達低下、20．ヘッジホッグシグナル伝達、21．E2Fターゲット、22．インターフェロン γ 応答、23．頂端表面、24．TGF- β シグナル伝達、25．タンパク質分泌、26．IL2-STAT5シグナル伝達。

30

【0114】

図5A～5B、6A～6B、7A～7Bは、骨格筋遺伝子発現と、血清中のトリゴネリンレベル、アントラニル酸レベル、及びトリゴネリン：アントラニル酸比の相関を示す。筋肉遺伝子発現の遺伝子セットエンリッチメント解析（GSEA）と、血清中のトリゴネリンレベル（図5A～5B）、アントラニル酸レベル（図6A～6B）、及びトリゴネリン／アントラニル酸比（図7A～7B）との相関。GSEAは、平均順位（mean-rank）遺伝子セットテスト、及びMSigDBからの生物学的ホールマークとなる遺伝子セットコレクションを使用して実施された。赤色のバーは、骨格筋における発現が検体の血清中レベルと正に相関する遺伝子セットを表し、青色のバーは、骨格筋における発現が検体の血清中レベルと負に相関する遺伝子セットを表す。遺伝子セットは、エンリッチメントの有意性の順に並んでおり、FDR<1%の遺伝子セットのみが示されている。左側の図は、酸化的リン酸化遺伝子セットのGSEAエンリッチメントプロットを表す。

40

【0115】

図5Aの説明：1．酸化的リン酸化、2．MTORC1シグナル伝達、3．タンパク質分泌、4．脂肪生成、5．脂肪酸代謝、6．MYCターゲットV1、7．ペルオキシソーム、8．DNA修復、9．解糖、10．紡錘体、11．筋形成、12．インターフェロン

50

γ 応答、13. PI3K/Akt/mTORシグナル伝達、14. Wnt/β-カテニンシグナル伝達、15. インターフェロンα応答16. 同種移植片拒絶、17. 胆汁酸代謝、18. アンドロゲン応答、19. コレステロールホメオスタシス。

【0116】

図6Aの説明：1. 酸化的リン酸化、2. 脂肪酸代謝、3. 脂肪生成、4. G2Mチェックポイント、5. 胆汁酸代謝、6. ペルオキシソーム、7. 筋形成。

【0117】

図7Aの説明：1. 酸化的リン酸化、2. 脂肪酸代謝、3. 脂肪生成、4. MTORC1シグナル伝達、5. ペルオキシソーム、6. タンパク質分泌、7. 筋形成、8. G2Mチェックポイント、9. MYCターゲットV1、10. 胆汁酸代謝、11. DNA修復、12. コレステロールホメオスタシス、13. KRASシグナル伝達低下、14. 解糖。

【0118】

図8は、ヒトサルコペニア筋肉では、NAD前駆体又は食生活からのNADの生合成及びNADサルベージを制御するNMAT1、NAMPT、及びPNPなどの遺伝子の発現が低いことを示す。高カバレッジでのRNA配列決定によって、筋肉における遺伝子発現を測定した。NMAT：ニコチンアミドヌクレオチドアデニリルトランスフェラーゼ1；NAMPT：ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ；PNP：プリンヌクレオシドホスホリラーゼ。

【0119】

実施例3

筋肉生検におけるNAD+レベルの測定

NADレベルがサルコペニアの筋肉におけるミトコンドリアのシグネチャーの上流トリガであり得るかを判定するために、高齢ヒト筋肉生検材料のNADを測定した。NAD+レベルは、Dall et al., 2018に記載のヒト筋生検で測定した。簡潔に述べると、残りの生検から5mgの筋組織を200μLの0.6M過塩素酸中に溶解し、上清を100mMのNa2HPO4 (pH8.0)で250倍に希釈した。100μLの希釈サンプルを100μLの反応混合物(100mMのNa2HPO4 (pH8)、2%エタノール、90U/mLのアルコールデヒドロゲナーゼ、130mU/mLのジアホラーゼ、10μMのレサズリン、10μMのフラビンモノヌクレオチド、10mMのニコチンアミド)と組み合わせ、蛍光増加(Ex540nm/Em580)を10分かけて測定した。標準曲線からNAD+含量を計算し、組織重量に対して正規化した。

【0120】

図9は、高齢サルコペニア患者のヒト骨格筋においてNADレベルの有意な(32%)減少があったことを示す。サルコペニア患者の骨格筋におけるこのNAD+レベルの大きな減少は、ヒトにおける低NAD+レベルと加齢性病理とを初めて関連付け、ヒト骨格筋におけるNAD欠乏を初めて実証している。この結果は、マウスの老化した筋肉に対するNR及びNMNのようなNAD前駆体の前臨床的有効性と合わせて、老化におけるNAD生物学の臨床的関連性を拡張すると共に、サルコペニア及び加齢による可動性低下についての臨床解釈のガイドとなる。

【0121】

実施例4

女性を含む異なる民族の血清中の代謝産物の測定

この実施例では、70人の主に白人由来の参加者(女性52人と男性18人、中央値78歳(四分位範囲76、81))を検討した。

【0122】

これらの70人の参加者は、一般社会で生活する高齢者の筋肉形態、筋肉量及び筋肉強度に対する生涯の影響を調査するために計画された英国Hertfordshire Cohort Study (HCS)のサブ研究であるHertfordshire Sarcopenia Study (HSS)の一部、又は当該研究の延長期(HSSe)の一部であった。本研究で実施した骨格筋の特性評価には、二重エネルギーX線吸収測定法(

10

20

30

40

50

D X A) 走査によって確認された身体組成及び除脂肪量が含まれた。

【0123】

バキュテイナーチューブ及び留置型20ゲージ翼状針カニューレを使用して、空腹時血液サンプルを肘前窩から採取した。血液を4℃、3000rpmで10分間遠心分離し、次いで血清を分割し、更に分析するまで-80℃で凍結した。血清中のアントラニル酸及びトリゴネリンのレベルを、BEVITAL laboratories (Bergen, Norway) において、液体クロマトグラフィーとそれに続く質量分析(LC-MS/MS)により測定した。

【0124】

トリゴネリン：アントラニル酸の比と四肢除脂肪筋肉量指数(ALMi; kg/m²)との間の相関を、検体の血清濃度のlog₂変換後に年齢について補正した回帰を適用することによって推定した。

【0125】

図10は、トリゴネリン：アントラニル酸の血清レベルの比が、体肢除脂肪量指数で評価した除脂肪筋肉量と相関することを示す。70人の対象(女性52人と男性18人、全員が65歳以上)からなるヒトコホートの血清において、トリゴネリン及びアントラニル酸のレベルを測定した。グラフは、血清中の検体の比(トリゴネリン：アントラニル酸)のlog₂値(x軸)と、筋肉量の代用としてDXAで測定した体肢除脂肪体格指数(ALMi)(y軸)との相関を表す。直線は、ALMiをlog₂(トリゴネリン：アントラニル酸)に対して当てはめた回帰直線を示す。この単純な線形回帰により、ピアソン相関係数0.23、p値=0.031が得られ、年齢について補正した回帰に基づいて、検体の比に対する係数について51%の自由度調整済みR²及びp値=0.024を得た。

【0126】

参考文献

- Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W.(2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.
- Anker, S.D., Morley, J.E., and vonHaehling, S. (2016). Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* 7, 512-514.
- Chen, L.K., Liu, L.K., Woo, J., Assantachai, P., Auyeung, T.W., Bahyah, K.S., Chou, M.Y., Chen, L.Y., Hsu, P.S., Krairit, O., et al. (2014). Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian Working Group for Sarcopenia. *Journal of the American Medical Association* 312, 91-99.
- Clark RV, Walker AC, O'Connor-Semmes RL, Leonard MS, Miller RR, Stimpson SA, Turner SM, Ravussin E, Cefalu WT, Hellerstein MK, Evans WJ. Total body skeletal muscle mass: estimation by creatine (methyl-d3) dilution in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Jun 15;116(12):1605-13.
- Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.P., Rolland, Y., Schneider, S.M., et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39, 412-423.
- Dall, M., Penke, M., Sulek, K., Matz-Soja, M., Holst, B., Garten, A., Kiess, W., and Treebak, J.T. Hepatic NAD(+) levels and NAMPT abundance are unaffected during prolonged high-fat diet consumption in C57BL/6J BomTac mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2018) S0303-7207(18) 30048.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15-21.
- Liu, R., Holik, A.Z., Su, S., Jansz, N., Chen, K., Leong, H.S., Blewitt, M.E., Asselin-Labat, M.L., Smyth, G.K., and Ritchie, M.E. (2015). Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses.

Nucleic acids research 43, e97.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140.

Smyth, G.K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology* 3, Article 3.

Studenski SA, Peters KW, Alley DE, Cawthon PM, McLean RR, Harris TB, Ferrucci L, Guralnik JM, Fragala MS, Kenny AM, Kiel DP, Kritchevsky SB, Shardell M, Dam TT, Vassileva MT (2014). The FNIH sarcopenia project: rationale, study description, conference recommendations, and final estimates. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 69(5), 547-558.

Stimpson SA, Leonard MS, Clifton LG, Poole JC, Turner SM, Shearer TW, Remlinger KS, Clark RV, Hellerstein MK, Evans WJ. (2013) Longitudinal changes in total body creatine pool size and skeletal muscle mass using the D₃-creatine dilution method. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* Jun 25.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 15545-15550.

Wu, D., and Smyth, G.K. (2012). Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic acids research* 40, e133.

【図面】

【図 1】

【図 2】

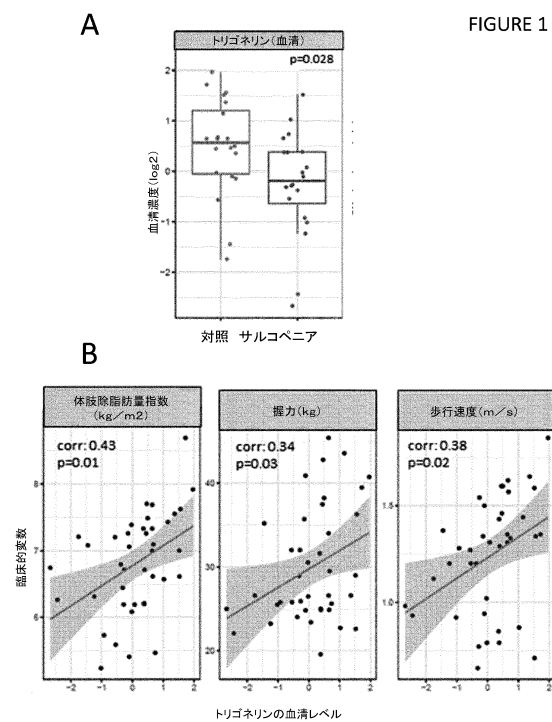


FIGURE 1

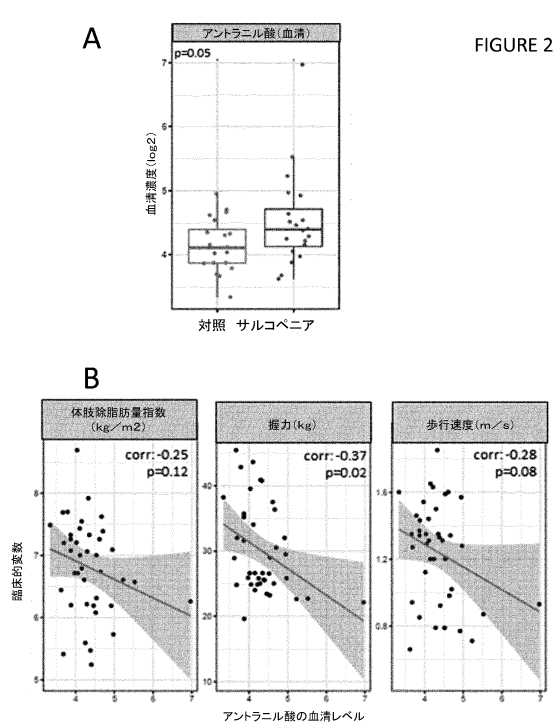


FIGURE 2

10

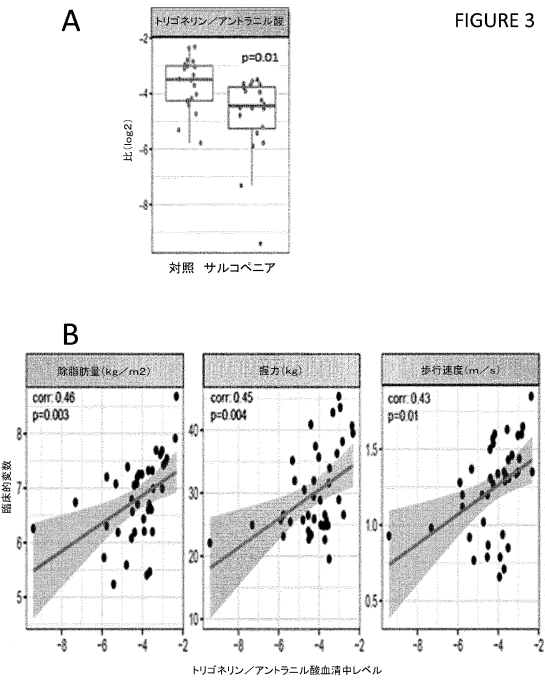
20

30

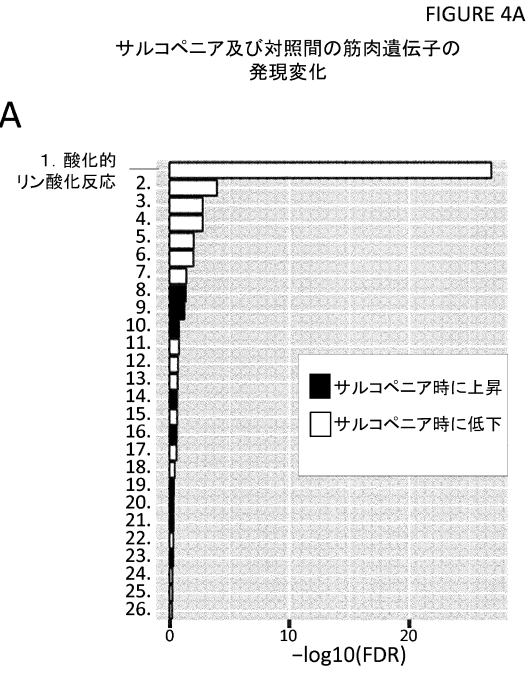
40

50

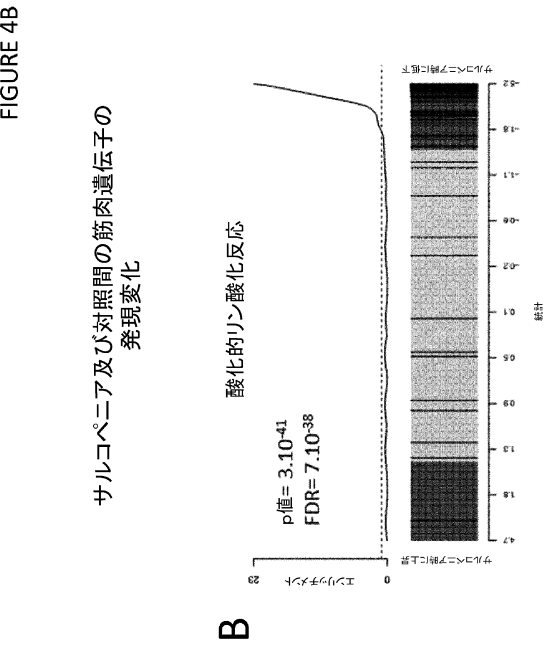
【図 3】



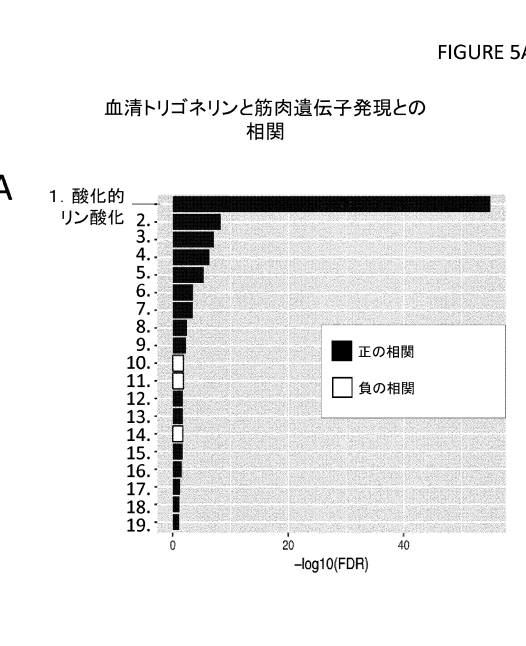
【図 4 A】



【図 4 B】



【図 5 A】



10

20

30

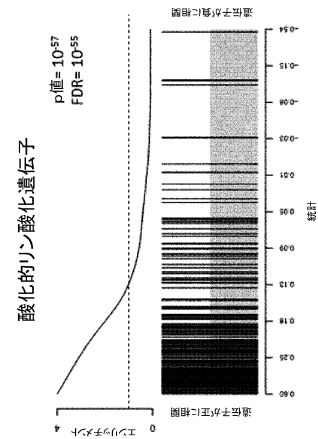
40

50

【図 5 B】

FIGURE 5B

血清トリゴネリンと筋肉遺伝子発現との
相関

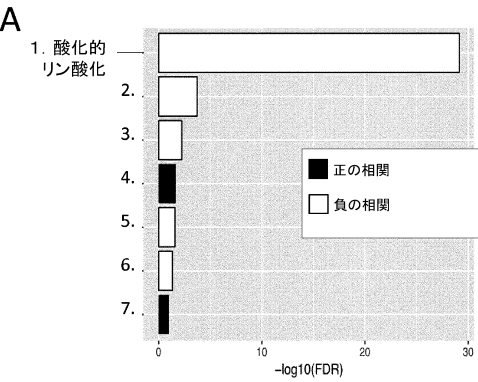


B

【図 6 A】

FIGURE 6A

血清アントラニル酸と筋肉の
遺伝子発現との相関



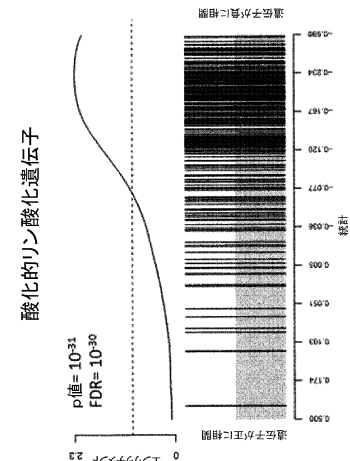
10

20

【図 6 B】

FIGURE 6B

血清アントラニル酸と筋肉の
遺伝子発現との相関

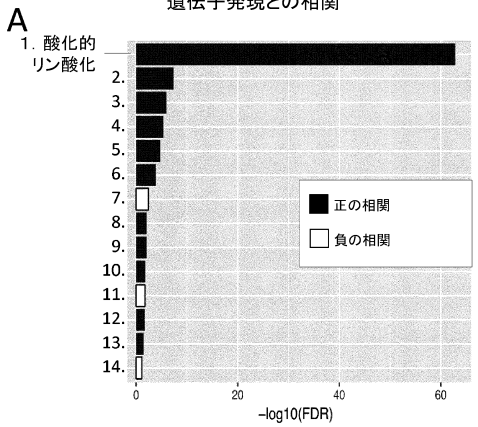


B

【図 7 A】

FIGURE 7A

血清トリゴネリン／アントラニル酸比と筋肉の
遺伝子発現との相関



30

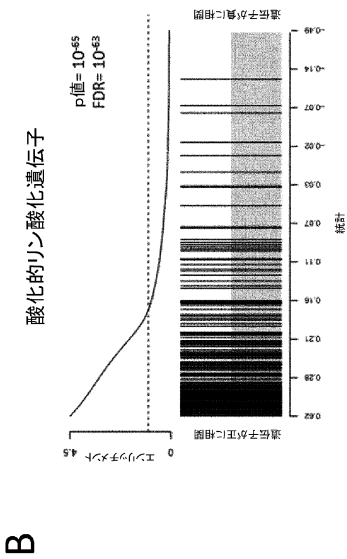
40

50

【図 7 B】

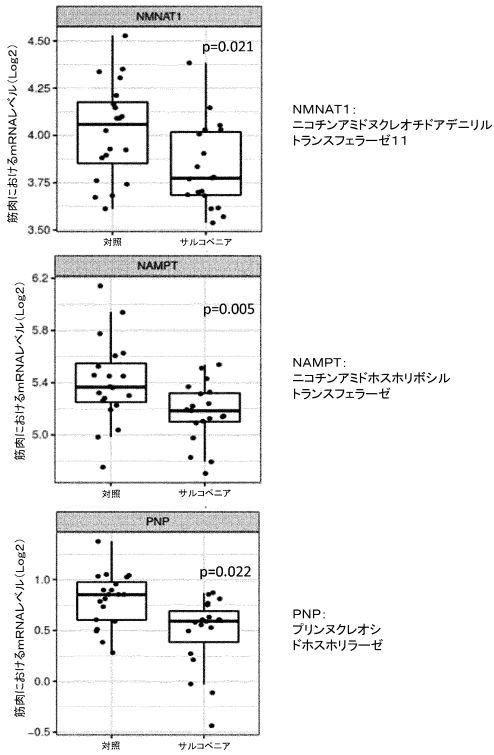
FIGURE 7B

血清トリゴネリン／アントラニル酸比と筋肉遺伝子発現との相関



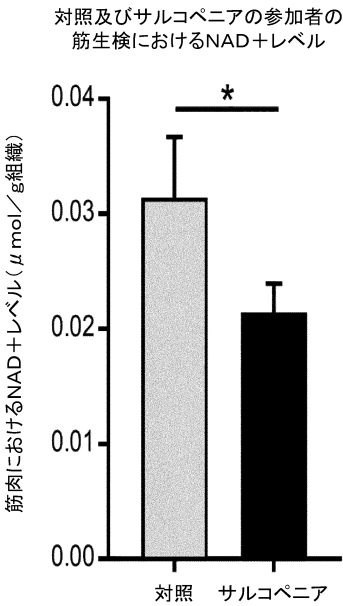
【図 8】

サルコペニア及び対照間での筋肉におけるNAD生成遺伝子の発現の変化



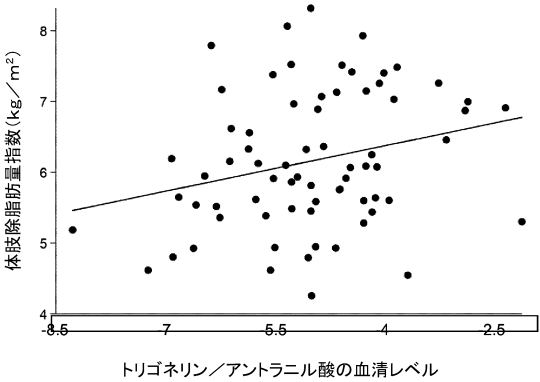
【図 9】

FIGURE 9



【図 10】

FIGURE 10



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 2 3 L 33/10 (2016.01)
G 0 1 N 33/68 (2006.01)

F I

A 2 3 L 33/10
G 0 1 N 33/68

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

シンガポール国, 1 3 8 6 3 2 シンガポール, フージョノポリス ウェイ 1, コネクシス ノース
タワー # 2 0 - 1 0

(74)代理人 100107456

弁理士 池田 成人

(74)代理人 100162352

弁理士 酒巻 順一郎

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(72)発明者 ファイギ, ジェローム

スイス, 1 0 2 3 クリシエ, ルー デ アルプ 2 1

(72)発明者 ゴドフリー, キース マルコム

イギリス, アッシュハースト ハンプシャー エスオー 4 0 7 エーピー, ウッドランズ ロード
1 4 8

(72)発明者 カルナーニ, ニールジャー

シンガポール, シンガポール 1 1 7 6 0 9, メディカル ドライブ 3 0, ブレナー センター
フォー モレキュラー メディシン

(72)発明者 ミリアヴァッカ, エウジェニア

スイス, 1 0 0 6 ローザンヌ, アヴェニュー デ アルプ 3 8

審査官 北条 弥作子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 7 / 1 0 8 4 1 9 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 5 2 4 1 3 (WO, A 1)

特表 2 0 1 0 - 5 2 6 9 9 4 (JP, A)

米国特許出願公開第 2 0 1 6 / 0 1 0 9 4 6 0 (US, A 1)

Shinya Watanabe, Serum C1q as a novel biomarker of sarcopenia in older adults, The FAS
EB Journal, 2014年12月, 29(3), pp. 1003-1010, DOI:10.1096/fj.14-262154

Yeong-Hau H Lien, Looking for Sarcopenia Biomarkers, Am J Med., 2017年05月, 130(
5), pp. 502-503, doi: 10.1016/j.amjmed.2017.01.018

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)