

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7244184号
(P7244184)

(45)発行日 令和5年3月22日(2023.3.22)

(24)登録日 令和5年3月13日(2023.3.13)

| | | |
|--------------------------|---------|---------|
| (51)国際特許分類 | F I | |
| A 6 1 K 31/198(2006.01) | A 6 1 K | 31/198 |
| A 6 1 K 31/194(2006.01) | A 6 1 K | 31/194 |
| A 6 1 K 31/405(2006.01) | A 6 1 K | 31/405 |
| A 6 1 K 31/4172(2006.01) | A 6 1 K | 31/4172 |
| A 6 1 P 3/04(2006.01) | A 6 1 P | 3/04 |

請求項の数 14 (全21頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|--|
| (21)出願番号 | 特願2019-566744(P2019-566744) | (73)特許権者 | 518061270 プロフェッショナル ダイエテティクス インターナショナル エス・アール・エル |
| (86)(22)出願日 | 平成30年7月20日(2018.7.20) | | イタリア国、(エムアイ)ミラノ アイ - 2 0 1 2 9 1 / エー、ヴィア シロ メノッティ |
| (65)公表番号 | 特表2020-528402(P2020-528402 A) | (74)代理人 | 110000877 弁理士法人 R Y U K A 国際特許事務所 |
| (43)公表日 | 令和2年9月24日(2020.9.24) | (72)発明者 | ジョルジェッティ、パオロ ルカ マリア イタリア国、(エムアイ)ミラノ アイ - 2 0 1 2 9 1 / エー、ヴィア シロ メノッティ プロフェッショナル ダイエ テティクス インターナショナル エス・ アール・エル・内 |
| (86)国際出願番号 | PCT/IB2018/055428 | | 最終頁に続く |
| (87)国際公開番号 | WO2019/021137 | | |
| (87)国際公開日 | 平成31年1月31日(2019.1.31) | | |
| 審査請求日 | 令和3年5月17日(2021.5.17) | | |
| (31)優先権主張番号 | 102017000087376 | | |
| (32)優先日 | 平成29年7月28日(2017.7.28) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | イタリア(IT) | | |

(54)【発明の名称】 ミトコンドリア機能障害関連疾患の治療に使用するための、アミノ酸を備える組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肥満の治療および/または予防に使用するための組成物であって、前記組成物は、活性剤を備え、前記活性剤は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、およびリジンのアミノ酸と、クエン酸、コハク酸、およびリンゴ酸とを含み、クエン酸：リンゴ酸：コハク酸の重量比が、10：1：1～2：1.5：1.5である、組成物。

【請求項 2】

クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の合計(「A」とする)と、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸にリジンおよびトレオニンを加えた合計(「B」とする)との重量比(A/B)が、0.05～0.3、好ましくは0.1～0.25である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総量(「C」とする)と、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸の総量(「D」とする)との重量比(C/D)が、0.1～0.4、好ましくは0.15～0.35である、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

クエン酸(「E」とする)と、リンゴ酸およびコハク酸の合計(「F」とする)との重量比(E/F)が、1.0～4.0、好ましくは1.5～2.5である、請求項1から3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

クエン酸：リンゴ酸：コハク酸の重量比が、7：1：1～1.5：1：1、好ましくは5：1：1～3：1：1である、請求項1から4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項6】

前記活性剤が、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、チロシン、システインからなる群から選択される少なくとも1のアミノ酸をさらに有する、請求項1から5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項7】

前記活性剤が、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システインおよび任意にチロシンをさらに有する、請求項6に記載の組成物。

【請求項8】

クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総モル量（「G」とする）と、メチオニン、フェニルアラニン、ヒスチジンおよびトリプトファンの総モル量（「H」とする）との比（ G/H ）が、1.35より高い、請求項6または7に記載の組成物。

【請求項9】

クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の3つの酸の総モル量（「I」とする）と、リジンおよびトレオニンの総モル量（「J」とする）との比（ I/J ）が、0.1～0.7、好ましくは0.15～0.55である、請求項1から8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項10】

クエン酸の重量またはモル量が、リンゴ酸およびコハク酸の総重量またはモル量より多い、請求項1から9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項11】

ロイシン（「K」とする）とクエン酸（「L」とする）との重量比（ K/L ）が、5～1、好ましくは2.50～3.50である、請求項1から10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

前記活性剤がアルギニンを含まない、請求項1から11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項13】

前記組成物が、1種以上のビタミン類をさらに備え、前記ビタミン類は、好ましくはビタミンB群から選択され、より好ましくはビタミンB1および/またはビタミンB6を備える、請求項1から12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項14】

請求項1から13のいずれか一項に記載の組成物を調製する方法であって、前記組成物は、各成分をメッシュでふるい分けし、混合することによって調整される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本明細書は、一般に、アミノ酸を備える組成物に関する。より具体的には、本明細書は、医薬品で使用するための、特にミトコンドリア機能障害に関連する疾患の治療に使用するための、アミノ酸を備える組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ミトコンドリアは、細胞性オルガネラであり、その主な機能は、酸化的リン酸化、すなわち、グルコースまたは脂肪酸の代謝に由来するエネルギーがアデノシン三リン酸（ATP）に変換されるプロセスである。次いで、ATPを使用して、エネルギーを必要とするさまざまな生合成反応および他の代謝活動が促進される。

【0003】

ミトコンドリア機能障害は、あらゆる組織に影響を及ぼす可能性があり、種々の組織が関与している程度に応じて、結果的に多種多様な症状を伴う。

【0004】

10

20

30

40

50

ミトコンドリア機能障害から生じる疾患には、例えば、ミトコンドリア膜電位の機能不全に起因したミトコンドリアの膨潤、活性酸素種（ROS）またはフリーラジカルの作用などによる酸化ストレスに起因した機能障害、遺伝子変異に起因した機能障害およびエネルギー産生のための酸化的リン酸化メカニズムの機能的欠陥に起因した疾患が含まれる。
【0005】

ミトコンドリアは加齢とともに劣化し、呼吸活動を保てなくなり、それらのDNA（mtDNA）に損傷を蓄積し、過剰量の活性酸素種（ROS）を産生する。

【0006】

最近のエビデンスは、アルツハイマー病、パーキンソン病およびハンチントン病などの主要な神経変性疾患ならびに慢性閉塞性肺疾患（COPD）に加えて、加齢に伴う代謝および心血管系疾患（アテローム性動脈硬化症）をはじめとするいくつかの疾患におけるミトコンドリア機能障害の関与を示す。

10

【0007】

ミトコンドリア機能障害は、肥満ならびに2型糖尿病、高血圧、脂質異常症、心不全、腎疾患および骨粗鬆症をはじめとする関連疾患にも見られる。

【0008】

注目すべきことに、骨格筋量および骨格強度の不随意の喪失に起因した高齢者の機能低下と自立喪失ならびにいわゆる虚弱症候群の主要な特徴の最も重要な原因の1つとして定義されるサルコペニアは、ミトコンドリア量およびミトコンドリア機能の減少に起因している。例えば悪液質をはじめとするほかの筋肉消耗疾患および筋肉消耗障害が知られている。悪液質または消耗症候群は、体重の意図しない減少、筋萎縮、疲労および脱力感として定義される。悪液質は、癌、エイズ、セリアック病、COPD、多発性硬化症、関節リウマチ、うっ血性心不全、結核および神経性無食欲症の人に見られる。この状態を予防および/または治療するための薬物または栄養素は発見されていない。

20

【0009】

したがって、世界的な肥満の流行および人口の高齢化を考えると、次の未来に最も多い患者は、サルコペニアの肥満高齢対象者である。

【0010】

肥満ならびにインスリン抵抗性および2型糖尿病などの関連疾患は、今日では、14億人を超える過体重の成人を伴う大きな健康問題である（World Health Organization. Obesity and overweight. WHO Media Centre）。その中で、約5億人が肥満であり、5歳未満の4,000万人の子供が、現在、過体重または肥満に分類されている（World Health Organization. Obesity and overweight. WHO Media Centre）。

30

【0011】

代謝の観点から、肥満が起こるのは、エネルギー摂取量がミトコンドリア機能の低下の結果としてエネルギー消費量（EE）を超えたときである；それゆえ、エネルギー摂取量を減らすことを目的とした食事介入のほかに、別のアプローチは、例えば運動によってエネルギー消費量を増加させることである。しかしながら、これは単純な作業ではなく、特に、肥満関連筋肉機能障害をしばしば示す肥満者に当てはまる（Wells et al., 2008）。

40

【0012】

それゆえ、減量を達成し、この疾患の社会的および医学的影響を減らすことを目的とした新しい治療アプローチの必要性が高まっている。

【発明の概要】

【0013】

本明細書は、ミトコンドリア機能の増加に、ひいては肥満および関連障害の治療において特に効果的な新しいアミノ酸ベースの組成物を提供することを目的とする。

【0014】

50

本明細書によれば、上記の目的は、本開示の不可欠な部分を形成するものとして理解される特許請求の範囲において具体的に想起される主題のおかげで達成される。

【0015】

本明細書の一実施形態は、対象におけるミトコンドリア生合成を促進し、ミトコンドリア機能を改善するための組成物を提供し、この組成物は、活性剤を備え、上記活性剤は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンのアミノ酸と、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸とを含む。

【0016】

1つ以上の実施形態では、組成物の活性剤は、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システインおよびチロシンからなる群から選択される1種以上のアミノ酸をさらに含む。

10

【0017】

1つ以上の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、医薬品で使用され得る。

【0018】

好ましい実施形態では、組成物は、ミトコンドリア機能障害関連疾患の治療および/または予防に使用されてもよく、上記疾患は肥満である。

【図面の簡単な説明】

【0019】

これから、添付の図面を参照しながら、例示のみを目的として本発明を説明する。

【0020】

【図1】異なるアミノ酸ベースの組成物で48時間(48時間、2日間)処理したHL-1心筋細胞内で定量PCRにより分析したミトコンドリアDNA(mtDNA)の含有量を示す。定量PCRは3回実行し、GAPDHのゲノムDNAコーディングに対して正規化する(n=3、平均±SEM)。未処理の細胞(CT)の値は1.0(*p<0.05 vs. 未処理の細胞、p<0.05 vs. BCAAemおよびB2)とみなす。

20

【0021】

【図2】アミノ酸ベースの組成物で24時間(1日間)処理したHL-1心筋細胞内で定量PCRにより分析したミトコンドリア生合成マーカー(Tfam、PGC-1、Cyt c)のmRNAレベルを示す。定量PCRは3回実行し、GAPDHのゲノムDNAコーディングに対して正規化する(n=3、平均±SEM)。p<0.05 vs. 未処理の細胞、1.0で表される。p<0.05 vs. BCAAem。

30

【0022】

【図3】アミノ酸ベースの組成物で48時間(2日間)処理したHL-1心筋細胞内で定量PCRにより分析したミトコンドリア生合成マーカー(Tfam、PGC-1、Cyt c)のmRNAレベルを示す。定量PCRは3回実行し、GAPDHに対して正規化する(n=3、平均±SEM)。p<0.05 vs. 未処理の細胞、1.0で表される。p<0.05 vs. BCAAem。

【0023】

【図4】分岐鎖アミノ酸(BCAA)の異化を調節するタンパク質であるクルップル様因子15(KFL15)およびミトコンドリアマトリックス標的タンパク質ホスファターゼ2Cファミリーメンバー(PP2CM)のmRNAレベルを示す。PP2CMおよびKFL15は、アミノ酸ベースの組成物で24時間(1日間)または48時間(2日間)処理したHL-1心筋細胞内で定量PCRにより分析した。定量PCRは3回実行し、GAPDHに対して正規化する(n=3、平均±SEM)。*p<0.05 vs. 未処理の細胞、1.0で表される。p<0.05 vs. BCAAemおよびB2。

40

【0024】

【図5】酸素消費速度(OCR)の評価を示す。アミノ酸ベースの組成物またはDETA-NOで48時間処理したHL-1心筋細胞の酸素消費量。***p<0.001 vs. 未処理の細胞；####p<0.001 vs. BCAAemおよびB2。

【0025】

50

【図6】48時間(2日間)処理後の不死化褐色脂肪細胞(Seale et al., 2007)でのUCP1発現を示す。CT:未処理のコントロール細胞。未処理の細胞(CT)の値は1.0とみなす。*有意 vs. CT。#有意 vs. BCAAem; RT-PCRは3回実行し、GAPDHに対して正規化する(n=3、平均値±SEM)。

【0026】

【図7】48時間(2日間)処理後の不死化褐色脂肪細胞でのPGC-1発現を示す。CT:未処理のコントロール細胞。未処理の細胞(CT)の値は1.0とみなす。*有意 vs. CT。#有意 vs. BCAAem; RT-PCRは3回実行し、GAPDHに対して正規化する(n=3、平均値±SEM)。

【発明を実施するための形態】

【0027】

以下の説明では、実施形態の完全な理解を提供するために、多数の具体的な詳細が示される。実施形態は、1つ以上の具体的な詳細なしに、または他の方法、成分、材料などとともに実施することができる。他の例では、実施形態の態様を不明瞭にすることを避けるために、周知の構造、材料または動作は詳細に示されないか、または説明されない。

【0028】

本明細書を通して「一実施形態」または「実施形態」という言及は、実施形態に関連して説明される特定の特徵、構造または特性が少なくとも1つの実施形態に含まれることを意味する。したがって、本明細書を通してさまざまな箇所における「一実施形態では」または「実施形態では」という語句の出現は、必ずしもすべてが同じ実施形態を指しているわけではない。さらに、特定の特徵、構造または特性は、1つ以上の実施形態において任意の適切な方法で組み合わせることができる。本明細書に提供される見出しは、便宜上のものにすぎず、実施形態の範囲または意味を解釈するものではない。

【0029】

1つ以上の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、活性剤を備え、この活性剤は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンのアミノ酸と、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の酸とを含む。

【0030】

欧州登録特許第2196203号明細書に開示されているアミノ酸を備える組成物が、カロリー制限(CR)の利点を提供する代替的な解決策として哺乳類に投与された。そのようなベースのアミノ酸組成物(本開示では「BCAAem」と呼ばれる)は、心筋と骨格筋の両方でミトコンドリア生合成の増加を導くことが示されている(D'Antoniet al., 2010)。これらの効果は、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)の発現と、それに伴う一酸化窒素(NO)の産生とにより媒介されていた(D'Antoniet al., 2010)。

【0031】

驚くべきことに、本出願の発明者は、特定の酸を、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニンおよびリシンの類似の組合せを備える組成物に加えることにより、細胞ミトコンドリア機能ひいては、エネルギー消費量(EE)の有意な増加を達成できることを見出した。

【0032】

本出願の発明者は、中に含まれる酸に関して異なる多くの組成物を試験し、活性剤として、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸と、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニンおよびリシンの組合せを備える組成物が上掲の目的のために非常に効果的であることを見出した。実際、上述の活性剤を備える組成物および更なる特定のアミノ酸を含む上述の活性剤を備える組成物(以下の表1にリストされている)は、ミトコンドリア生合成およびミトコンドリア機能を促進する点で、以前に試験されたアミノ酸ベースの組成物(BCAAem)よりも有意に効果的である。

【0033】

組成物は、心筋細胞株(HL-1)、すなわち、心機能の生体外モデル(in vit

10

20

30

40

50

r o m o d e l) を表す細胞で試験した。これらの心筋細胞の分析から得られた結果を使用して、心不全の予防における新しい組成物の効力を検証することができる。

【 0 0 3 4 】

さらに、本明細書に開示される組成物は、褐色脂肪の生体外モデル (i n v i t r o m o d e l) である不死化褐色脂肪細胞で試験した。最近の発見では、ヒトにおける褐色脂肪細胞組織 (B A T) の発生が明らかにされている (T r a y h u r n , 2 0 1 6) 。

【 0 0 3 5 】

主に脂肪 (トリグリセリド) の形態でエネルギーを貯蔵する器官である白色脂肪組織 (W A T) とは異なり、褐色脂肪細胞組織 (B A T) は、食物からのエネルギーを利用して熱を生成 (熱発生) することから、エネルギー消費量 (E E) を高める。

10

【 0 0 3 6 】

このプロセスは、脱共役タンパク質 1 (U C P 1 ; C a n n o n a n d N e d e r g a a r d , 2 0 0 4) の発現および活性の増加によって、環境 (すなわち、低温暴露) と栄養 (食事) の両方の手がかりに反応して活性化される。

【 0 0 3 7 】

本出願で提供されるデータは、本明細書に開示される組成物の U C P 1 発現の増加における有効性を示し、したがって、この組成物の医薬品における有用性、特に、例えばインスリン抵抗性および 2 型糖尿病などの肥満および関連障害の治療における有用性が確認される。

【 0 0 3 8 】

20

1 つ以上の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、活性剤を備え、上記活性剤は、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸を、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンと組み合わせて含み、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸の総量と、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンのアミノ酸の総量との重量比は、 0 . 0 5 ~ 0 . 3 、好ましくは 0 . 1 ~ 0 . 2 5 である。

【 0 0 3 9 】

1 つ以上の実施形態では、活性剤は、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システイン、チロシンからなる群から選択される 1 種以上のアミノ酸をさらに備え得る。

【 0 0 4 0 】

30

更なる実施形態では、本明細書に開示される組成物の活性剤は、アスパラギン酸および / またはオルニチン L - アルファケトグルタル酸 (O K G) も含み得る。

【 0 0 4 1 】

一実施形態によれば、組成物は、活性剤を備え、この活性剤は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン、システインおよび任意にチロシン、ならびにクエン酸、コハク酸およびリンゴ酸からなる活性剤を含み、上記アミノ酸は、組成物に含まれる唯一のアミノ酸類である。

【 0 0 4 2 】

更なる実施形態では、組成物は、活性剤の重量に対して 3 5 重量 % ~ 6 5 重量 % 、好ましくは 4 2 重量 % ~ 5 6 重量 % の量のイソロイシン、ロイシンおよびバリンのアミノ酸を含み得る。

40

【 0 0 4 3 】

1 つ以上の実施形態では、ロイシンとクエン酸との重量比は、 5 ~ 1 、好ましくは 2 . 5 ~ 3 . 5 である。

【 0 0 4 4 】

更なる実施形態では、クエン酸の重量またはモル量は、リンゴ酸およびコハク酸のそれぞれの重量またはモル量よりも多い。好ましくは、クエン酸の重量またはモル量は、リンゴ酸にコハク酸を加えた総重量または総モル量よりも多い。更なる実施形態では、クエン酸と、リンゴ酸およびコハク酸の合計との重量比は、 1 . 0 ~ 4 . 0 、好ましくは 1 . 5 ~ 2 . 5 である。好ましい実施形態では、クエン酸 : リンゴ酸 : コハク酸の重量比は、 1

50

0 : 1 : 1 ~ 2 : 1 . 5 : 1 . 5、好ましくは7 : 1 : 1 ~ 1 . 5 : 1 : 1、より好ましくは5 : 1 : 1 ~ 3 : 1 : 1である。

【0045】

本開示のいくつかの実施形態によれば、好ましいイソロイシン：ロイシンのモル比は、0 . 2 ~ 0 . 7の範囲、好ましくは0 . 30 ~ 0 . 60の範囲であり、かつ/またはバリン：ロイシンの好ましい重量比は、0 . 2 ~ 0 . 70の範囲、好ましくは0 . 30 ~ 0 . 65の範囲である。

【0046】

更なる実施形態では、トレオニン：ロイシンのモル比は、0 . 10 ~ 0 . 90の範囲、好ましくは0 . 20 ~ 0 . 70の範囲であり、かつ/またはリシン：ロイシンの重量比は、0 . 20 ~ 1 . 00の範囲、好ましくは0 . 40 ~ 0 . 90の範囲にある。

10

【0047】

好ましい実施形態では、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の総モル量と、メチオニン、フェニルアラニン、ヒスチジンおよびトリプトファンの総モル量との比は、1 . 35よりも高い。

【0048】

1つ以上の実施形態では、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の合計と、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸の合計との重量比は、0 . 1 ~ 0 . 4、好ましくは0 . 15 ~ 0 . 35である。

【0049】

更なる実施形態では、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸にトレオニンおよびリシンを加えた総重量は、3つの酸（クエン酸、リンゴ酸、コハク酸）の総重量よりも多い。好ましくは、単一の酸（クエン酸、コハク酸またはリンゴ酸）の重量は、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニンおよびリシンの単一アミノ酸のそれぞれの重量よりも少ない。

20

【0050】

好ましい実施形態では、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸の合計と、ロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸にリシンおよびトレオニンを加えた合計との重量比は、0 . 05 ~ 0 . 30、好ましくは0 . 10 ~ 0 . 25である。

【0051】

更なる実施形態では、リシンおよびトレオニンの総モル量は、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の3つの酸の総モル量よりも多い。好ましくは、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸の3つの酸の総モル量と、リシンおよびトレオニンの総モル量との比は、0 . 10 ~ 0 . 70、好ましくは0 . 15 ~ 0 . 55である。

30

【0052】

1つ以上の実施形態では、本明細書に開示される組成物は、ビタミン類をさらに備え、このビタミン類は、好ましくは、ビタミンB₁および/またはビタミンB₆などのビタミンB群から選択される。

【0053】

本開示の更なる実施形態では、組成物は、炭水化物、添加剤および/または香味物質を含み得る。

40

【0054】

さらに、特に本開示による組成物、具体的には活性剤を調製する場合、アミノ酸であるアルギニンは、好ましくは回避される。

【0055】

加えて、本明細書に開示される組成物により好ましくは除外される更なるアミノ酸は、セリン、プロリン、アラニンである。

【0056】

そのようなアミノ酸は、組成物内のある濃度または化学量論比では、逆効果または有害でさえあり得る。

50

【 0 0 5 7 】

本明細書に開示されるアミノ酸は、それぞれの薬学的に許容される誘導体、すなわち塩で置き換えられ得る。

【 0 0 5 8 】

以下で明らかになるように、本開示による組成物の投与は、ミトコンドリア生合成およびミトコンドリア機能の促進に特に有効である。

【 0 0 5 9 】

好ましい実施形態では、開示される組成物は、ミトコンドリア機能障害関連疾患の治療および/または予防において使用され得、上記疾患は肥満である。

【 0 0 6 0 】

更なる実施形態では、開示される組成物は、ミトコンドリア機能障害関連疾患の治療および/または予防に使用され得、上記疾患は、好ましくはインスリン抵抗性と2型糖尿病とから選択される肥満関連疾患である。

【 0 0 6 1 】

更なる実施形態によれば、アミノ酸組成物は、例えばタンパク質、ビタミン類、炭水化物、天然および人工の甘味料ならびに/または香味物質のような薬学的に許容される賦形剤を備え得る。好ましい実施形態では、薬学的に許容される賦形剤は、ホエータンパク質、マルトデキストリン、フルクトース、カゼイン酸カルシウム、魚油、クエン酸またはその塩、スクラロース、スクロースエステル、ビタミンD3、ビタミンB群から選択され得る。

【 0 0 6 2 】

経口使用の場合、本明細書に記載の組成物は、錠剤、カプセル、顆粒、ゲル、ゲル化可能な粉末、粉末の形態をとり得る。

【 0 0 6 3 】

組成物により提供されるさまざまなアミノ酸の量および比に関する更なる仕様は、添付の特許請求の範囲に含まれ、本発明に関して本明細書に提供される技術的教示の不可欠な部分を形成する。

【 0 0 6 4 】

[実施例]

表1は、HL-1細胞および以下に開示される不死化褐色脂肪細胞で試験した異なるアミノ酸ベースの組成物を示す。

【 0 0 6 5 】

具体的には、BCAAem組成物は、欧州登録特許第2196203号明細書に開示されている組成物である。

【 0 0 6 6 】

「B2」と呼ばれる組成物は、活性剤として、BCAAem組成物のアミノ酸と同様のアミノ酸の組合せを有するが、さらにクエン酸を含む。そのような組成物は、ビタミンB1およびB6も含む。

【 0 0 6 7 】

アルファ5 (5)、アルファ6 (6)、アルファ7 (7) と呼ばれる組成物は、アミノ酸およびクエン酸、コハク酸およびリンゴ酸を含む活性剤を備える。さらに、アルファ7組成物の活性剤は、OKG (オルニチンL- ケトグルタル酸) およびアミノ酸のアスパラギン酸 (L - アスパラギン酸) も備える。

表 1

10

20

30

40

50

【表 1】

| 組成(%) | BCAAem | B2 | α5 | α6 | α7 |
|--------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|
| L-ロイシン | 30,01 | 25,9555 | 31,0885 | 22,4500 | 21,7188 |
| L-リシン塩酸塩 | 19,58 | 16,9346 | 16,903 | 21,1300 | 20,4380 |
| L-イソロイシン | 15 | 12,9778 | 10,3628 | 11,2300 | 10,8594 |
| L-バリン | 15 | 12,9778 | 10,3628 | 11,2300 | 10,8594 |
| L-トレオニン | 8,4 | 7,2675 | 7,254 | 13,1000 | 12,6693 |
| L-システイン | 3,6 | 3,1147 | 3,1089 | 2,8100 | 2,7149 |
| L-ヒスチジン | 3,6 | 3,1147 | 3,1089 | 2,8100 | 2,7149 |
| L-フェニルアラニン | 2,4 | 2,0764 | 2,0726 | 1,8700 | 1,8099 |
| L-メチオニン | 1,2 | 1,0382 | 1,0363 | 0,9400 | 0,9050 |
| L-チロシン | 0,72 | 0,6229 | 0,6218 | - | - |
| L-トリプトファン | 0,48 | 0,4153 | 2,0726 | 0,9400 | 0,9050 |
| OKG (オルニチンL-αケトグルタル酸) | - | - | - | - | 0,9050 |
| ビタミンB1(チアミン塩酸塩) | - | 0,004 | 0,004 | 0,0200 | 0,0163 |
| ビタミンB6(ピリドキシン塩酸塩) | - | 0,0038 | 0,0038 | 0,0200 | 0,0186 |
| 無水クエン酸 | - | 13,4969 | 8,0001 | 7,6500 | 7,4025 |
| リンゴ酸 | - | - | 2,0000 | 1,9200 | 1,8551 |
| L-アスパラギン酸 | - | - | - | - | 2,3529 |
| コハク酸 | - | - | 2,0000 | 1,9200 | 1,8551 |
| ロイシン:イソロイシン:バリンの比 | 2:1:1 | 2:1:1 | 3:1:1 | 2:1:1 | 2:1:1 |

【0068】

上記の表1の組成物は、0.8メッシュですべての成分を篩分けすることにより最初に調製することができる。予備混合物を得るために、各成分(総量の10重量%未満の量)をL-リシン塩酸塩の一部と一緒にポリエチレン袋にとり、組成物全体の重量の10%を得る。次いで、バッグを5分間手で振る。次いで、予備混合物を残りの成分と一緒にミキサー(Planetaria)に入れ、120rpmで15分間混合して均一な最終組成物を得る。

【0069】

表1にリストされる組成物をHL-1心筋細胞および不死化褐色脂肪細胞に投与し、ミトコンドリア機能を以下に開示するように評価した。

【0070】

[方法]

[細胞および処理]

[HL - 1 心筋細胞]

HL - 1 心筋細胞 (W . C . C l a y c o m b , N e w O r l e a n s , S c h o o l o f S c h o o l からの寄贈品) をフィブロネクチン / ゼラチンコーティングプラスチックに播種し、C l a y c o m b e t a l . , 1 9 9 8 に開示されているように、1 0 0 μ M のノルエピネフリン (3 0 m M の L - アスコルビン酸 [S i g m a - A l d r i c h] に溶解した 1 0 m M のノルエピネフリン [S i g m a - A l d r i c h] ストック溶液から)、2 m M の L - グルタミン、1 0 0 U / m l のペニシリン、1 0 0 μ g / m l のストレプトマイシンおよび 1 0 % F B S (J R H B i o s c i e n c e s) を添加した C l a y c o m b 培地 (J R H B i o s c i e n c e s) で 7 0 % ~ 8 0 % コンフルエントに増殖した。

10

【 0 0 7 1 】

細胞を、表 1 に示される 1 % (w / v) の組成物 (C l a y c o m b 培地に溶解) で 2 4 時間または 4 8 時間処理した。

【 0 0 7 2 】

これらの期間の終わりに、m R N A および D N A を細胞から抽出するか、または細胞を使用して酸素消費量を評価した。コントロール細胞は C l a y c o m b 培地のみで処理した。

【 0 0 7 3 】

[不死化褐色脂肪細胞]

不死化褐色脂肪細胞を、P a t r i c k S e a l e 教授 (ペンシルベニア大学、フィラデルフィア、米国) から購入した。

20

【 0 0 7 4 】

これらは S V 4 0 不死化 B A T 由来細胞株であり、適切な刺激プロトコルにより、成熟した褐色脂肪細胞に分化することができる。

【 0 0 7 5 】

細胞を、1 0 % F B S を含む F 1 2 / D M E M (L i f e T e c h n o l o g i e s 社による G i b c o) で分化のために定期的に維持し、コンフルエントな細胞を、1 0 % F B S + 0 . 5 m M のイソブチルメチルキサンチン、1 2 5 n M のインドメタシン、1 μ M のデキサメタゾン、2 0 n M のインスリン、1 n M の T 3 を含む培地で処理した。

30

【 0 0 7 6 】

4 8 時間後、細胞を、1 0 % F B S、2 0 n M のインスリンおよび 1 n M の T 3 を含む培地に切り替えた。

【 0 0 7 7 】

予備実験により、この培地との 6 ~ 7 日間のインキュベーションが U C P 1 および他の褐色脂肪細胞マーカーの発現を誘導するのに十分であることが確認された。特に、褐色脂肪細胞分化のマーカーである 1 4 0 k D a の P R (P R D 1 - B F 1 - R I Z 1 相同) ドメイン含有タンパク質である P R D M 1 6 の発現 (S e a l e e t a l . , 2 0 0 7) が、分化細胞で増加したため、6 日後、F 1 2 / D M E M に溶解した表 1 に示される 1 % (w / v) の異なる組成物 (B C A A e m、B 2、5) で細胞を処理した。コントロール細胞には培地のみを与えた。次いで、4 8 時間後、細胞を採取し、遺伝子発現解析のために R N A を抽出した。

40

【 0 0 7 8 】

[遺伝子発現およびミトコンドリア生合成法]

R N e a s y M i n i K i t (Q i a g e n) を使用して、HL - 1 心筋細胞および不死化褐色脂肪細胞から総 R N A を単離した ; D ' A n t o n a e t a l . (2 0 1 0) に記載されているように、i S c r i p t c D N A S y n t h e s i s K i t (B i o - R a d L a b o r a t o r i e s) を使用して、1 マイクログラムの総 R N A を c D N A に逆転写した。

50

【0079】

遺伝子相対レベルを 2^{-DDCT} として計算し、DDCTは、内部コントロールとして GAPDH を使用して、いずれかの処理の DCT と未治療群の DCT との差に対応していた。Delta-Delta-CT (DDCT) アルゴリズムは、定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) 実験で相対的な遺伝子発現を判定する近似法である (Livak and Schmittgen, 2001 を参照)。

【0080】

プライマー (以下の表 2 に報告されている配列) は、Beacon Designer 2.6 ソフトウェア (Premier Biosoft International) を使用して設計した。グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の発現に伴って値を正規化した。

表 2

【表 2】

| 遺伝子 | プライマー | 配列 | 配列番号 | T _a |
|---------------------------------|-------------|---------------------------|-------|----------------|
| GAPDH | センス5'-3' | AAC TTTGGCATTGTGGAAGG | No.1 | 60 |
| | アンチセンス5'-3' | ACACATTGGGGGTAGGAACA | No.2 | |
| Cyt c | センス5'-3' | ATAGGGGCATGTCACCTCAAAC | No.3 | 61 |
| | アンチセンス5'-3' | GTGGTTAGCCATGACCTGAAAG | No.4 | |
| PGC-1α | センス5'-3' | ACTATGAATCAAGCCACTACAGAC | No.5 | 61 |
| | アンチセンス5'-3' | TTCATCCCTCTTGAGCCTTTTCG | No.6 | |
| Tfam | センス5'-3' | AAGACCTCGTTCAGCATATAACATT | No.7 | 60 |
| | アンチセンス5'-3' | TTTTCCAAGCCTCATTTACAAGC | No.8 | |
| KFL15 | センス5'-3' | ACACCAAGAGCAGCCACCTCA | No.9 | 60 |
| | アンチセンス5'-3' | TGAGATCGCCGGTGCCTTGA | No.10 | |
| PP2CM | センス5'-3' | ACCACAGGCAGGCGACTC | No.11 | 60 |
| | アンチセンス5'-3' | TGGCTCATCAATGCGGTTATCC | No.12 | |
| mtDNA (12SrRNA) | センス5'-3' | ACATGCAAACCTCCATAGACCGG | No.13 | 63 |
| | アンチセンス5'-3' | TCACTGCTGAGTCCCGTGGG | No.14 | |
| gDNA (GAPDH) | センス5'-3' | GGTCGCGGTGTGGGCATTTG | No.15 | 60 |
| | アンチセンス5'-3' | CGTGATCGTAGCGTCTGGTT | No.16 | |

【0081】

アニーリングの T_a 温度 () ; アクセッション番号 GAPDH : NM_008084 . 3 ; アクセッション番号 Cyt c : NM_007808 ; アクセッション番号 PGC - 1 : AF049330 ; アクセッション番号 Tfam : NM_009360 . 4 ; アクセッション番号 KFL15 : NM_023184 . 4 ; アクセッション番号 PP2CM : NM_175523 . 4 ; Mus musculus ミトコンドリア、完全ゲノム : NC_005089 . 1 ; gDNA (GAPDH) : NC_000072 . 6 ; 12S ミトコンドリア rRNA のプライマーコード (NC_005098 . 1) 。 GAPDH を使用して、ミトコンドリア DNA を正規化した。

【0082】

ミトコンドリアDNA (mtDNA) 分析のために、QIAamp DNA抽出キット (QIAGEN) で総DNAを抽出した。

【0083】

ミトコンドリアDNA (mtDNA) 遺伝子に特異的なプライマーを使用してmtDNAを増幅し、GAPDH遺伝子DNAの増幅によりゲノムDNAに正規化した。Beacon Designer 2.6ソフトウェア (Premier Biosoft International、カリフォルニア州パロアルト) を使用して設計されたプライマーを、gDNAについて表2に示す。

【0084】

[統計分析]

すべての遺伝子発現データについて、両側のペアサンプルt検定 (two-sided paired-sample t test) を使用して、コントロール細胞と処理細胞の値を比較した。p値 < 0.05を統計的に有意であるとみなした。

【0085】

[酸素消費量]

表1に示される組成物で処理した1mlの量のHL-1心筋細胞を、ハンクス平衡塩溶液 (Sigma) に再懸濁し、遠沈してペレット細胞にした。多数のHL-1細胞にはまた、一酸化窒素 (NO) ドナー、特に、ポジティブコントロールとして、DETA-NO (Sigma-Aldrich、ミラノ、イタリア国) と呼ばれるジエチレントリアミン-NOを添加した。

【0086】

次いで、細胞を呼吸緩衝液 (0.3Mマンニトール、10mMのKCl、5mMのMgCl₂、10mMのK₂PO₄、pH7.4) に $3.0 \times 10^6 / \text{ml}$ の密度で再懸濁した。

【0087】

チャートレコーダーに接続されたクラーク型酸素電極 (Rank Brothers Ltd.) を備える気密容器内で、サンプルを37°Cで分析した。

【0088】

酸素電極は、培養培地中の酸素濃度を37°Cで $200 \mu\text{mol} / \text{l}$ と仮定して校正した。

【0089】

約10分間の連続混合で酸素消費量を評価した。次いで、トレースレコーダーの勾配を使用して酸素消費量を計算した。酸素含有量は、細胞の量に応じて異なり得る。したがって、細胞含有量と直接相関するタンパク質含有量は、細胞サンプルの酸素消費量を正規化するために使用した。タンパク質含有量は、ピシンコニン酸タンパク質 (BCA) アッセイを使用して決定した。

【0090】

[結果]

[HL-1心筋細胞ミトコンドリアDNA (mtDNA)]

ミトコンドリアDNA (mtDNA) は、ミトコンドリア質量への影響を検証するために、異なるアミノ酸組成物で処理した細胞内で最初に評価した。

【0091】

図1に示されるように、5組成物で処理したHL-1心筋細胞は、コントロール細胞 (CT)、B2処理細胞、および非常に興味深いことにBCAA組成物で処理した細胞内で評価したmtDNAに対してmtDNAの最も有意な増加を示した。

【0092】

[HL-1心筋細胞PGC-1、TfamおよびCyt c]

異なるアミノ酸組成物の効果は、ミトコンドリア生合成でも試験した。具体的には、以下のマーカーのHL-1心筋細胞による発現を評価した：

- ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1-アルファ (P

10

20

30

40

50

G C - 1)、ミトコンドリア生合成の主要制御因子、

- ミトコンドリアDNA転写因子A (T f a m)、m t D N A複製を調節するm t D N A転写因子、

- シトクロム複合体 (C y t c)、呼吸複合体タンパク質。

【 0 0 9 3 】

B C A A e m組成物、B 2組成物(すなわちB C A A e m組成物に類似するが、クエン酸も含む組成物)、5(すなわちアミノ酸以外の活性剤としてクエン酸、コハク酸、リンゴ酸の酸も備える組成物)の投与後に得られた結果の比較により、5組成物がH L - 1心筋細胞内で上記マーカーの発現を促進するのに最も効果的であることを示した。

【 0 0 9 4 】

さらに、経時変化効果が観察された: 3つのカルボン酸と一緒に表1にリストされるアミノ酸を備える5組成物を48時間添加した後、実際に、増加は基底値よりもさらに顕著であった。

【 0 0 9 5 】

この増加は、24時間処理と比較した場合のT f a mのB C A A e m組成物の値(図2)ならびに48時間処理後のP G C - 1およびC y t cの値(図3)に対しても統計的に有意であった。

【 0 0 9 6 】

[H L - 1心筋細胞K F L 1 5およびP P 2 C M]

クリュッペル様因子15 (K F L 1 5)およびミトコンドリアマトリックス標的タンパク質ホスファターゼ2 Cファミリーメンバー (P P 2 C M)は、分岐鎖アミノ酸 (B C A A)の異化を調節するタンパク質である。

【 0 0 9 7 】

B C A A異化の最初のステップは3つのB C A Aに共通しており、ミトコンドリア酵素B C A Aアミノトランスフェラーゼ (B C A T)および分岐鎖 - ケト酸デヒドロゲナーゼ複合体 (B C K D C)が必要である。

【 0 0 9 8 】

分解の最初で完全に可逆的なステップでは、ミトコンドリアB C A Tは、アミノ基をB C A Aから - ケトグルタル酸に転移させ、対応する分岐鎖 - ケト酸 (B C K A)およびグルタミン酸を形成する。

【 0 0 9 9 】

その後、B C K D Cは、B C K Aのカルボキシル基の脱炭酸を触媒し、対応する分岐鎖アシルC o Aエステルを形成する。

【 0 1 0 0 】

この反応は不可逆的であるため、B C A Aを劣化させる。

【 0 1 0 1 】

B C K D C活性は、N A D H、 - ケトイソカプロン酸および分岐鎖アシルC o Aエステルによる最終産物のアロステリック阻害により調節される。

【 0 1 0 2 】

B C K D C活性は、その調節サブユニットE 1 aのリン酸化状態により決定される。

【 0 1 0 3 】

B C A Aレベルが低い場合、E 1 aは、B C K Dキナーゼにより過剰リン酸化され、B C K D C活性の阻害と遊離B C A Aの保存につながる。

【 0 1 0 4 】

B C A Aレベルが高い場合、E 1 aは、ミトコンドリア内のP P 2 C (P P 2 C M)と呼ばれるミトコンドリア標的2 C型S e r / T h rタンパク質ホスファターゼまたはタンパク質ホスファターゼ、M g ²⁺ / M n ²⁺依存性1 K (P P M 1 K)により脱リン酸化され、B C K D Cの活性化および総B C A Aの減少につながる (B i f a r i a n d N i s o l i , 2 0 1 6)。

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

さらに、K L F 1 5 は、心臓内での B C A T、B C K D C および P P 2 C M 遺伝子発現を増加させることがわかった (S u n e t a l . , 2 0 1 6) 。

【 0 1 0 6 】

P P 2 C M および K F L 1 5 の m R N A レベルの評価により、 5 組成物が H L - 1 心筋細胞内の基底値を超えて P P 2 C M および K L F 1 5 の m R N A レベルを増加させることが示された。この増加は、B C A A e m 組成物に対してさえも有意であった (図 4) 。

【 0 1 0 7 】

これらの結果は、活性剤を備える組成物であって、この活性剤が、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシンと、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸とを含む組成物が、ミトコンドリア機能の促進に非常に効果的であり、代謝的に活性化細胞内の B C A A e m 組成物に対してさえも、ミトコンドリア生合成をより効率的に活性化することを示す。

10

【 0 1 0 8 】

[H L - 1 心筋細胞の酸素消費量 (O C R)]

異なる組成物を添加した H L - 1 細胞の酸素消費量を試験した。ポジティブコントロールとしてジエチレントリアミン - N O (D E T A - N O) を添加した細胞も試験した。細胞の酸素消費量の増加に及ぼす D E T A - N O の効果は明らかにされている (N i s o l i e t a l . , 2 0 0 3) 。 N O は、褐色脂肪細胞ならびに 3 T 3 - L 1、U 9 3 7 および H e L a 細胞などの多種多様な細胞でミトコンドリア生合成を引き起こすことがわかった。一酸化窒素のこの効果は、環状グアノシン 3', 5' - ーリン酸 (c G M P) に依存し、ミトコンドリア生合成の主要調節因子である P G C - 1 の誘導により媒介された (N i s o l i e t a l . , 2 0 0 3) 。

20

【 0 1 0 9 】

4 8 時間の D E T A - N O 処理の後、予期していたとおり、酸素消費量の増加が観察された。

【 0 1 1 0 】

最も注目すべきことに、H L - 1 細胞に 5 組成物を 4 8 時間添加した場合、酸素消費量の著しい増加量が観察され、したがって、ミトコンドリア活性の上昇が示されたことがわかる (図 5) 。

【 0 1 1 1 】

この増加は、B 2 および B C A A e m 組成物の投与後に観察される増加よりも有意に高い。

30

【 0 1 1 2 】

[不死化褐色脂肪細胞内での U C P 1 発現]

図 6 に示されるように、開示される組成物での 4 8 時間の処理は、程度は異なるものの、不死化褐色脂肪細胞内での U C P 1 発現を増加させた。

【 0 1 1 3 】

異なる混合物の中で、 5 が未処理の細胞に対して U C P 1 発現を誘導するのに最も効果的であった ($p = 0 . 0 4$ v s . C T) ; 5 はまた、B C A A e m 混合物と比較した場合、U C P 1 m R N A をより効率的に増加させた ($p = 0 . 0 5$) 。

40

【 0 1 1 4 】

[不死化褐色脂肪細胞内での P G C - 1 発現]

U C P 1 データによると、 5 混合物は、P G C - 1 の発現も有意に増加させ ($p = 0 . 0 1$)、したがって、ミトコンドリア生合成の活性化におけるこの組成物の能力が確認される (図 7) 。注目すべきことに、 5 はまた、P G C - 1 発現の増加の点で、B C A A e m 組成物よりも効果的であった。

【 0 1 1 5 】

まとめると、これらの結果は、活性剤を備える組成物であって、この活性剤が、ロイシン、イソロイシン、バリン、トレオニン、リシン、クエン酸、コハク酸およびリンゴ酸の組合せを含む組成物が、ミトコンドリア生合成、ミトコンドリア機能および B C A A 異化

50

の促進の点で有意により活性が高いことを示す。

【0116】

B C A A、トレオニンおよびリシン、ならびにクエン酸、コハク酸およびリンゴ酸を備える有効成分を提供する組成物のアルファ6 (6) およびアルファ7 (7) は、同様の利点を達成すると考えられる。

【0117】

注目すべきことに、アセチルC o Aに加えて、混合物に富むB C A Aの異化が、スクシニルC o Aを提供する。この後者は、スクシニル - C o Aシンターゼ反応を活性化し得、これによりまたコハク酸デヒドロゲナーゼの後続反応の基質としてコハク酸が産生する。

【0118】

それゆえ、コハク酸をB C A Aとともに混合物に提供すると、コハク酸デヒドロゲナーゼ反応も促進され、したがって、サイクルがさらに促進されることになる。注目すべきことに、コハク酸デヒドロゲナーゼは、F A D H ₂を直接提供することから、ミトコンドリアの電子伝達鎖(複合体I I)の一部でもある。それゆえ、コハク酸によるその刺激は、ミトコンドリアの酸化還元キャリアを直接活性化し、膜電位を増加させ、したがって、プロトン勾配、酸素消費およびA T P合成を高める。

【0119】

同時に、リンゴ酸サプリメントは、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ反応を活性化し、N A D Hレベルを増加させ得る；これはまた、コハク酸由来F A D H ₂と同じ方法で、複合体Iの基質を提供し、ひいてはA T Pレベルを増加させる。一方で、リンゴ酸は、リンゴ酸アスパラギン酸シャトルの活性を刺激し得る。これは、ミトコンドリア内への細胞質ゾルN A D Hの侵入も助長し(さもなければミトコンドリア膜を透過できない)、したがって、ミトコンドリアの酸化に利用できるようになる。これにより、ミトコンドリアの活性および酸素消費量がさらに増加する。

【0120】

さらに、炭水化物または脂肪の分解から得られるエネルギーは、ミトコンドリアの酸化的リン酸化のプロセスにより得られる。T C A (トリカルボン酸)サイクルによるグルコースおよび脂肪酸の異化は、N A D HおよびF A D H ₂分子を提供する。次いで、N A D HおよびF A D H ₂からの電子が、ミトコンドリア内膜のタンパク質複合体を介して酸素分子に移動し、このプロセスにより、ミトコンドリア膜を横切るプロトン勾配が生成される。プロトンは、A T Pシンターゼ複合体を介してミトコンドリア内に再進入し、A T Pシンターゼ複合体は、勾配からのエネルギーを使用してアデノシン三リン酸(A T P)を合成する。このようにして、電子輸送はA T P合成にカップリングされる。

【0121】

一方で、U C P 1は、低温栄養または過剰栄養後にB A T内で活性化されるミトコンドリア膜貫通タンパク質であり、ミトコンドリアの内膜を横切るプロトン勾配を消散させ、これにより酸化的リン酸化の脱共役が生じる。プロトン勾配に由来するエネルギーはA T P合成に利用できなくなり、U C P 1はA T Pを形成しないため、プロトン勾配からのエネルギーは熱として解放される。

【0122】

ミトコンドリアの生合成と数の増加は、上述の刺激にตอบสนองしてB A T内で発生する熱発生プログラムの基礎もなし、このプロセスで重要な役割を果たすのは、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター1 - アルファ(P G C - 1)、U C P 1とミトコンドリアの生合成に關与するほかの因子の両方の発現を調節することができる低温誘導性転写コアクチベーターである(S c a r p u l l a, 2011)。その結果、U C P 1活性の刺激およびB A T内での熱産生は、肥満を逆転させるための潜在的な治療アプローチとなり得、この組織の活性を刺激する薬剤および/または栄養戦略を調べることに大きな関心が存在する。

【0123】

また、今日では、W A TおよびB A Tのほかに、3番目のタイプの脂肪が一部のW A T

10

20

30

40

50

デポで認識され、「ベージュ」または「ブライト」脂肪として説明されていることも注目に値する。BAT内で熱発生を引き起こす同じ刺激に反応して、この組織は、UCP1などの熱産生タンパク質の発現を高め、典型的な褐色脂肪マーカーも誘導することにより「褐色化」のプロセスを経て、その結果、エネルギー消費量が高まることになる(EE, Song et al., 2017)。それゆえ、これらの発見は、代謝的に不活性な器官としてのWATの一般的な見解に挑戦し、より可塑性で「薬用の」標的組織の仮説を強化し、したがって、ブライト脂肪を抗肥満治療または栄養によるアプローチの別の潜在的な標的にする。

【0124】

全体として、これらの結果は、本明細書に開示される組成物が、ミトコンドリア生合成およびミトコンドリア機能、HL-1心筋細胞内でのBCAA異化作用を増加させ、褐色脂肪細胞マーカー発現を促進できることを示す。

10

【0125】

上記から、本開示による組成物が、ヒトおよび動物における不十分なミトコンドリア機能により区別される病的状態の治療にどのように有用であるかが明らかになる。

【0126】

[参考文献]

Bifari F, Nisoli E. Branched-chain amino acids differently modulate catabolic or anabolic states in mammals: a pharmacological point of view. *Br J Pharmacol*. 2016 Sep 17. doi:10.1111/bph.13624. [Epub ahead of print].

20

【0127】

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004 Jan; 84(1): 277-359. Review

【0128】

Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2979-2984, 1998.

30

【0129】

D'Antona G, Ragni M, Cardile A, Tedesco L, Dossena M, Bruttini F, Caliaro F, Corsetti G, Bottinelli R, Carruba MO, Valerio A, Nisoli E. Branched-chain amino acid supplementation promotes survival and supports cardiac and skeletal muscle mitochondrial biogenesis in middle-aged mice. *Cell Metab*. 12: 362-372, 2010.

40

【0130】

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.

【0131】

50

Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*: 299(5608): 896-9, 2003.

【0132】

Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310:314-317, 2005.

10

【0133】

Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, Tavernier G, Langin D, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6:38-54, 2007

【0134】

Song NJ et al. Induction of thermogenic adipocytes: molecular targets and thermogenic small molecules. *Exp Mol Med.* 2017 Jul 7; 49(7): e353. doi:10.1038/emm.2017.70. Review. PubMed PMID: 28684864.

20

【0135】

Sun H, Olson KC, Gao C, Prosdocimo DA, Zhou M, Wang Z, Jeyaraj D, Youn JY, Ren S, Liu Y, Rau CD, Shah S, Ilkayeva O, Gui WJ, William NS, Wynn RM, Newgard CB, Cai H, Xiao X, Chuang DT, Schulze PC, Lynch C, Jain MK, Wang Y. Catabolic Defect of Branched-Chain Amino Acids Promotes Heart Failure. *Circulation* 133:2038-2049, 2016.

30

【0136】

Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(7): 1269-78

【0137】

Trayhurn P. Recruiting Brown Adipose Tissue in Human Obesity. *Diabetes.* 2016; 65(5): 1158-60.

40

【0138】

Wells GD, Noseworthy MD, Hamilton J, Tarnopolski M, Tein I. Skeletal muscle metabolic dysfunction in obesity and metabolic syndrome. *Can J Neurol Sci.* 2008; 35(1): 31-40. Review

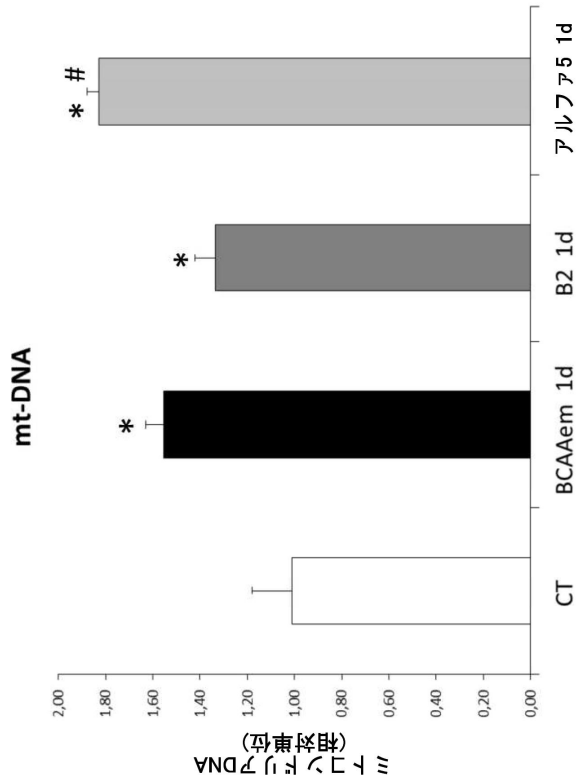
【0139】

50

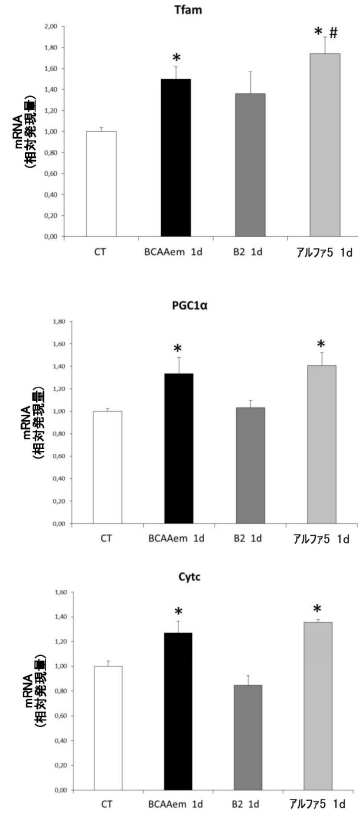
World Health Organization. Obesity and overweight. WHO Media Centre. Updated August 2014. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

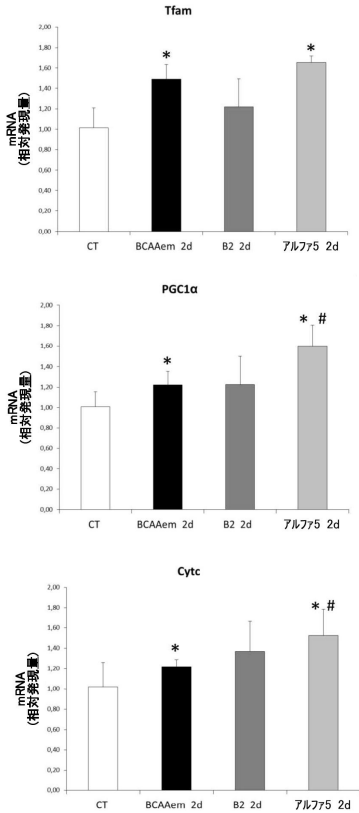
20

30

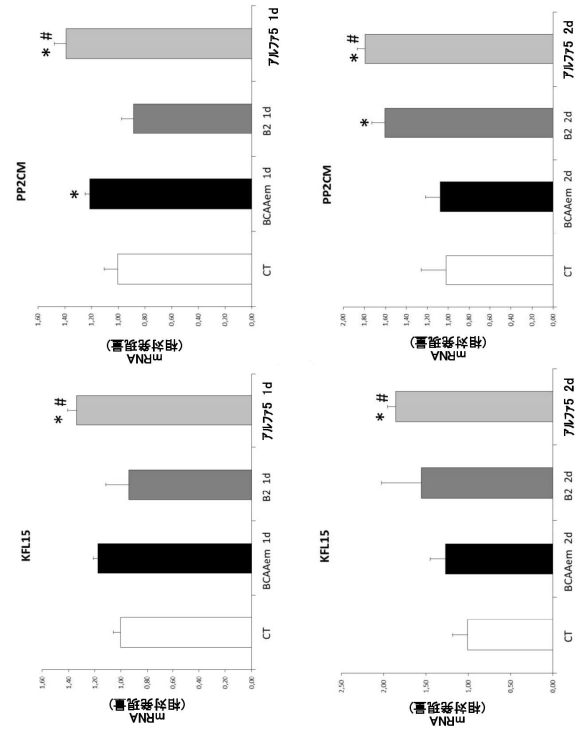
40

50

【 図 3 】



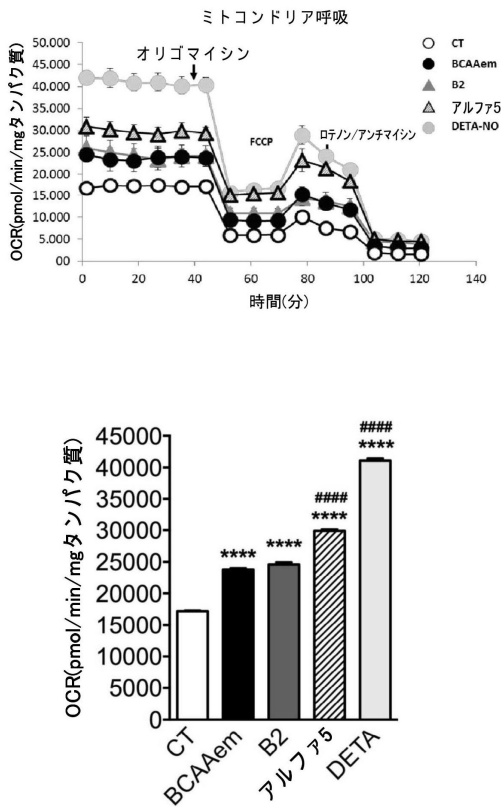
【 図 4 】



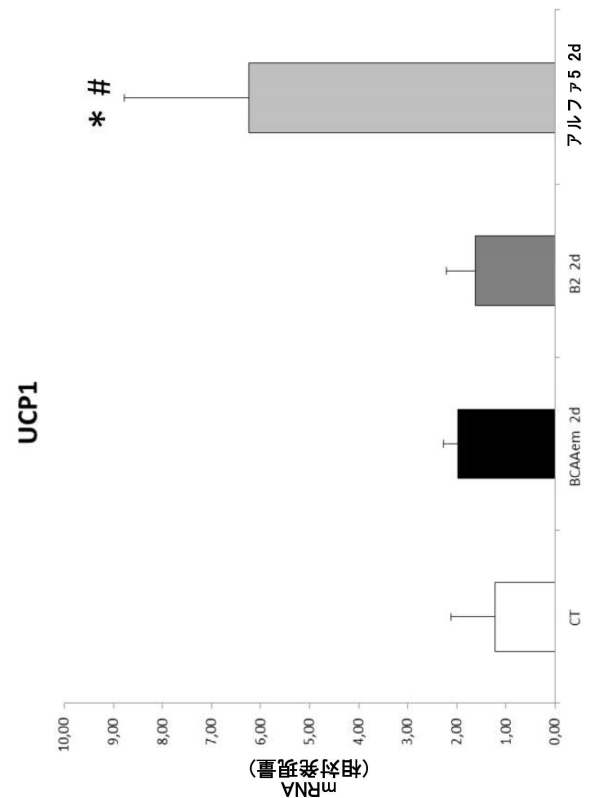
10

20

【 図 5 】



【 図 6 】

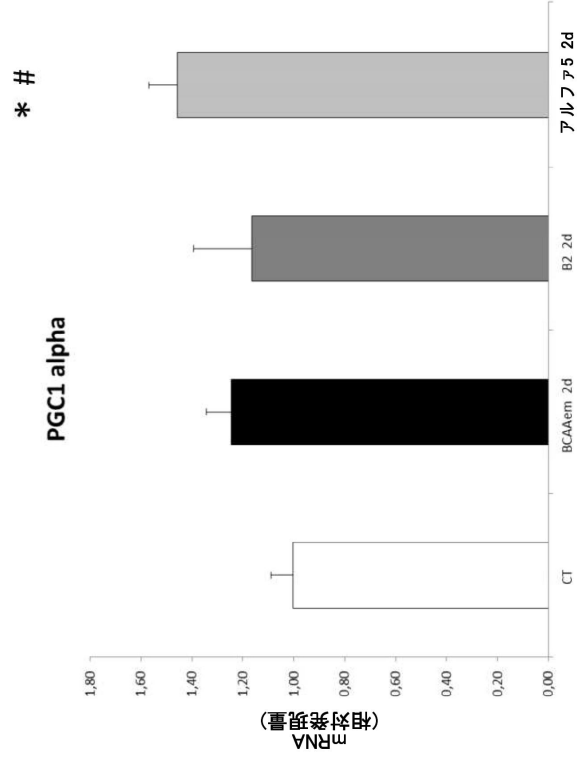


30

40

50

【図7】



【配列表】

[0007244184000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 7
A 6 1 P 43/00 1 2 1

審査官 金子 亜希

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 6 / 1 7 9 6 5 7 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 3 1 0 4 (W O , A 1)
食品工業, 2002年, 4 5 (1 9) , 4 5 - 5 2
健康支援, 2001年, 3 (1) , 1 1 - 1 6

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)
A 6 1 K 3 1 / 1 9 8
A 6 1 K 3 1 / 1 9 4
A 6 1 K 3 1 / 4 0 5
A 6 1 K 3 1 / 4 1 7 2
A 6 1 P 3 / 0 4
A 6 1 P 4 3 / 0 0
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)
C A P l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)