

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7189127号

(P7189127)

(45)発行日 令和4年12月13日(2022.12.13)

(24)登録日 令和4年12月5日(2022.12.5)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/137 (2006.01)

A 6 1 K 31/137

A 2 3 L 33/10 (2016.01)

A 2 3 L 33/10

A 6 1 P 1/16 (2006.01)

A 6 1 P 1/16

請求項の数 2 (全28頁)

(21)出願番号	特願2019-512804(P2019-512804)	(73)特許権者	512157966
(86)(22)出願日	平成29年9月6日(2017.9.6)		メタボリック・テクノロジーズ, インコ
(65)公表番号	特表2019-526598(P2019-526598 A)		ーポレーテッド
(43)公表日	令和1年9月19日(2019.9.19)		アメリカ合衆国アイオワ州50010,
(86)国際出願番号	PCT/US2017/050317		エームズ, サウス・ループ・ドライブ
(87)国際公開番号	WO2018/048932	(74)代理人	2711, スイート 4400
(87)国際公開日	平成30年3月15日(2018.3.15)		100118902
審査請求日	令和2年9月3日(2020.9.3)	(74)代理人	弁理士 山本 修
(31)優先権主張番号	62/383,895	(74)代理人	100106208
(32)優先日	平成28年9月6日(2016.9.6)		弁理士 宮前 徹
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人	100120112
	米国(US)		中西 基晴
(31)優先権主張番号	62/410,133	(74)代理人	100126985
(32)優先日	平成28年10月19日(2016.10.19)		弁理士 中村 充利
	最終頁に続く	(72)発明者	ラスメイチャー, ジョン
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D)、N A S H、A L Dまたは肝臓に関する状態の治療、予防または改善のためのガンマ - ケトアルデヒドスカベンジャーの組成物および

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

肝疾患を有するかまたはそのリスクがある動物の肝疾患の治療、予防または改善によって、肝疾患を抑制または治療するための方法において用いるための組成物であって、

該肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) および非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) からなる群より選ばれ、

サリチルアミン (2 - ヒドロキシベンジルアミンまたは 2 - H O B A) またはその立体異性体を含み、

サリチルアミン (2 - ヒドロキシベンジルアミンまたは 2 - H O B A) またはその立体異性体は有効量で該動物に投与される、

前記組成物。

【請求項 2】

医薬的に許容される担体、およびサリチルアミン (2 - ヒドロキシベンジルアミンまたは 2 - H O B A) またはその立体異性体を含む、肝疾患を有するかまたはそのリスクがある動物の肝疾患の治療、予防または改善によって肝疾患を抑制または治療するための方法において用いるための栄養組成物であって、該肝疾患は、非アルコール性脂肪性肝疾患 (N A F L D) および非アルコール性脂肪性肝炎 (N A S H) からなる群より選ばれる、前記栄養組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本出願は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる、2016年9月6日付けで出願された米国特許出願第62/383,895号および2016年10月19日付けで出願された米国特許出願第62/410,133号の優先権を主張する。

【 0 0 0 2 】

発明の背景

1. 分野

本発明は、 α -ケトアルデヒド(α -KA)を捕捉する化合物、例えば2-ヒドロキシベンジルアミン(2-HOBA)を含む組成物に関し、さらに、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)および/またはアルコール性肝疾患(ALD)、および/または非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)などの肝臓に関する疾患または状態の治療、予防または改善のための α -KASカベンジャーを投与する方法に関する。

10

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

2. 背景

アルコールに起因する慢性肝疾患は、上昇し続ける罹患率と死亡率の主な原因である。ウイルス性肝炎に次いで、慢性的なエタノールの過剰摂取が、肝臓がんおよび硬変症によって引き起こされる全死亡数の25%の原因となっている。慢性的なアルコール摂取は、肝臓の疾患およびがんと高頻度で併存する。アルコール性肝疾患(ALD)にとっての健康管理の負担は重く、そのコストは米国単独でも年間270億ドルに達すると推測される。節制することがALDの最良の療法であるが、常習性が主要なリスクであり、再発率は年間通じて67%~81%の範囲である。

20

【 0 0 0 4 】

ALDは、脂肪肝(脂肪症)、肝炎および硬変症/線維症などの様々な肝臓の兆候を包含し、特定の個体ではこれらの兆候が同時に出現する場合もある。ALDの範囲は、単純な脂肪症からアルコール性脂肪性肝炎(ASH)や硬変症に至るまで様々であり、肥満症によって悪化する。アルコールが肝臓傷害を誘発する多くのメカニズムがあるが、炎症がALD進行の基礎となっている。エタノール代謝は、抗酸化物質の枯渇を促進し、アセトアルデヒド、酢酸塩、活性酸素種(ROS)、および炎症性応答を誘発する脂質の過酸化物質などの有害な物質の形成を引き起こす。加えて、アルコールおよびその代謝産物は、消化管の漏れを促進すること、および免疫細胞を刺激すること(いわゆる適応免疫応答)、および/または補体などの自然免疫経路を活性化することによって炎症を刺激する。自然免疫の構成要素の活性化は、アルコールによる肝臓傷害を開始させるが、肝細胞の損傷を低減する肝保護的な、再生性の、および抗炎症性の応答をも引き起こす。

30

【 0 0 0 5 】

慢性肝疾患、特にALDの炎症および病因において、脂質の過酸化および酸化ストレスがかなりの役割を果たすことが周知である。アルデヒド、例えばマロンジアルデヒド(MDA)および4-ヒドロキシノネナール(4-HNE)は、正常なタンパク質の機能を妨害する共有結合のタンパク質付加物を形成する。MDAや4-HNEより数桁高い反応性を有するものは、非環式 α -KA(イソレブグラジンまたはイソケタールとしても公知)と称されるアラキドン酸の過酸化生成物であり、これらは炎症の主要な媒介物質である(図1)。 α -KAは、迅速に共有結合によってタンパク質およびDNAに付加し、正常な分子の機能を妨害し、タンパク質-タンパク質架橋(イソケタール)を形成する。 α -KAは、F₂-イソプロスタン(F₂-ISP)経路によって生産される。 α -KAは、様々な病態生理学的状態において、フリーラジカルが媒介するアラキドン酸の過酸化によって非酵素的に形成される非典型的なエイコサノイドであるイソプロスタン(ISP)およびイソフラン(ISO F)を介して蓄積することが示されている。イソフランはイソプロスタンと類似しているが、置換テトラヒドロフラン環を含有する。ALDを有するヒト対象の血清における抗 α -KAの抗体力価が、ALDを有さない対象に比べて上昇することが実証されている(図2)。

40

50

【0006】

ALDは、脂肪症、炎症、肝細胞の壊死およびアポトーシスの進行、それに伴う偶発的な線維症および硬変症の発症を特徴とする。また、過剰なアルコール摂取が肝臓への酸化性傷害の原因となることも十分に確立されている。F₂-イソPは、インビボにおける酸化的ストレスの最も正確な予測変数であることが示されており、アルコール性肝疾患や慢性肝炎である場合、それらのレベルが増加する。KAの過剰生産は、数々の慢性炎症性疾患の病因に関与する。つい最近になって、マウスへのエタノール給餌は、容易にタンパク質と結合して安定な付加物を形成する肝臓の - KA形成を誘発することが示されている。これらの - KA - タンパク質付加物は、炎症促進性応答または付加物特異的な免疫応答を惹起することによるエタノール誘発性の肝臓傷害に寄与する可能性が高い。

10

【0007】

炎症過程を阻害すること、およびALDに関連する免疫原性経路を妨害することを目的とする適切な治療的介入を突き止めることに多大な関心が寄せられている。2-ヒドロキシベンジルアミン(2-HOA)、すなわちソバの繊維が、 - KA - リシル - タンパク質付加物の形成速度より980倍速く - KAを捕捉する - KAの有力なスカベンジャーであることが見出された。このことから、重要なことに、この - KAスカベンジャーはシクロオキシゲナーゼ酵素を阻害しないことが示された。酸化剤が媒介する細胞死のモデルにおいて(図3)、2-HOAはほぼ完全にt-ブチルヒドロペルオキシド(tBHP)により誘発された細胞死を防いだ。加えて、2-HOAは、様々な濃度の過酸化水素(H₂O₂)に曝露されたHepG2細胞において酸化剤が媒介する細胞死に対する保護的作用を有することが実証された。

20

【0008】

ALDの深刻な経済的および健康上の影響にもかかわらず、この重度の臨床症状を有する患者の管理における進歩はほとんどなされなかった。節制が治療の土台となるものであるが、ALDに関する他の治療的介入および治療を突き止めることに多大な関心が寄せられている。現在のALD治療の様式としては、コルチコステロイドおよびペントキシフィリンが挙げられる。コルチコステロイドは、アルコール性肝炎の重度の形態における短期間の生存を改善するが、高頻度の使用は禁忌である。ペントキシフィリンは、競合的な非選択的なホスホジエステラーゼ阻害剤であり、重症の急性アルコール性肝炎における短期間の生存を改善し、プレドニゾンと比較して改善されたリスク-ベネフィットプロファイルを実証したが、プレドニゾンと併用しても相加的な利益を付与しなかった。これらの治療はどちらも炎症性応答を弱めるが、基礎となる炎症性シグナルを標的としない。2-HOAによる毒性の酸化脂質のトラップは、炎症を持続させ肝臓の損傷を駆り立てる悪化原因となるタンパク質付加物の形成を少なくするという点で新規である。本発明は、ALDを予防し、さらにアルコール性肝疾患の蔓延も減弱する2-HOAの使用を包含する。

30

【0009】

疫学的なデータから、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、西側諸国において慢性肝疾患の最も普及している形態であることが示されている。NAFLDの範囲は、単純な脂肪症から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)や硬変症に至るまで様々であり、肥満症、脂質異常症およびインスリン耐性の状況において頻繁に起こる。NASHは、患者10~15%において硬変症や肝不全を引き起こす可能性がある。脂肪症をNASHから区別するメカニズムは、まだ十分理解されていない。炎症ならびにその結果としての活性酸素種(ROS)および反応性脂質種(RLS)の生産がNASHの病因における重要な要因であることが明らかになりつつある。肝臓において、炎症性および免疫応答における変化は、ROSおよび炎症促進性サイトカインの生産を激化させ、NASHの悪化を引き起こす。

40

【0010】

さらに、NAFLDおよびNASHを有する患者は、一般的な集団と比較してより高い死亡率および病的状態を有する。NAFLDは、高い心臓血管系の死亡率を示し、NASHは、より高い肝臓関連の死亡率を示す。近年の観察から、NASHは、米国で現在のと

50

ころ 3 番目に一般的な肝臓移植の適応症であることが結論付けられており、次の 10 年の間に最も一般的な肝臓移植の適応症になると予想される。NASH は、NAFLD の炎症性の形態であり、過剰な肝臓脂肪、炎症、および肝細胞の風船化を特徴とし、線維症が併存することもある。NASH は、末期の肝疾患、または硬変症への進行が最も懸念される。NASH を支持するメカニズムおよび条件は組織学的に明確ではないが、アルコール性脂肪性肝炎との類似性がある。NASH を含む慢性肝疾患の病因において、脂質の過酸化および酸化的ストレスが重要な役割があることは周知である。活性酸素種 (ROS) は、脂質過酸化物の形成を促進し、炎症の主要な媒介物質である二機能性の求電子物質 (BE) の生成を引き起こす。これらの BE のなかでも、4 - ヒドロキシノネナール (4 - HNE)、アクロレイン、マロンジアルデヒド (MDA)、メチルグリオキサール (MGO) およびレブグランジン (LG) は、脂質、タンパク質および DNA を共有結合で改変することによって酸化傷害を媒介することがわかっている。BE は、極めて反応性が高い化合物であり、これは、共有結合によりタンパク質および DNA と付加物を形成して、正常な分子機能を妨害し、タンパク質、ホスホエタノールアミンおよび DNA との架橋を形成する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、肝臓における脂肪の蓄積によって引き起こされる肝臓の炎症および損傷である。NASH は ALD と似ているが、アルコールをほとんど摂取しない人で起こる。米国人の 2 ~ 5 パーセントが NASH に罹患しており、それらはほとんどの場合、中年で過体重であるかまたは肥満の人である。本発明は、NASH を予防および / または治療するための 2 - HOBA の使用を包含する。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、毒性の酸化脂質 (ケトアルデヒド) を捕捉して、炎症性プログラムを効果的にレギュレートし、炎症に伴う肝臓の傷害を元に戻すための、2 - HOBA の使用を包含する。

【0013】

本発明は、-KA を標的化して、アルコール性肝疾患における脂質の過酸化とその結果生じる -KA 特異的な免疫応答を予防するための、2 - HOBA の使用を包含する。

30

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】図 1 は、どのように -KA がリシンまたは他の第一アミンと反応して可逆的なシッフ塩基付加物を形成するかを描写する図である。

【図 2】図 2 は、アルコール性肝疾患を有するおよび有さない入院 ICU 患者における血清 -KA 抗体価を描写するグラフである。

【図 3】図 3 は、t - ブチルヒドロペルオキシドを増加させた場合のマウス肝細胞における酸化剤が媒介する細胞死に対する 2 - HOBA の保護的作用を描写するグラフである。

【図 4】図 4 A および図 4 B は、エタノール用量を増加させた場合の HepaRG における ROS、およびエタノール濃度を増加させた場合の 2 - HOBA の保護的作用を描写する。

40

【図 5】図 5 A および図 5 B は、異なるレベルの 2 - HOBA で前処置した HepaRG 細胞の培地における ALT および AST レベルを描写する。

【図 6】図 6 は、エタノールが媒介する -KA 形成に対する 2 - HOBA の前処置の作用を示す。

【図 7】図 7 は、マウス肺における -KA によって改変されたヒストン - H3 および - H4 の同定を示す。

【図 8】図 8 は、肝臓および腎臓のイソプロスタノール (イソ P) およびイソフラン (イソ F) を描写するグラフである。

50

【図 9】図 9 は、ヒト N A F L D 肝臓におけるイソ L G の形成に関する証拠を描写する。

【図 10】図 10 は、N A S H における M P O 陽性細胞の増加を描写する。

【図 11 - 1】図 11 A ~ 図 11 E は、S T A M マウスにおける N A F L D の発達を描写する。

【図 11 - 2】図 11 F ~ 図 11 I は、S T A M マウスにおける N A F L D の発達を描写する。

【図 12 - 1】図 12 A ~ 図 12 T は、S T A M マウスへの 2 - H O B A の作用を記載する。

【図 12 - 2】図 12 A ~ 図 12 T は、S T A M マウスへの 2 - H O B A の作用を記載する。

【図 12 - 3】図 12 A ~ 図 12 T は、S T A M マウスへの 2 - H O B A の作用を記載する。

【図 13】図 13 A ~ 図 13 F は、S T A M (商標) マウスにおけるインスリンシグナル伝達および肝臓のインフラマソームを示す。

【図 14 - 1】図 14 A ~ 図 14 G は、D I A M O N D (商標) マウスにおける N A F L D の発達を描写する。

【図 14 - 2】図 14 A ~ 図 14 G は、D I A M O N D (商標) マウスにおける N A F L D の発達を描写する。

【図 15 - 1】図 15 は、D I A M O N D (商標) マウスの試験の結果を要約する。

【図 15 - 2】図 15 は、D I A M O N D (商標) マウスの試験の結果を要約する。

【図 16 - 1】図 16 は、D I A M O N D (商標) マウスの試験の結果を要約する。

【図 16 - 2】図 16 は、D I A M O N D (商標) マウスの試験の結果を要約する。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、 - K A - タンパク質付加物の形成、ならびに自然および適応免疫応答への差別的な作用を予防することによって肝臓の傷害を低減すると予想される新規の栄養療法を包含する。この栄養療法は、これらに限定されないが、N A F L D、A L D および N A S H などの肝臓に関する状態または疾患の治療、予防または改善に使用することができる。栄養療法は、全体的な肝臓の健康状態を改善し、健康な肝機能を維持するのに使用することができる。

【0016】

本発明は、二機能性の求電子物質 (B F E) 「スカベンジャー」分子のクラスを使用して肝臓における - K A 付加物の形成を特異的に予防するための手段を含む。一連のピリドキサミンを包含するフェノール系アミンおよびその水溶性誘導体であるソバの実の天然産物の 2 - ヒドロキシベンジルアミン (2 - H O B A) は、好ましい実施態様を構成する。2 - H O B A は特に、 - K A と、リシンとの反応より 980 倍速く反応して、インビトロおよびインビボでのタンパク質および脂質との付加物形成を予防する。

【0017】

本発明の組成物および方法は、ヒトおよび非ヒト動物を含む動物を対象とする。動物は、健康であってもよいし、または疾患または状態に罹っていてもよい。

【0018】

投与すること、または投与という用語は、哺乳動物に組成物を提供すること、組成物を摂取すること、およびそれらの組合せを包含する。

【0019】

本発明は、2 - H O B A を使用するための組成物および方法を包含し、ここで 2 - H O B A は、サリチルアミン、S A M、2 - ヒドロキシベンジルアミン、およびベンチルピリドキサミン (P P M) とも称される。

【0020】

本発明の実施態様は、以下の式：

10

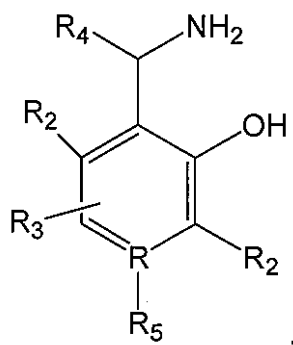
20

30

40

50

【化 1】



10

(式中、

R は、N または C であり；

R₂ は、独立して、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃ および R₄ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

R₃ は、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂ または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

20

R₄ は、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

R₅ は、結合、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₄ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよい）

30

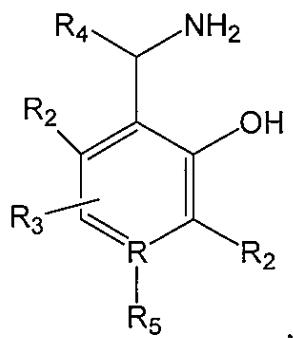
の化合物、ならびにその立体異性体および類似体を包含し、さらに、NAFLD、ALD および NASH などの肝臓の状態または疾患を有するまたはそのリスクがある対象における NAFLD、ALD および NASH などの肝臓の状態または疾患を治療し、予防し、または改善し、それによってそのような肝臓の状態または疾患を抑制または治療するための方法における薬剤としてのその使用を包含する。

【0021】

別の本発明の実施態様は、以下の式：

40

【化 2】



10

(式中、

R は、N または C であり；

R₂ は、独立して、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃ および R₄ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

R₃ は、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂ または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

20

R₄ は、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

R₅ は、結合、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₄ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよい)

30

の化合物、ならびにその立体異性体および類似体を包含し、さらに、NAFLD、ALD および NASH などの肝臓の状態を有するまたはそのリスクがある対象におけるそのような肝臓の状態または疾患の治療、予防または改善のための方法におけるその使用を包含する。

【0022】

ある特定の実施態様において、本化合物は、本明細書で開示された化合物から選択することができる。好ましい実施態様において、本化合物は、サリチルアミンであり得る。

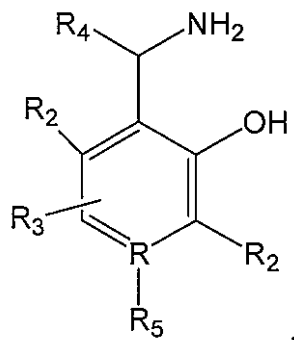
40

【0023】

本発明の別の実施態様は、NAFLD、ALD および NASH などの肝臓の状態または疾患を有するまたはそのリスクがある対象における NAFLD、ALD および NASH などの肝臓の状態または疾患を治療し、予防し、または改善し、それによってそのような肝臓の状態を抑制または治療するための方法であって、対象に、哺乳動物における機能異常を治療するのに有効な投薬法および量で、少なくとも 1 種の化合物を、NAFLD、ALD および NASH などの肝臓の状態または疾患の治療、予防または改善の公知の副作用を有する薬物と共に投与する工程を含み、この化合物は、以下の式：

50

【化 3】



10

(式中、

R は、N または C であり；

R₂ は、独立して、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃ および R₄ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

R₃ は、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂ または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

20

R₄ は、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₅ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよく；

R₅ は、結合、H、ヒドロキシ、ハロゲン、ニトロ、CF₃、C₁～6 アルキル、C₁～6 アルコキシ、C₃～10 シクロアルキル、1 つまたはそれより多くの R₄、R₂ および R₃ で任意選択で置換されていてもよい C、O、S または N を含有する C₃～8 員環であり、1 つまたはそれより多くの R₂、R₃、または R₄ と共に環化されて、C、O、S または N を含有する任意選択で置換されていてもよい C₃～8 員環を形成してもよい)

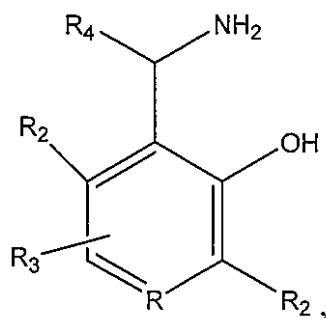
30

の化合物、ならびにその立体異性体および類似体によって代表される構造を有する。

【 0 0 2 4】

本明細書で開示された方法と共に使用することができる化合物の例としては、これらに限定されないが、式：

【化 4】



40

(式中、

R は、N または C であり；

50

R_2 は、独立して、H、置換または非置換のアルキルであり；
 R_3 は、H、ハロゲン、アルコキシ、ヒドロキシル、ニトロであり；
 R_4 は、H、置換または非置換のアルキル、カルボキシルである）
 から選択される化合物およびその医薬的に許容される塩が挙げられる。

【0025】

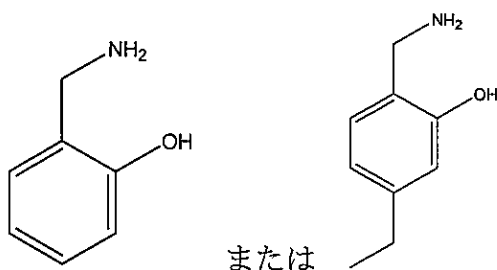
好ましい実施態様において、本化合物は、サリチルアミン（2 - ヒドロキシベンジルアミンまたは 2 - H O B A ）である。

【0026】

本化合物は、下記またはそれらの医薬的に許容される塩から選ぶことができる。

【化5】

10

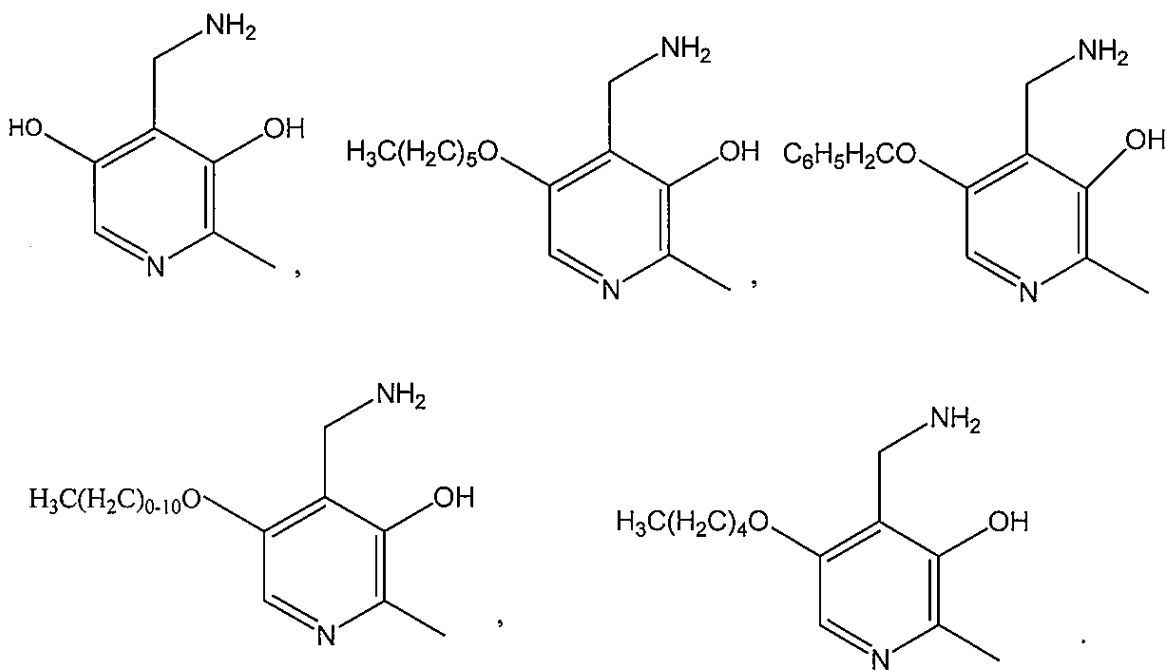


【0027】

20

本化合物はまた、下記またはその医薬的に許容される塩から選ぶことができる。

【化6】



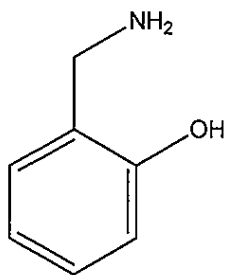
30

40

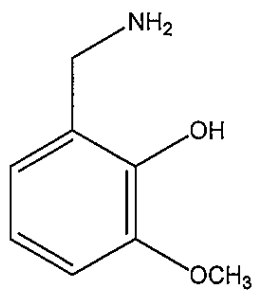
【0028】

本化合物または類似体はまた、下記またはその医薬的に許容される塩から選ぶことができる。

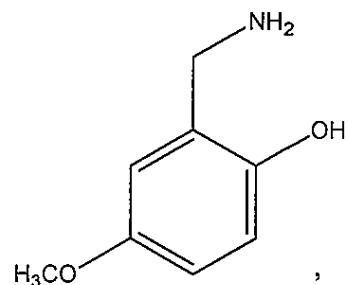
【化 7】



,

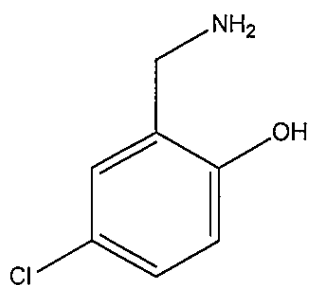


,

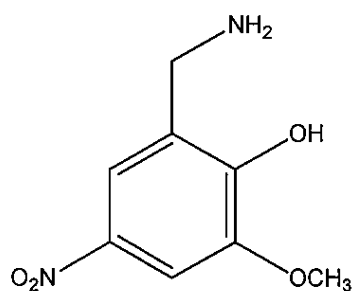


,

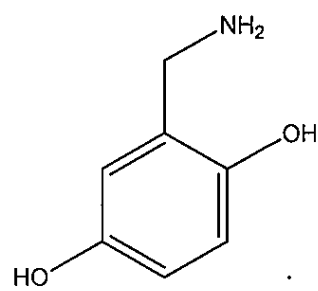
10



,



,



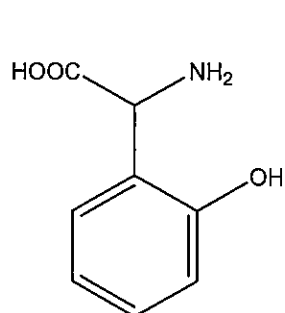
.

20

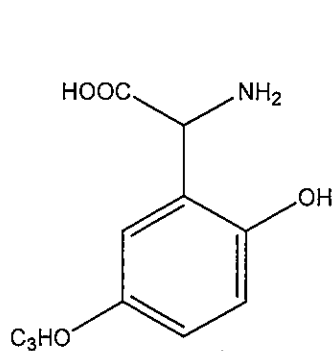
【 0 0 2 9 】

本化合物はまた、下記またはその医薬的に許容される塩から選ぶことができる。

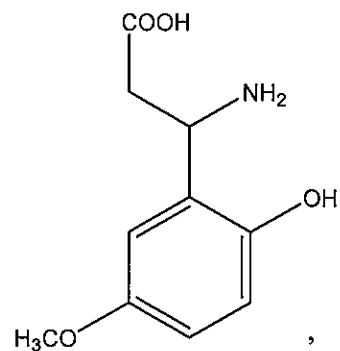
【化 8】



,



,



,

30

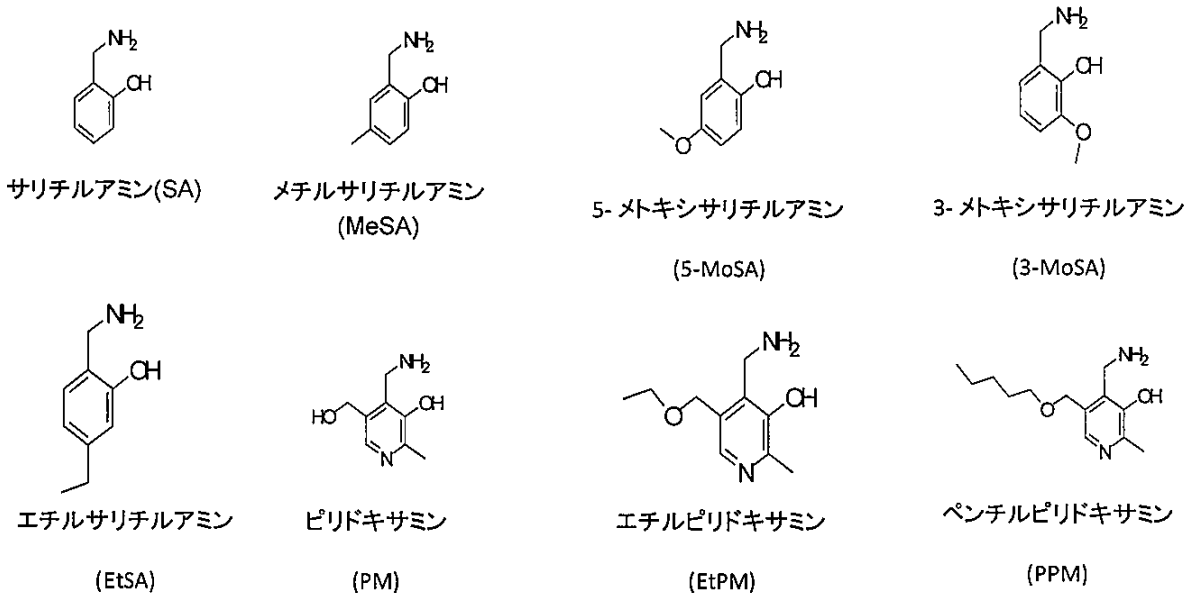
【 0 0 3 0 】

本化合物はまた、下記またはその医薬的に許容される塩から選ぶことができる。

40

50

【化 9】



10

【 0 0 3 1】

本発明の化合物は、あらゆる方法によって投与することができ、このような方法は当業者周知であり、そのようなものとしては、これらに限定されないが、経口投与、経皮投与、吸入による投与、経鼻投与、局所投与、腔内投与、眼への投与、耳内投与、大脳内投与、直腸内投与、ならびに非経口投与、例えば、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与および皮下投与などの注射による投与などが挙げられる。本化合物は、すでに罹っている疾患または状態を治療するために治療的に投与してもよいし、または疾患または状態の予防のために予防的に投与してもよい。

20

【 0 0 3 2】

本組成物を含むあらゆる好適な医薬用媒体が本発明の範囲内で利用できるが、好ましくは、本組成物は、好適な製剤用担体、例えばデキストロースまたはスクロースと組み合わせられる。

30

【 0 0 3 3】

本組成物が投与される頻度を計算方法は、当業界において周知であり、あらゆる好適な投与頻度（例えば、1回の6g用量/日または2回の3g用量/日）があらゆる好適な期間にわたり本発明の範囲内で使用することができる（例えば、単回用量を5分間または1時間にわたり投与してもよいし、または代替として、複数回用量を長期間にわたり投与してもよい）。本発明の組成物は、長期間にわたり、例えば数週間、数か月または数年にわたり投与してもよい。本組成物は、1日または24時間で投与される組成物の総量を含む1日分の一食分（serving）が作製されるように、1日当たり1回分の用量を含む個別の一食分で、または1回分より多くの用量を含む個別の一食分（複数の個別の一食分）で投与することができる。

40

【 0 0 3 4】

本発明の組成物のあらゆる好適な用量が本発明の範囲内で使用することができる。適した用量を計算する方法は当業界において周知である。

【 0 0 3 5】

「治療」または「治療すること」は、疾患、病的状態、または障害の治癒、改善、安定化、または予防を意図した患者の医学的管理を指す。この用語は、積極的治療、すなわち具体的に疾患、病的状態、または障害の改善を目的とした治療を包含し、さらに、原因治療、すなわち関連する疾患、病的状態、または障害の原因を取り除くことを目的とした治療も包含する。加えて、この用語は、緩和治療、すなわち疾患、病的状態、または障害の治癒というよりも症状が緩和されるように設計された治療；予防的治療、すなわち関連す

50

る疾患、病的状態、または障害の発生を最小化すること、または部分的もしくは完全に抑制することを目的とした治療；および支持療法、すなわち関連する疾患、病的状態、または障害の改善を目的とする別の具体的な療法を補うために用いられる治療を包含する。

【実施例】

【0036】

実施例 1

完全に分化した 21 日目の HepaRG 肝細胞（バイオ・プレディクトインターナショナル（Bio-Predict International））は、容易に蛍光性の MRP2 基質である CDFDA を代謝する多数の毛細胆管を含有する肝細胞の群体を包囲する透明な上皮細胞を提示する。HepaRG 細胞は、ヒト肝臓の吸収、分布、代謝、および排出に高い忠実度を有する固有の十分に確立されたヒト肝細胞培養系である。2-HOBA の作用の公知のメカニズムと一致して、HepaRG 細胞を 2-HOBA（0、250、500 および 1000 μM ）で 24 時間前処置し、それに続いて濃度を増加させたエタノール（0～200 mM；24 時間）で前処置したが、活性酸素種の形成に影響はなかった（図 4A）。しかしながら、2-HOBA は、エタノールによる細胞死をほぼ完全に防いだ（図 4B）。同様に、HepaRG 細胞を 2-HOBA（0、250、500 および 1000 μM ）で 24 時間前処置し、それに続いて濃度を増加させたエタノール（0～200 mM；24 時間）で前処置したところ、HepaRG 肝細胞から採取した培養培地中の ALT（図 5A）および AST（図 5B）レベルがほぼ標準化された。現在、-KA 改変を受けやすいタンパク質の同一性に関する知見はほとんどない。本発明者らは、先に 2-HOBA の前処置（0、250 または 500 μM 、24 時間）を行ってまたは行わないでエタノールに曝露された HepaRG 肝細胞培養物を使用して、内因的に付加物を形成するタンパク質の同一性を調査した。細胞を回収し、SDS-PAGE によって総タンパク質を分析し、次いでよく特徴付けられた単鎖抗体である、-KA 異性体によって改変されたペプチドおよびタンパク質を認識する D11SCFv で探索した（図 6）。-KA 改変を受けやすいタンパク質の「プール」があるという理論と一致して、全ての治療において類似のレベルの「バックグラウンド」抗 D11 交差反応性が示された。しかしながら、エタノールで処置されたが 2-HOBA で保護されていない肝細胞において、約 18 kD における単一のバンド（矢印）の交差反応性のロバストな増加がみられた。対照的に、このバンドの強度は、2-HOBA の前処置（250 または 500 μM の 2-HOBA）によって、未処置対照で観察されたレベルに回復した。興味深いことに、このバンドは、近年肺線維症のマウスモデルにおいて -KA との付加物および抗 D11 抗体として同定されたものと同じ分子量を有する（図 7）。これらのデータは、ETOH は、-KA と付加物を形成するタンパク質の形成を促進し、この形成は 2-HOBA でブロックできることを意味する。

【0037】

総合すると、これらの発見から、-KA が、脂質の過酸化によって引き起こされる肝臓傷害の主要な媒介物質であること、および 2-HOBA の使用が、このような酸化剤またはエタノールへの曝露により誘発される細胞死から保護することが実証される。-KA の標的化は、アルコール性肝疾患における脂質の過酸化とその結果生じる -KA 特異的な免疫応答を予防するための方法として使用することができる。

【0038】

実施例 2

C57/BL6J マウスに 2-HOBA およびエタノールを同時に投与して、エタノールが媒介する肝臓機能異常（AST および ALT の増加）を和らげること、-KA 形成を低減すること、免疫応答を有利に変更すること、および有益な細胞内シグナル伝達経路を刺激することにおける 2-HOBA の効能を確立した。結果から、2-HOBA（1.0 mg/ml）での前処置が、エタノールに曝露されると活性化される肝臓の傷害（-KA および肝機能酵素の上昇）を有意に低減することが示される。

【0039】

14 日間のエタノール処置の前に 2-HOBA（0.5 g/L、Lieber-DeC

a r l i の液状食物、L D L D 中) をマウスに投与して、肝臓の傷害を和らげることに
ける 2 - H O B A の効能を検査した。N I A A A モデル (L D L D + 耽溺での 10 日間の
エタノール) を使用してエタノール (5 % v / v) を投与した。食物摂取および体重は、
L D L D への 0 . 5 g / L の 2 - H O B A の添加による有意な影響を受けなかった (デー
タ示さず) 。エタノールを用いた場合、マルトデキストリン供給と比べて、白血球および
リンパ球の数は低減したが、好酸球および好塩基球の数は増加した (表 1) 。これは、ア
ルコール性肝臓傷害の他の報告と一致していた。これらの研究において、このような応答
は、2 - H O B A の存在下で観察されなかった。0 . 5 g / L での 2 - H O B A は、血清
A S T または A L T の増加を減じられなかった (表 2) 。

【化 1 0】

10

表 1. NIAAAエタノール処置レジメン後におけるマウスの臨床的な血液の化学的性質

	対照 + MD	対照+ ETOH	2-HOBA + MD	2-HOBA + ETOH
WBC	5.70 ± 0.61	2.47 ± 0.33**	6.08 ± 1.05	3.11 ± 0.66
リンパ球	65.67 ± 2.63	50.18 ± 2.98**	58.14 ± 5.45	50.42 ± 4.59
単球	7.97 ± 0.65	8.29 ± 1.32	6.66 ± 0.92	6.33 ± 1.11
好酸球	0.96 ± 0.16	3.61 ± 0.69***	1.79 ± 0.40	2.71 ± 0.46
好塩基球	0.40 ± 0.10	1.74 ± 0.66*	0.60 ± 0.14	1.27 ± 0.26#

略語

細胞数は、x10³/μl で示される。W B C ; 白血球数; 統計的有意性は、対応のないスチューデントの両
側 t 検定を使用して決定した。N=マウス 12 匹/グループ。対照+MD に対して P ≤ 0 . 01 ;

*** 対照+MD に対して P ≤ 0 . 001 ; # 2-HOBA+MD に対して P ≤ 0 . 05。

20

【化 1 1】

表 2. 2-HOBA (0.5 g/L) 処置ありまたはなしでの NIAAA 処置レジメン後のマウスにおける一次評価項目

	(1) 対照 + MD	(2) 対照+ ETOH	(3) 2-HOBA + MD	(4) 2-HOBA + ETOH	1 対 2	3 対 4	1 対 3	2 対 4
AST	992.8 ± 345.1	961.1 ± 297.7	566.5 ± 34.1	1725.0 ± 300.2	0.93	0.0017***	0.34	0.98
ALT	77.2 ± 15.1	406.4 ± 77.2	54.3 ± 20.1	443.7 ± 66.2	0.0018**	<0.0001**	0.29	0.75

データは平均 ± S. E. M として報告した。A S T、血清アスパラギン酸アミノトランスフ
ェラーゼ; A L T、アラニンアミノトランスフェラーゼ; N=マウス 12 匹/グループ。*
* P は、有意性 ≤ 0 . 01 であることを示し、*** P は、対応のないスチューデントの両
側 t 検定により有意性 ≤ 0 . 001 であることを示す。A S T および A L T は U / L で示さ
れる

30

【0040】

N I A A A モデルを使用したエタノールの投与の前に、マウスの追加のコホートに 2 -
H O B A (1 . 0 g / L) による 14 日の前処置を施した。エタノールが投与されたマウ
スの食物摂取はより少なく、その結果として、研究終了時に、体重がマルトデキストリン
が供給された対照より約 2 . 5 g 少なかった。

40

【0041】

【化 1 2】

表 3 2-HOBA (1.0 g/L)処置ありまたはなしでのNIAAA処置レジメン後のマウスにおける一次評価項目

	(1)対照+ MD	(2)対照+ ETOH	(3) 2-HOBA + MD	(4) 2-HOBA + ETOH	1対2	3対4	1対3	2対4
AST	634.4 ± 95.0	906.1 ± 186.1	693.6 ± 173.1	676.6 ± 86.7	0.17	0.94	0.76	0.30
ALT	50.2 ± 5.5	253.9 ± 62.9	127.5 ± 78.59	164.4 ± 20.8	0.0014***	0.72	0.35	0.21
BUN	21.3 ± 1.2	27.1 ± 5.5	34.6 ± 2.9	22.6 ± 1.7	0.25	0.60	0.30	0.47
CRE	0.4 ± 0.01	0.2 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.04	0.0003***	0.67	0.19	0.06

データは平均±S. E. Mとして報告した。AST、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ；ALT、アラニンアミノトランスフェラーゼ；N=マウス12匹/グループ。***Pは、対応のないスチューデントの両側t検定により有意性≤0.001であることを示す。ASTおよびALTの濃度は、U/Lで示される。血中尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン (CRE) 単位はmg/dLである。

【0042】

肝臓のトリグリセリド含量は、2-HOBA (1.0 g/L) で前処置された ETOH 刺激マウスにおいてより低いという傾向であった。血清 ALT の変化で示される肝臓の傷害は、対照 + ETOH マウス (253.9 ± 62.9 U/L) に比べて 2-HOBA の前処置 (164.4 ± 20.8 U/L) でより低い傾向であったが、これらは統計的有意性には至らなかった。AST は、対照 (906.1 ± 186.1 U/L) と比較して 2-HOBA + ETOH (676.6 ± 86.7 U/L) で前処置したマウスにおいてより低かったが、これらは統計的有意性には至らなかった。これらの変化は、図 8 で示されるように、肝臓のイソプロスタン (イソ P) およびイソフラン (イソ F) における有意な低減を伴っており、腎臓のイソプロスタンレベルにおける有意な低減ももたらした (対照 + ETOH における 2.0 ± 0.3 ng/g に対して 1.3 ± 0.1 ng/g; P < 0.05)。

【0043】

NIAAA モデルにおける 1.0 g/L の 2-HOBA による 14 日間の前処置は、肝臓の傷害を低減し、ETOH 曝露で観察された肝臓のイソプロスタンおよびイソフラン含量における有意な増加を緩和し、加えて腎臓のイソプロスタン形成を減少させた。

【0044】

実施例 3 - NASH

F₂-イソプロスタン (F₂-イソ P) は、インビボでフリーラジカルにより開始されるアラキドン酸の過酸化を含む非酵素的なメカニズムを介して形成されるプロスタグランジン様化合物であり、インビボにおける酸化ストレスの最も正確な予測変数であることが示されている。血漿または尿の F₂-イソ P のレベル上昇は、アルコール性肝疾患患者において、さらには NAFLD / NASH を有する動物において報告されており、さらに肝臓の F₂-イソ P の増加も、NASH を有するヒトおよび動物で報告されている。F₂-イソ P 値はまた、慢性肝炎でも増加する。予備的なデータから示されるように、NAFLD / NASH であることが証明されたマウスおよびヒト肝臓組織から得られた肝臓は、対照と比べてイソ L G タンパク質付加物レベルの劇的な増加を示す (図 9)。これらの観察と同時に、生検で証明された NASH の特徴である試料中のミエロペルオキシダーゼ陽性好中球の染色が増加したことから (図 10)、炎症の増強が示唆される。数々の薬剤が、炎症過程の増強に関連するようである。

【0045】

NASH 患者の血漿中における血漿リポ多糖 (LPS) および遊離脂肪酸 (FFA) の増加は、肝臓の TLR4 - Myd88 とは独立したシグナル伝達の増加に関連することが実証された。また、培養された HepaRG 細胞において、パルミチン酸塩および LPS が、化学的な、または短鎖干渉 RNA が媒介する TLR4 阻害をブロックできる NF-κB 活性を誘発することも実証された。Liang らは、近年、代替の代謝リガンド (コレステロールおよび炭水化物) も、インフラマソーム媒介メカニズムを介した、脂肪症、肝細胞の肥大、および混成型 (好中球および単核細胞) の炎症の増強を開始させる可能性があることを実証した。

【 0 0 4 6 】

インフラマソームは、PAMP（病原体関連分子パターン）またはDAMP（損傷関連分子パターン）の結合時に、直接的にかまたはアダプター分子ASCを介するかのいずれかで、カスパーゼ1を活性化する自然免疫系の多量体タンパク質複合体である。カスパーゼ1は順に下流のシグナル伝達経路を活性化し、その結果生じた生物学的機能の変化は、細胞型および開始のリガンドに応じてきわめて多様である。インフラマソームは、(NOD)様受容体(NLR)ファミリー(NLRP1-3、NLRP6-7、NLRP12、NLRP3、NLRP4)、NAIPおよびAIM2のメンバーによって活性化される。NLRP3インフラマソームの活性化は、カスパーゼ-1による、不活性なプロIL-1、プロIL-18およびプロIL-33のそれらの活性型への切断を引き起こす。公知のNLRP3-インフラマソーム活性化剤としては、なかでも特に、脂肪酸、コレステロール、およびタンパク質凝集体が挙げられる。すでに述べられているNASHインフラマソームの分子トリガーとしては、DNA、飽和脂肪酸およびLPS、NLRP-1が挙げられる。これは、ISLGは、まだ十分に詳述されていないメカニズムを介した追加の有力なインフラマソーム活性化剤でもあることを示唆する。実際に、ISLGリガンドによる欠陥のあるNLRP1およびNLRP3シグナル伝達/活性化は、変更された肝臓の免疫代謝、宿主消化管のマイクロバイオーーム適合、およびNAFLからNASHへの推移の特徴である欠陥のあるNLRP-インフラマソームの感知の基礎となる可能性がある。

10

【 0 0 4 7 】

2-ヒドロキシベンジルアミン(2-HOBA)は、リシンより980倍高いKAとの反応性を有し、重要なことに、シクロオキシゲナーゼ酵素を阻害しない。酸化剤が媒介する細胞死のモデルにおいて、2-HOBAはほぼ完全にt-ブチルヒドロペルオキシド(tBHP)により誘発された肝細胞死を防いだ。これは、酸化傷害の病因が極めて複雑であり多面的であるという事実を考慮すれば驚くべき発見である。加えて、2-HOBAは、様々な濃度のH₂O₂に曝露されたHepG2細胞において酸化剤が媒介する細胞死に対する保護的作用を有することが実証された。総合すると、これらの発見から、KAが、脂質の過酸化によって引き起こされる肝臓の傷害の主要な媒介物質である可能性があること、さらに、2-HOBAの使用により、肝臓においてこのような酸化剤により誘発された細胞死からの保護がもたらされる可能性があることを示唆される。明らかに、2-HOBAの効能は、標的組織におけるその蓄積に依存しており、これは近年、インビボのマウスモデルにおける薬物動態研究によって裏付けられた。7日間にわたる1、3、および10g/Lの2-HOBAの投与は、血漿および肝臓の2-HOBAレベルの用量依存性の増加と関連していた。肝臓におけるレベルは血漿中より約10倍高かった。

20

30

【 0 0 4 8 】

NASH、硬変症およびHCCの病因の研究で使用された1つのモデルは、STAMモデル(ステリック社(Stelic Inc.)、日本東京)である。STAMモデルは、組織学および生理学の両方においてヒトNASHに強力な忠実度を有することから(高い空腹時血糖、肝臓の生化学的特徴、肝臓内の脂質、脂質異常症;図11)、これまでNAFLDの遺伝学的なノックアウトまたは食事モデルにおいて達成が困難であった特徴を発展させる。本発明者らは、2-HOBAは、STAMマウスにおいてNAFLDの重症度を低減できることを実証した(図12)。

40

【 0 0 4 9 】

STAM(商標)モデルにおいて、C57BL/6マウスにおいて、生後の2日目に200μgのストレプトゾトシン(STX)溶液を単回で皮下注射し、4週齢で高脂肪食の供給を始めることによってNASHを誘発する。3週齢で、STZ注射を受けた12匹のマウスを、2つのグループ:1)2-HOBA(n=6)、および2)ビヒクル対照(n=6)に分割した。2-HOBAグループのマウスは、飲用水中の2-HOBA(水1L中1g)が与えられ、一方でビヒクル対照グループは、2-HOBA非含有の普通の水が与えられた。4週齢で、全てのマウスを高脂肪食物を自由に摂取できる状況に置いた。全てのマウスにおいて高脂肪食物を続け、研究プロトコルの間中、それらのグループ割り

50

当てに基づき 2 - H O B A を補充した水または普通の水を与えた。体重および食物 / 水の摂取を毎週モニターした。9 週齢で動物を致死させ (6 週間の 2 - H O B A またはビヒクル処置) 、分析のために組織および血清を収集した。

【 0 0 5 0 】

肝臓の切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン (脂肪症、肝細胞の風船化、および炎症のスコア付けのため) 、シリウスレッド (線維症の評価のため) で染色し、さらに F 4 / 8 0 + マクロファージに関して染色した。スコア付けを、脂肪症、風船化、炎症、および壊死に関して盲検方式で、以下の基準 : 脂肪症 (0 ~ 4) : 0 = < 5 % ; 1 = 5 ~ 2 5 % ; 2 = 2 5 ~ 5 0 % ; 3 = 5 0 ~ 7 5 % ; 4 = 7 5 ~ 1 0 0 % を使用して実行した。風船化 (0 ~ 3) : 0 = なし ; 1 = 軽度 (3 個未満の肝細胞を含む病巣) ; 2 = 中程度 (3 個より多くの肝細胞を含む病巣または多病巣性) ; 3 = やや重度 (3 個またはそれより多くの肝細胞の 3 個より多くの病巣を有する多病巣性) 。炎症 (0 ~ 4) : 0 = なし ; 1 = 最小 (2 0 個の領域当たり 0 から 1 個の病巣) ; 2 = 軽度 (2 個の病巣) ; 3 = 中程度 (3 個の病巣) ; 4 = 重度 (4 個またはそれより多くの病巣) 。グルコース、インスリン、アラントランスアミナーゼ、アスパルテートトランスアミナーゼ、トリグリセリド、コレステロール、および F₂ - イソプロスタンの血清レベルを測定した。以下の炎症性マーカー : I L - 1 、 I L - 6 、 I L - 1 、 I L - 1 0 、 I L - 1 7 、 M C P - 1 、および T N F の血清および組織レベルを、多重アッセイ (ルミネックス (Luminex) 、ミリポア (Millipore) 、マサチューセッツ州ビレリカ) によって測定した。肝臓の 2 - H O B A 、 F₂ - イソプロスタン、およびイソフランレベルを、 L C / M S / M S 方法によって決定した。肝臓の m R N A 発現を、 R T - q P C R によって、以下の遺伝子 : G c k 、 P c k 1 、 P d k 4 、 I r s 1 、 I r s 2 、 P g c 1 a 、 C p t 1 a 、 G y k 、 S r e p b 1 c 、 A c c 1 、 F x r 、 C o x 1 、 C o x 2 、 N o x 4 、カタラーゼ、 G p x 1 、 G p 4 1 p h x 、および p 2 2 p h o x に関して評価した。肝臓のタンパク質含量およびリン酸化の状態を、 A k t 、 G S K 3 、 m T O R 、 E R K 、 J N K 、 F O X O 1 、および N A L P に関して決定した。独立したサンプルの両側 t 検定を使用して、2 - H O B A で処置されたグループとビヒクルで処置されたグループとで評価項目を比較した。有意性を = 0 . 0 5 に設定した。

【 0 0 5 1 】

生存率、臨床徴候および挙動を毎日モニターした。平均の体重および食物摂取はグループ間で類似していたが、肝臓の重量、および肝臓と体重との比率は有意に低減された (図 1 2) 。血清グルコースレベルはグループ間で類似していたが、インスリン、A L T および脂質は全て低減する傾向を示した。重要なことに、血清イソプロスタン (B F E 形成およびイソ L G 付加物形成のマーカー) および組織学的な N A S H の重症度は、2 - H O B A 処置により有意に低減された。

【 0 0 5 2 】

図 1 3 に記載される肝機能および表現型の改善のための基準をよりよく理解するために、S T A M マウスからの肝臓を免疫プロット分析に供した。2 - H O B A 処置は、m T O R 、 E R K または F O X O 1 を介したシグナル伝達を有意に変更することなく、A K T および G S K 3 のリン酸化を劇的に増加させた。加えて、このデータから、ミトコンドリアの燃料代謝のレギュレーションにおける主要なタンパク質であるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 4 (p d k 4) の発現が有意に減少したことが示され、これは、2 - H O B A 処置による、肝臓の重量における低減、N A S H の重症度における改善、および血清イソプロスタンにおける低減は、ミトコンドリアの機能に影響を及ぼす K A 媒介メカニズムによって媒介される可能性があることを示唆している。さらに、このデータから、2 H O B A 処置による N A L P 1 の減少が示される。近年、ミトコンドリアの機能のレギュレートにおける N R L P 3 - インフラマソームの役割が説明された。

【 0 0 5 3 】

S T A M モデルにおけるこれらのデータは、イソ L G - タンパク質付加物が肝臓への傷害の原因であること、さらに、2 - H O B A が N A S H の重症度を強く低減し、肝臓のイ

ンスリン感受性のマーカーを回復させていることを意味する。重要なことに、このデータから、このモデルにおけるNLRP1 - インフラマソームの活性化は、2 - H O B A の経口投与でブロックされることが示され、これは、イソL G 媒介インフラマソームN A S H 応答のブロックにおいて2 - H O B A が役割を有することを示唆する。

【0054】

実施例 4

D I A M O N D (非アルコール性脂肪性肝疾患の食物によって誘発された動物モデル) は、特許化された同系マウス株であって、高脂肪の糖分が多い食物に反応して、非アルコール性脂肪性肝疾患、非アルコール性脂肪性肝炎、線維症、および肝細胞癌を逐次的に発症させる。D I A M O N D マウスにおける疾患の進行は、組織病理学的特徴も含めてヒトの疾患の進行と極めて類似している。D I A M O N D マウスモデルは、肝臓の病的状態を誘発する遺伝子のノックアウトまたは毒素によるのではなく単に西洋的な食物 (高脂肪、砂糖水) の結果としてN A S Hを発症させるN A F L D / N A S Hの唯一のマウスモデルであるという点で独特である (図 1 4) 。

【0055】

12匹の8週齢の雄D I A M O N D マウスを、高脂肪食物 (H a r l a n - E N V I G O T D . 8 8 3 1 7) およびグルコース (1 8 . 9 % w / v) およびフルクトース (2 3 . 1 % w / v) を含有する水を自由に摂取できる状況に置いた。研究プロトコルの間中、全てのマウスがこの食物を続けた。12週齢で、マウスを、2つのグループ: 1) 2 - H O B A (n = 6) 、および2) ビヒクル対照 (n = 6) に分割した。2 - H O B A グループの動物は、飲用水中の2 - H O B A (グルコースおよびフルクトースを含む水1 L 中1 g) が与えられた。ビヒクル対照グループは、2 - H O B A 非含有の水 (グルコースおよびフルクトースを含む) が与えられた。体重および食物摂取を毎週測定した。約23週齢で、肝臓の脂肪を評価するために、全ての動物がグルコース負荷試験 (G T T) およびM R I イメージングを受けた。G T T のために、動物を12時間絶食させ、次いでグルコース (滅菌水中100 mg / mL グルコースを2 g / kg 体重で) を経口胃管栄養法によって投与した。グルコース投与の0、15、30、45、60、90、および120分後に血液をサンプリングし、濃度曲線下面積を計算した。24週齢で動物を致死させた (12週間の2 - H O B A またはビヒクル処置) 。分析のために、組織および血清を収集した。

【0056】

肝臓の切片を、ヘマトキシリンおよびエオシン (脂肪症、肝細胞の風船化、および炎症のスコア付けのため) およびシリウスレッド (線維症の評価のため) で染色した。スコア付けを、脂肪症、風船化、炎症、および壊死に関して盲検方式で、以下の基準: 脂肪症 (0 ~ 4) : 0 = < 5 % ; 1 = 5 ~ 2 5 % ; 2 = 2 5 ~ 5 0 % ; 3 = 5 0 ~ 7 5 % ; 4 = 7 5 ~ 1 0 0 % を使用して実行した。風船化 (0 ~ 3) : 0 = なし ; 1 = 軽度 (3 個未満の肝細胞を含む病巣) ; 2 = 中程度 (3 個より多くの肝細胞を含む病巣または多病巣性) ; 3 = やや重度 (3 個またはそれより多くの肝細胞の3 個より多くの病巣を有する多病巣性) 。炎症 (0 ~ 4) : 0 = なし ; 1 = 最小 (2 0 個の領域当たり0 から1 個の病巣) ; 2 = 軽度 (2 個の病巣) ; 3 = 中程度 (3 個の病巣) ; 4 = 重度 (4 個またはそれより多くの病巣) 。グルコース、アラニントランスアミナーゼ、およびアスパルテートトランスアミナーゼの血清レベルを測定した。肝臓のmRNA発現を、R T - q P C R によって、以下の遺伝子: T n f a 、 N l r p 1 a 、 I l 1 b 、 I l 1 8 、 T i m p 1 、 C o l 1 a 1 、 P r o C a r d 、 N l r p 3 、 C a s p 1 、 P r o I l 1 b 、 T g f b 1 、 B a m b i 、 P d k 4 、 および G a p d h に関して評価した。独立したサンプルの両側 t 検定を使用して、2 - H O B A で処置されたグループとビヒクルで処置されたグループとで評価項目を比較した。有意性を $p = 0 . 0 5$ に設定した。

【0057】

図 1 5 ~ 1 6 に、D I A M O N D マウスの試験の結果を要約する。これらのデータから、2 H O B A 補充の場合、肝臓の重量が低減し、それに伴い肝臓の酵素であるA L T およびA S T が有意に低減する傾向が実証される。これらの発見は、N A S H の発症を予防す

るかまたはその重症度を弱める 2 - H O B A の効能を裏付ける。

【 0 0 5 8 】

文献リスト

Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Genes Nutr* 2010; 5(2):141-147.PM:19809845

Mottaran E, Stewart SF, Rolla R et al. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(1):38-45.PM:11755315

Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 39(1):197-203.PM:14752838

Lee GS, Yan JS, Ng RK, Kakar S, Maher JJ. Polyunsaturated fat in the methionine-choline-deficient diet influences hepatic inflammation but not hepatocellular injury. *J Lipid Res* 2007; 48(8):1885-1896.PM:17526933

1. Williams R. The pervading influence of alcoholic liver disease in hepatology. *Alcohol Alcohol* 2008; 43(4):393-397.PM:18385413

2. Murray CJ, Richards MA, Newton JN et al. UK health performance: findings of the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2013; 381(9871):997-1020.PM:23668584

3. Basra S, Anand BS. Definition, epidemiology and magnitude of alcoholic hepatitis. *World J Hepatol* 2011; 3(5):108-113.PM:21731902

4. Mackie J, Groves K, Hoyle A et al. Orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease: a retrospective analysis of survival, recidivism, and risk factors predisposing to recidivism. *Liver Transpl* 2001; 7(5):418-427.PM:11349262

5. Miguet M, Monnet E, Vanlemmens C et al. Predictive factors of alcohol relapse after orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2004; 28(10 Pt 1):845-851.PM:15523219

6. Miller WR, Walters ST, Bennett ME. How effective is alcoholism treatment in the United States? *J Stud Alcohol* 2001; 62(2):211-220.PM:11327187

7. O'Shea RS, Dasarthy S, McCullough AJ. Alcoholic liver disease. *Hepatology* 2010; 51(1):307-328.PM:20034030

8. Wang HJ, Gao B, Zakhari S, Nagy LE. Inflammation in alcoholic liver disease. *Annu Rev Nutr* 2012; 32:343-368.PM:22524187

9. Roychowdhury S, McMullen MR, Pritchard MT et al. An early complement-dependent and TLR-4-independent phase in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2009; 49(4):1326-1334.PM:19133650

10. Cohen JI, Roychowdhury S, McMullen MR, Stavitsky AB, Nagy LE. Complement and alcoholic liver disease: role of C1q in the pathogenesis of ethanol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology* 2010; 139(2):664-74, 674.PM:20416309

11. Pritchard MT, McMullen MR, Medof ME, Stavitsky A, Nagy LE. Role of complement in ethanol-induced liver injury. *Adv Exp Med Biol* 2008; 632:175-186.PM:19025122

12. Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* 2011; 141(5):1572-1585.PM:21920463

13. Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34(1):9-19.PM:15670660

14. Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation

10

20

30

40

50

in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997; 25(2):351-355.PM:9021946

15. Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Wakasa K. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J Hepatol* 2002; 37(1):56-62.PM:12076862

16. Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta* 1980; 620(2):281-296.PM:6254573

17. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9(6):515-540.PM:2079232

18. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(22):10721-10725.PM:1438268

19. Roychowdhury S, McMullen MR, Pritchard MT, Li W, Salomon RG, Nagy LE. Formation of gamma-ketoaldehyde-protein adducts during ethanol-induced liver injury in mice. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(11):1526-1538.PM:19616618

20. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(23):9383-9387.PM:2123555

21. Bertola A, Mathews S, Ki SH, Wang H, Gao B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat Protoc* 2013; 8(3):627-637.PM:23449255

22. Fessel JP, Hulette C, Powell S, Roberts LJ, Zhang J. Isofurans, but not F2-isoprostanes, are increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease and with dementia with Lewy body disease. *J Neurochem* 2003; 85(3):645-650.PM:12694390

23. Binder CJ. Naturally occurring IgM antibodies to oxidation-specific epitopes. *Adv Exp Med Biol* 2012; 750:2-13.PM:22903662

24. Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med* 2008; 263(5):479-488.PM:18410591

25. Lieber CS. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 1997; 38:601-628.PM:8895826

26. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health* 2003; 27(4):277-284.PM:15540798

27. Milne GL, Sanchez SC, Musiek ES, Morrow JD. Quantification of F2-isoprostanes as a biomarker of oxidative stress. *Nat Protoc* 2007; 2(1):221-226.PM:17401357

28. Ivester P, Roberts LJ, Young T et al. Ethanol self-administration and alterations in the livers of the cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31(1):144-155.PM:17207113

29. Raszeja-Wyszomirska J, Safranow K, Milkiewicz M, Milkiewicz P, Szyńska A, Stachowska E. Lipidic last breath of life in patients with alcoholic liver disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012; 99(1-2):51-56.PM:22706383

30. Konishi M, Iwasa M, Araki J et al. Increased lipid peroxidation in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic hepatitis C as measured by the plasma level of 8-isoprostane. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21(12):1821-1825.PM:17074020

10

20

30

40

50

31. Davies SS, Bodine C, Matafonova E et al. Treatment with a gamma-ketoaldehyde scavenger prevents working memory deficits in hApoE4 mice. *J Alzheimers Dis* 2011; 27(1):49-59.PM:21709376
32. Salomon RG. Isolevuglandins, oxidatively truncated phospholipids, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043:327-342.PM:16037255
33. Salomon RG, Subbanagounder G, O'Neil J et al. Levuglandin E2-protein adducts in human plasma and vasculature. *Chem Res Toxicol* 1997; 10(5):536-545.PM:9168251
34. Smathers RL, Galligan JJ, Shearn CT et al. Susceptibility of L-FABP-/- mice to oxidative stress in early-stage alcoholic liver. *J Lipid Res* 2013; 54(5):1335-1345.PM:23359610 10
35. Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 39(1):197-203.PM:14752838
36. Mottaran E, Stewart SF, Rolla R et al. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32(1):38-45.PM:11755315
37. Chedid A, Mendenhall CL, Moritz TE et al. Cell-mediated hepatic injury in alcoholic liver disease. Veterans Affairs Cooperative Study Group 275. *Gastroenterology* 1993; 105(1):254-266.PM:8514042 20
38. Lin F, Taylor NJ, Su H et al. Alcohol dehydrogenase-specific T-cell responses are associated with alcohol consumption in patients with alcohol-related cirrhosis. *Hepatology* 2013; 58(1):314-324.PM:23424168
39. Rao R. Endotoxemia and gut barrier dysfunction in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 50(2):638-644.PM:19575462
40. Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology* 2008; 48(4):1224-1231.PM:18792393
41. Soares JB, Pimentel-Nunes P, Roncon-Albuquerque R, Leite-Moreira A. The role of lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling in chronic liver diseases. *Hepatol Int* 2010; 4(4):659-672.PM:21286336 30
42. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249(4975):1431-1433.PM:1698311
43. Markiewski MM, Lambris JD. The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 2007; 171(3):715-727.PM:17640961
44. Li W, Laird JM, Lu L et al. Isolevuglandins covalently modify phosphatidylethanolamines in vivo: detection and quantitative analysis of hydroxylactam adducts. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(11):1539-1552.PM:19751823 40
45. Bykov I, Jauhiainen M, Olkkonen VM et al. Hepatic gene expression and lipid parameters in complement C3(-/-) mice that do not develop ethanol-induced steatosis. *J Hepatol* 2007; 46(5):907-914.PM:17321001
46. Bykov I, Junnikkala S, Pekna M, Lindros KO, Meri S. Complement C3 contributes to ethanol-induced liver steatosis in mice. *Ann Med* 2006; 38(4):280-286.PM:16754259
47. Kalant D, Cain SA, Maslowska M, Sniderman AD, Cianflone K, Monk PN. The chemoattractant receptor-like protein C5L2 binds the C3a des-Arg77/acylation-stimulating protein. *J Biol Chem* 2003; 278(13):11123-11129.PM:12540846 50

48. Schieferdecker HL, Schlaf G, Koleva M, Gotze O, Jungermann K. Induction of functional anaphylatoxin C5a receptors on hepatocytes by in vivo treatment of rats with IL-6. *J Immunol* 2000; 164(10):5453-5458.PM:10799912

49. Mack C, Jungermann K, Gotze O, Schieferdecker HL. Anaphylatoxin C5a actions in rat liver: synergistic enhancement by C5a of lipopolysaccharide-dependent alpha(2)-macroglobulin gene expression in hepatocytes via IL-6 release from Kupffer cells. *J Immunol* 2001; 167(7):3972-3979.PM:11564816

50. Zagol-Ikapitte I, Amarnath V, Jadhav S, Oates JA, Boutaud O. Determination of 3-methoxysalicylamine levels in mouse plasma and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to in vivo pharmacokinetics studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011; 879(15-16):1098-1104.PM:21489890

10

51. Davies SS, Brantley EJ, Voziyan PA et al. Pyridoxamine analogues scavenge lipid-derived gamma-ketoaldehydes and protect against H2O2-mediated cytotoxicity. *Biochemistry* 2006; 45(51):15756-15767.PM:17176098

52. Carithers RL, Jr., Herlong HF, Diehl AM et al. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann Intern Med* 1989; 110(9):685-690.PM:2648927

53. Lucey MR, Mathurin P, Morgan TR. Alcoholic hepatitis. *N Engl J Med* 2009; 360(26):2758-2769.PM:19553649

20

54. Mathurin P, Mendenhall CL, Carithers RL, Jr. et al. Corticosteroids improve short-term survival in patients with severe alcoholic hepatitis (AH): individual data analysis of the last three randomized placebo controlled double blind trials of corticosteroids in severe AH. *J Hepatol* 2002; 36(4):480-487.PM:11943418

55. Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S et al. A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004; 39(5):1390-1397.PM:15122768

56. Mathurin P, Abdelnour M, Ramond MJ et al. Early change in bilirubin levels is an important prognostic factor in severe alcoholic hepatitis treated with prednisolone. *Hepatology* 2003; 38(6):1363-1369.PM:14647046

30

57. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119(6):1637-1648.PM:11113085

58. De BK, Gangopadhyay S, Dutta D, Baksi SD, Pani A, Ghosh P. Pentoxifylline versus prednisolone for severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled trial. *World J Gastroenterol* 2009; 15(13):1613-1619.PM:19340904

59. Mathurin P, Louvet A, Duhamel A et al. Prednisolone with vs without pentoxifylline and survival of patients with severe alcoholic hepatitis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 310(10):1033-1041.PM:24026598

40

60. Albano E, Vidali M. Immune mechanisms in alcoholic liver disease. *Gene s Nutr* 2010; 5(2):141-147.PM:19809845

61. Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 39(1):197-203.PM:14752838

62. Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 39(1):197-203.PM:14752838

63. Cresci GA, Bush K, Nagy LE. Tributyrin supplementation protects mice f

50

rom acute ethanol-induced gut injury. Alcohol Clin Exp Res 2014; 38(6):1489-1501.PM:24890666

64. Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. Drug Metab Rev 2004; 36(3-4):511-529.PM:15554233

65. Perrot N, Nalpas B, Yang CS, Beaune PH. Modulation of cytochrome P450 isozymes in human liver, by ethanol and drug intake. Eur J Clin Invest 1989; 19(6):549-555.PM:2515975

66. Lieberman MA, Marks AD. Ethanol Metabolism. Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Wolters Kluwer; 2012.

67. Russell TD, Schaack J, Orlicky DJ et al. Adipophilin regulates maturation of cytoplasmic lipid droplets and alveolae in differentiating mammary glands. J Cell Sci 2011; 124(Pt 19):3247-3253.PM:21878492

68. Zagol-Ikapitte IA, Matafonova E, Amarnath V et al. Determination of the Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of Salicylamine, a Potent gamma-Ketoaldehyde Scavenger, by LC/MS/MS. Pharmaceutics 2010; 2(1):18-29.PM:21822464

69. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 2008; 22(3):659-661.PM:17942826

70. Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, MD, USA: U.S. Food and Drug Administration; 2005.

【図面】

【図 1】

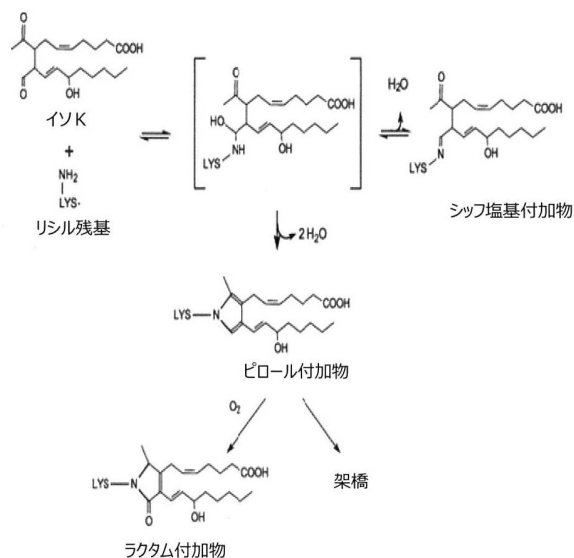


FIG. 1

【図 2】

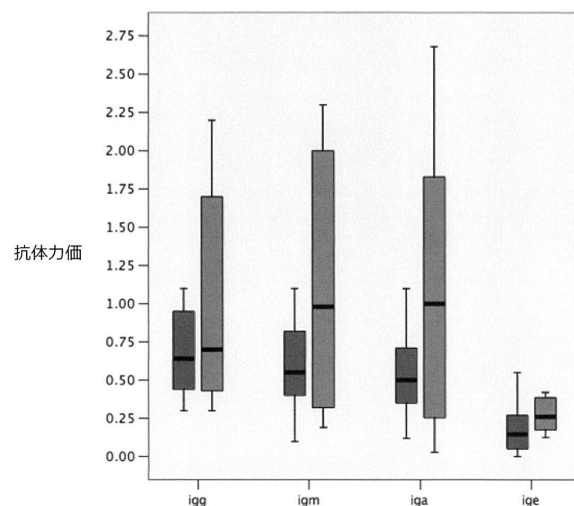


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 3】

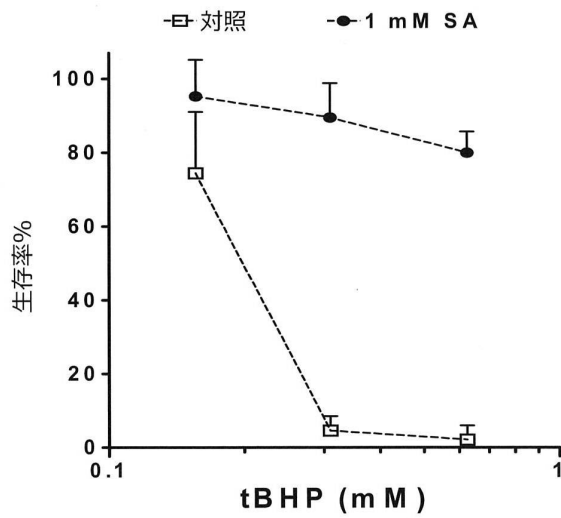


FIG. 3

【図 4】

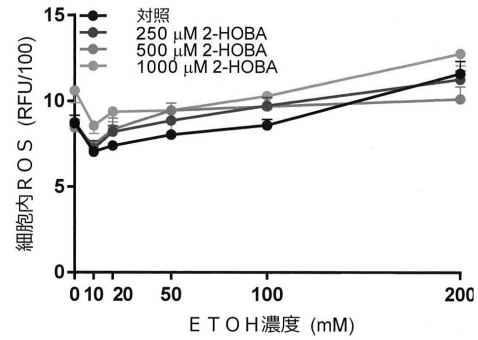


FIG. 4A

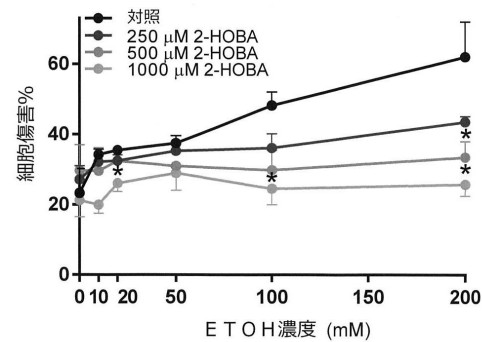


FIG.4B

【図 5】

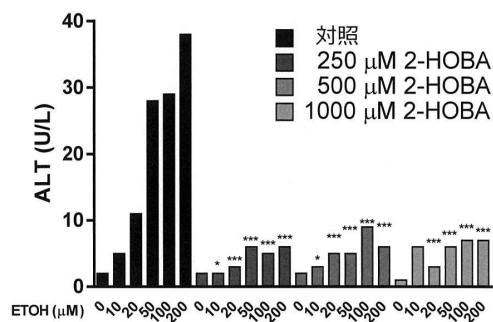


FIG. 5A

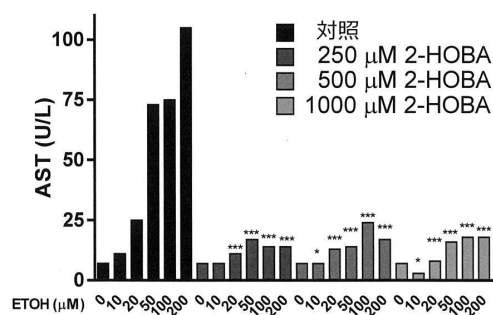


FIG. 5B

【図 6】

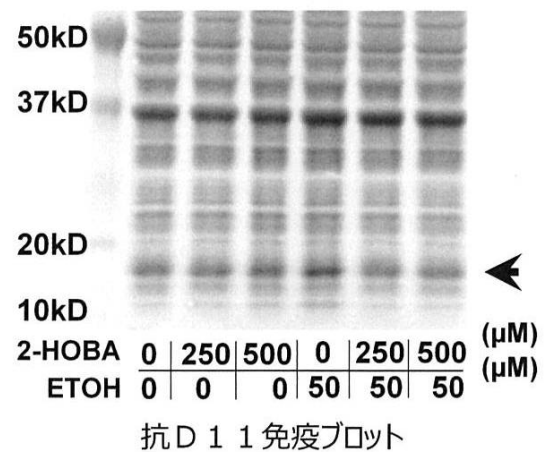


FIG. 6

10

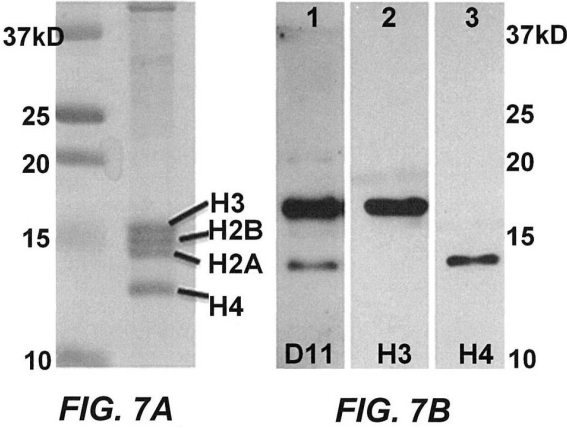
20

30

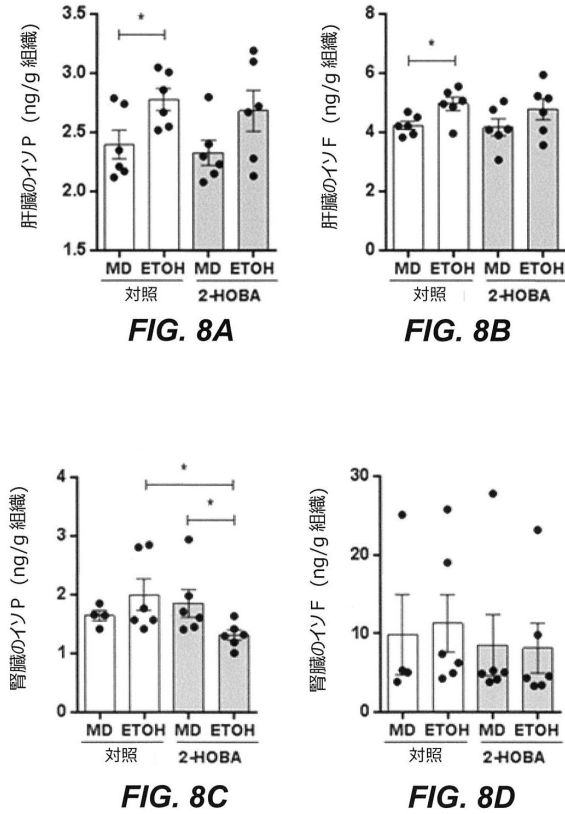
40

50

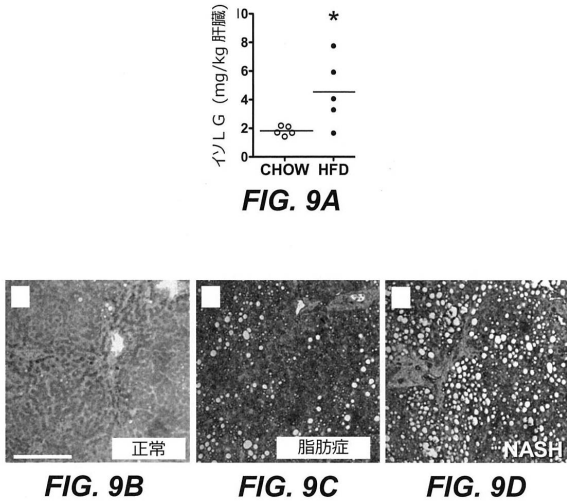
【 図 7 】



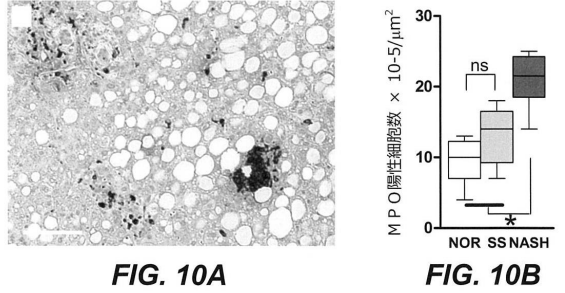
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



10

20

30

40

50

【図 1 1 - 1】

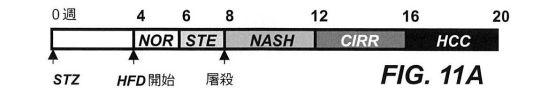


FIG. 11A

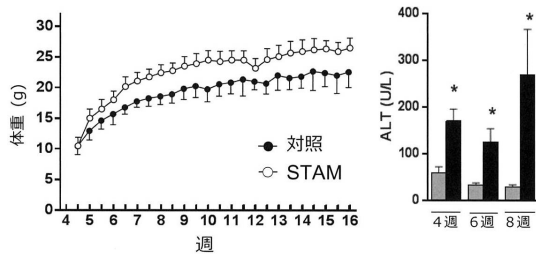


FIG. 11B

FIG. 11C

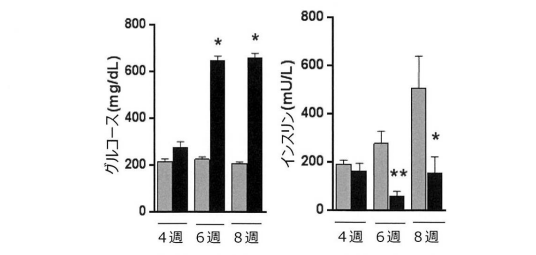


FIG. 11D

FIG. 11E

【図 1 1 - 2】

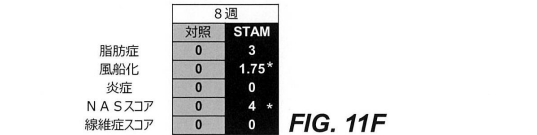


FIG. 11F

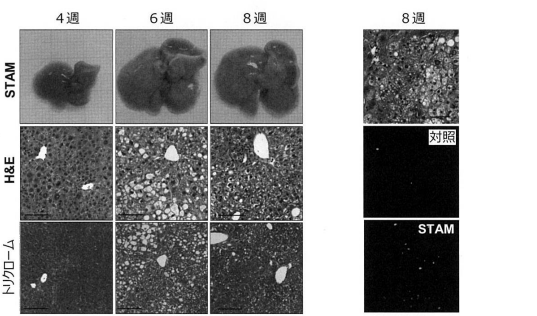


FIG. 11G

FIG. 11H

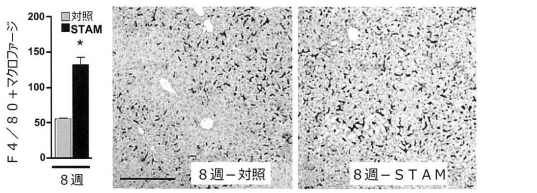


FIG. 11I

【図 1 2 - 1】

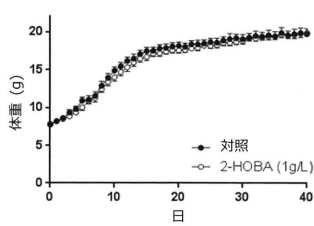


FIG. 12A

【図 1 2 - 2】

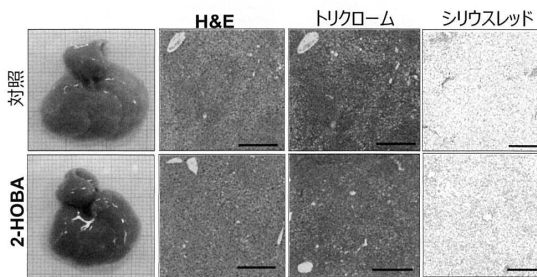


FIG. 12H

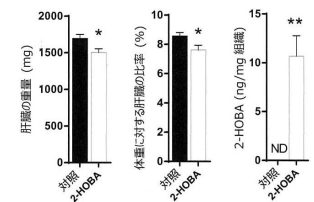


FIG. 12B

FIG. 12C

FIG. 12D

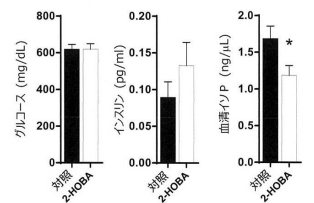


FIG. 12E

FIG. 12F

FIG. 12G

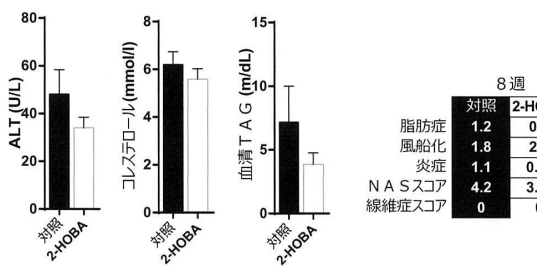


FIG. 12I

FIG. 12J

FIG. 12K

	8週 対照	8週 2-HOBA
脂肪症	1.2	0.7
風船化	1.8	2.0
炎症	1.1	0.3*
N A Sスコア	4.2	3.0*
線維症スコア	0	0

FIG. 12L

10

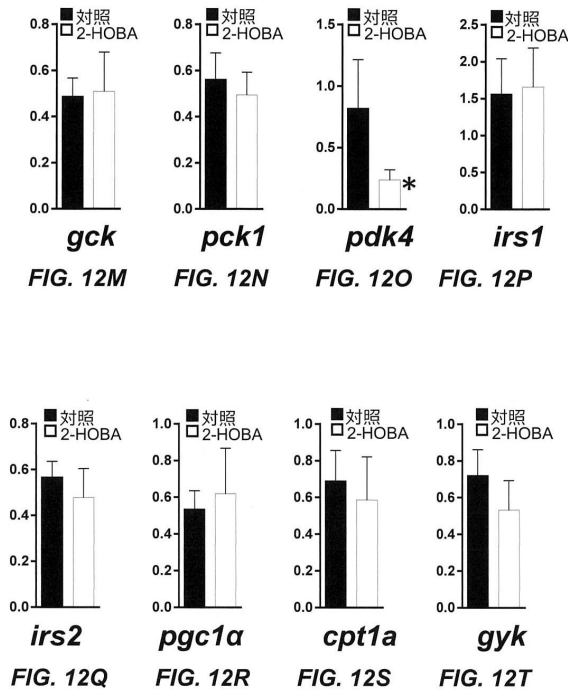
20

30

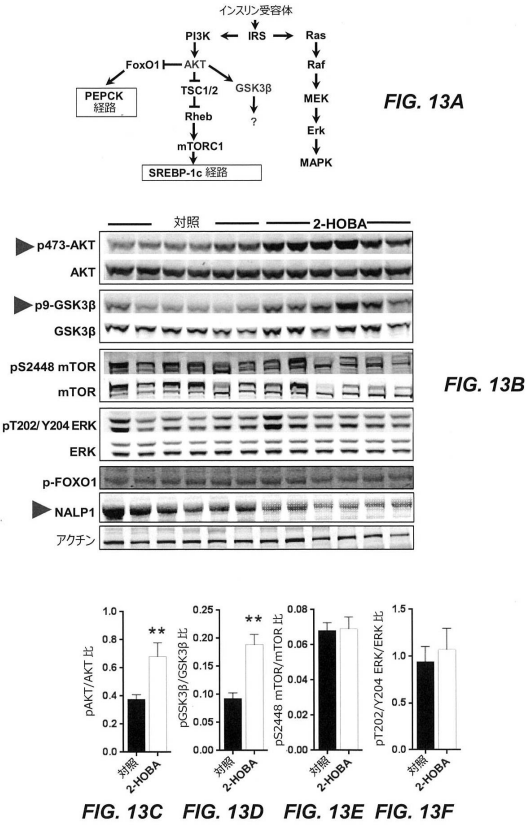
40

50

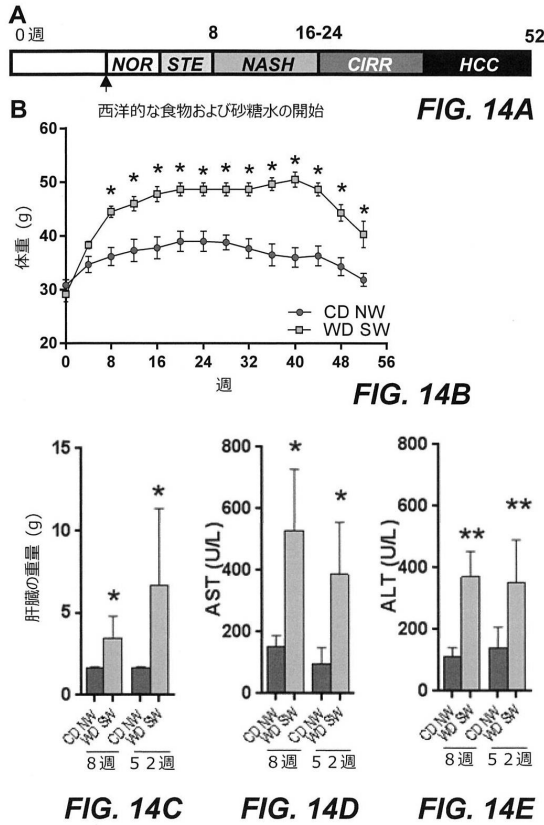
【図 1 2 - 3】



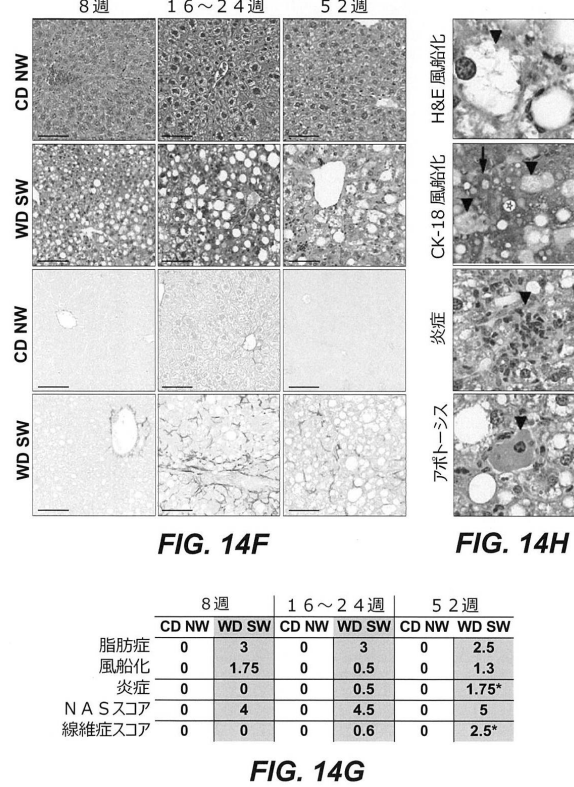
【図 1 3】



【図 1 4 - 1】



【図 1 4 - 2】



10

20

30

40

50

【図 15 - 1】

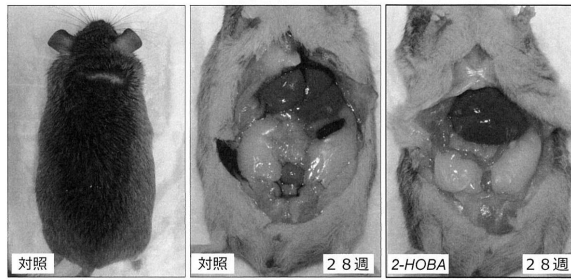


FIG. 15A

FIG. 15B

FIG. 15C



FIG. 15D

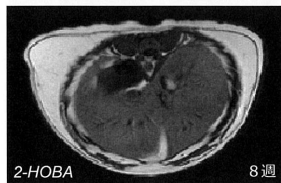


FIG. 15E

【図 15 - 2】

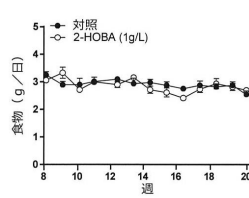


FIG. 15F

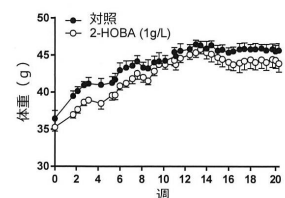


FIG. 15G

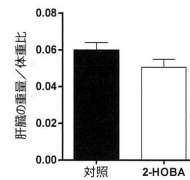


FIG. 15H

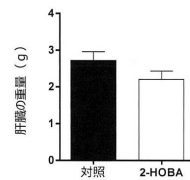


FIG. 15I

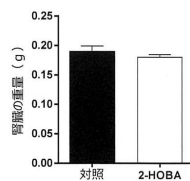


FIG. 15J

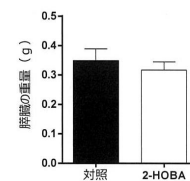


FIG. 15K

【図 16 - 1】

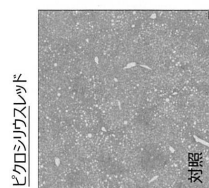


FIG. 16F

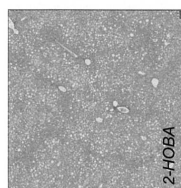


FIG. 16G

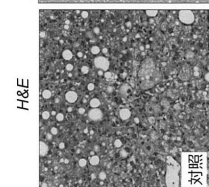


FIG. 16C

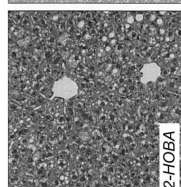


FIG. 16E

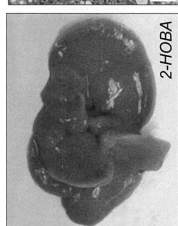


FIG. 16B

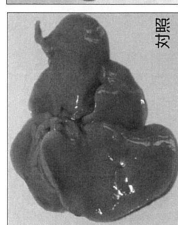


FIG. 16A

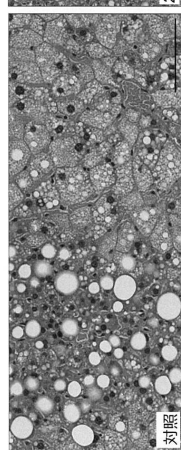


FIG. 16D

【図 16 - 2】

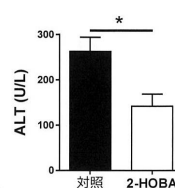


FIG. 16H

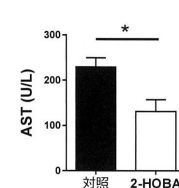


FIG. 16I

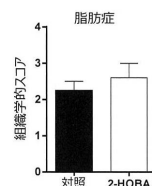


FIG. 16J

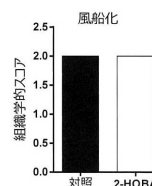


FIG. 16K

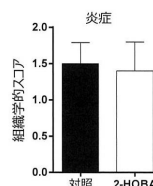


FIG. 16L

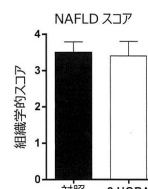


FIG. 16M

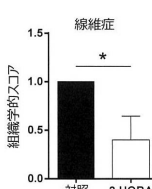


FIG. 16N

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(54)【発明の名称】 使用方法

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国アイオワ州 5 0 2 4 8 , ストーリー・シティ , グランド・アベニュー 7 1 9

(72)発明者 アブムラド , ナジ

アメリカ合衆国テネシー州 3 7 2 2 0 , ナッシュヴィル , トラベラーズ・コート 9 3 3

(72)発明者 フリン , チャールズ

アメリカ合衆国テネシー州 3 7 2 1 5 , ナッシュヴィル , ウッドモント・レーン 3 7 0 3

審査官 梅田 隆志

(56)参考文献 特表 2 0 1 4 - 5 2 4 9 1 8 (J P , A)

LONGATO, L. et al. , Hepatology , 2014年 , Vol.60, No.4(Suppl) , p.579A, Abstract No.785

GAENS, K.H.J., et al. , Journal of Hepatology , 2012年 , Vol.56, No.3 , pp.647-655.

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 1 / 1 3 7

A 2 3 L 3 3 / 1 0

A 6 1 P 1 / 1 6

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)