

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

**特表2007-529549
(P2007-529549A)**

(43) 公表日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00 4 C 037
A 61 P 3/04	(2006.01)	A 61 P 3/04 4 C 084
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00 1 1 1 4 C 086
A 61 K 31/5585	(2006.01)	A 61 K 31/5585
C 07 D 307/58	(2006.01)	C 07 D 307/58

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2007-504139 (P2007-504139)	(71) 出願人	506315804 ファスジェン・リミテッド・ライアビリティ・カンパニー F A S g e n , L L C アメリカ合衆国 2 1 2 2 4 メリーランド州 ボルチモア、ボストン・ストリート 2 4 0 O 番、ザ・ファクトリー・ビルディング
(86) (22) 出願日	平成17年3月18日 (2005.3.18)	(71) 出願人	398076227 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティー アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 1 8 、ボルチモア、ノース・チャールズ・ ストリート 3 4 0 0
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月16日 (2006.11.16)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/009069		
(87) 國際公開番号	W02005/089773		
(87) 國際公開日	平成17年9月29日 (2005.9.29)		
(31) 優先権主張番号	60/554,228		
(32) 優先日	平成16年3月18日 (2004.3.18)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】神経エネルギーバランスを変化させることによる摂食行動の制御

(57) 【要約】

肥満は、先進国および発展途上国において子供および成人に影響する、世界的な健康問題である。肥満はエネルギー代謝と食欲調節の両方の障害であり、エネルギーバランスの機能障害と理解することができる。出願人は、神経エネルギーバランスに影響する化合物を被験体に投与することによる、被験体による食物摂取を調節する手段を発見した。出願人は、AMPK、特に視床下部AMPK、の活性を標的とする化合物、特にAMPK活性化を阻害する化合物を被験体に投与することによる、被験体による食物摂取を調節する手段を発見した。出願人はまた、被験体の神経エネルギーバランスを増加させる化合物を被験体に投与することによって被験体の食欲を減少させることによる、被験体における体重減少を誘導する方法を発見した。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

AMPK活性に影響する化合物を被験体に投与することにより、食物摂取を調節する方法。

【請求項 2】

AMPKが視床下部AMPKである、請求項1の方法。

【請求項 3】

化合物がC75でない、請求項1の方法。

【請求項 4】

化合物がC75である、請求項1の方法。

【請求項 5】

化合物がAMPKを阻害する、請求項1の方法。

【請求項 6】

化合物がAMPKを刺激する、請求項1の方法。

【請求項 7】

被験体がヒトである、請求項1の方法。

【請求項 8】

被験体がヒト以外の哺乳類である、請求項1の方法。

【請求項 9】

被験体の神経エネルギーバランスを変化させる化合物を被験体に投与することにより被験体における食物摂取を変化させる方法。

【請求項 10】

化合物が被験体の神経エネルギーバランスを減少させる、請求項9の方法。

【請求項 11】

化合物が被験体の神経エネルギーバランスを増加させる、請求項9の方法。

【請求項 12】

被験体がヒトである、請求項9の方法。

【請求項 13】

被験体がヒト以外の哺乳類である、請求項9の方法。

【請求項 14】

化合物がC75でない、請求項9の方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】**

肥満は、先進国および発展途上国において子供および成人に影響する、世界的な健康問題である。肥満はエネルギー代謝と食欲調節の両方の障害であり、エネルギーバランスの機能障害と理解することができる。

【0002】

食欲および満腹の分子レベルでの理解が非常に進んでいるにもかかわらず、体重減少のための実際の治療は依然として理解困難である。C75、すなわち米国特許第5981575号（引用により本明細書に含まれる）において同定された合成脂肪酸合成酵素（FAS）阻害薬は、やせたマウス、食餌性肥満（DIO）マウスおよび遺伝性肥満（ob/ob）マウスにおいて深刻な体重減少および拒食症を引き起こす。国際特許出願PCT/US03/03839には、FAS阻害に加えて、C75がカルニチン・パルミトイльтランスフェラーゼ-1（CPT-1）活性も刺激し、脂肪酸酸化およびATPレベルを増加させることができることが記載されている。Kim, et al.が記載するように、脂肪酸代謝経路の酵素は、摂食行動を調節する視床下部ニューロンに高発現している（Am J Physiol Endocrinol Metab 283, E867-79 (2002)）。それゆえ、脂肪酸代謝における変化は、神経エネルギーの流れに影響し、エネルギー状態の変化を伝え、摂食行動の変化をもたらす。

【0003】

AMPK（AMP活性化プロテインキナーゼ）は栄養飢餓および虚血低酸素のような代謝スト

10

20

30

40

50

レスによって、また激しい運動のような生理学的プロセスによって活性化される。AMP/ATP比の増加、細胞内pHの減少、およびクレアチニン/ホスホクレアチニン比の増加は、AMPによるAMPKのアロステリックな活性化およびAMPKKによるAMPKのリン酸化を介して、AMPKを活性化する。

【0004】

活性化されると、AMPKはATP消費型生合成経路、例えば脂肪酸合成、のスイッチを切り、ATP生成型代謝経路、例えば脂肪酸酸化、のスイッチを入れてATPレベルを保持する。エネルギー感知と、筋肉におけるレプチンによる脂肪酸代謝の制御およびその調節との両者におけるAMPKの中心的役割から、AMPKは、C75および他の化合物により引き起こされる代謝の変化を中継する視床下部における代謝センサーの候補である。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

[発明の概要]

出願人は、神経エネルギーバランスに影響する化合物を被験体に投与することによる、被験体による食物摂取を調節する手段を発見した。

【0006】

出願人は、AMPK、特に視床下部AMPK、の活性を標的とする化合物、特にAMPK活性化を阻害する化合物を被験体に投与することによる、被験体による食物摂取を調節する手段を発見した。

20

【0007】

出願人はまた、被験体の神経エネルギーバランスを増加させる化合物を被験体に投与することによって被験体の食欲を減少させることによる、被験体における体重減少を誘導する方法を発見した。

【0008】

[図面の説明]

図1：食物摂取はC75、AICARまたは化合物 Cによる影響をうける。

(a) BALB/c 雄マウス(n=7-9)に2.5 μl RPMI、C75 (5または10 μg) 含有または不含、のいずれかのi.c.v.注射を施し、以下の「方法」に記載されるように食物摂取をモニターした。

30

(b) マウス(n=4-10)に2.5 μlの生理食塩水、AICAR (1または3 μg)含有または不含、のi.c.v.注射を施し、食物摂取をモニターした。

(c) 2.5 μlの生理食塩水、化合物 C (2または5 μg)含有または不含、のi.c.v.注射を受けたマウス(n=7-8)の食物摂取をモニターした。

(d) C75、AICARまたは化合物 Cのi.c.v.注射24時間後の体重変化(n=4-10)。

(e) 200 μlの媒体 (生理食塩水)または生理食塩水、化合物 C (10または30 mg/kg 体重)含有、をマウス(n=4-7)にi.p.投与した。

(f) 200 μlの媒体 (RPMI) またはC75 (10 mg/kg 体重)含有RPMIをマウス(n=4-9)にi.p.投与した。データは3つの実験から1つにした。*, p < 0.05 ; **, p < 0.01 ; ***, p < 0.001、媒体RPMIまたは生理食塩水処置と比較。

40

【0009】

図2：C75処置は視床下部AMPK のリン酸化を減少させる。

(a) 視床下部抽出物におけるリン酸化AMPK (1および2) および全AMPK (1および2) のレベルを、暗サイクルの開示時にC75 (5または10 mg) をi.c.v.注射した後様々な時間において、ウェスタンプロット解析により可視化した。

(c, e) 視床下部(c)または肝臓(e)の、C75 (10 mg/kg 体重)のi.p.注射後のリン酸化AMPK および全AMPK のレベル。組織サンプルはi.p.注射の1時間後に調製した(cおよびe)。

ウェスタンプロットの定量(図2a、cおよびe)は、コントロールと比較した、比(リン酸化AMPK /全AMPK)における倍差(fold-difference)を示す。リン酸化AMPK のためのシグナル検出の感度は、全AMPK より100倍高かった。

50

【0010】

図3：C75はまた、視床下部AMPK の絶食誘発リン酸化を減少させる。

- (a) リン酸化AMPK および全AMPK のレベルを、コントロール(不断給餌)および絶食マウスの視床下部において可視化した。食餌を暗サイクルの開始時(0時間)から24時間除去し、リン酸化および全AMPK のレベルを絶食後0時間、3時間および24時間に測定した。
- (b) グラフはウェスタンプロットの定量の倍差を示す(図3a)。
- (c) リン酸化および全視床下部AMPK のレベルを24 hr絶食マウスにおいて測定し、その後C75(10 mg/kg 体重)含有RPMIのi.p.注射を施した。組織サンプルはi.p.注射の1時間後に調製した。
- (d) グラフは、ウェスタンプロットの定量の倍差を示す(図3c)。

10

【0011】

図4：C75は視床下部ニューロンのATPレベルを変化させ、AICARはC75誘発拒食症とpAMPA レベルの減少との両方に拮抗する。

- (a) 初代視床下部ニューロンに20または40 mg/ml C75を30分および2時間処置した。ATPレベルを発光により評価し、非処置コントロール(-)の%として表した。データは3つの独立の実験から1つにした。*, p < 0.01、非処置コントロールと比較。
- (b) 食物摂取を、C75 i.p.注射(5mg/kg 体重)、その1時間後にAICAR(3 mg) i.c.v.注射を受けたマウス(n=10-12)について測定した。食物摂取は図1aに示したのと同じ時間間隔でモニターした。*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001、RPMI/生理食塩水またはC75/生理食塩水と比較。
- (c) 視床下部リン酸化および全AMPK のレベルを、図4bに示したのと同じ投与量にてi.p.RPMI/i.c.v.生理食塩水、i.p.RPMI/i.c.v.AICAR、i.p.C75/i.c.v.生理食塩水、またはi.p.C75/i.c.v.AICARを受けたマウスにおいて、ウェスタンプロットにより測定した。
- (d) グラフはウェスタンプロットの定量の倍差を示す(図4c)。

20

【0012】

図5：C75は弓状核におけるpAMPK 、NPYおよびpCREBの発現に影響する。

- (a) 弓状核におけるpAMPK の免疫組織化学、NPYのインサイトハイブリダイゼーション(4、5、6)、およびpCREBの免疫組織化学を、コントロール、C75処置(24時間)および絶食(24時間)マウスに由来する冠状脳切片を用いて行った。
- (b) ダブル蛍光インサイトハイブリダイゼーションによる、弓状核ニューロンにおけるAMPK 2(FITC)およびNPY(テキサスレッド)の共局在化。
- (c) i.c.v.生理食塩水またはAICAR(3 mg)を受けたマウス(各n=4)の視床下部神経ペプチドのmRNAレベルを、注射20時間後にノザン解析によって測定した。***, p < 0.001、生理食塩水コントロールと比較。
- (d) i.c.v.生理食塩水またはAICAR(3 mg)を受けたマウスの、注射20時間後の弓状核pCRE Bレベル(点線下)を示す。
- (e) AMPK活性を変化させ弓状核におけるCREB-NPY経路シグナル伝達を制御する、エネルギーの流れにおけるC75誘発変化のモデル。

30

【0013】

図6：図6は、神経エネルギーバランスの変化が摂食に影響するメカニズムの案を示す。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

図6に示すように、C75その他の化合物は摂食行動に影響しうる。例えば、ある種の化合物は、被験体に投与したときに、神経エネルギーバランスに影響しうる。神経エネルギーバランスは、神経細胞におけるAMP/ATP比により表すことができる。

【0015】

つまり、視床下部ニューロンにおけるATPレベルを増加させる化合物を投与すると、神経エネルギーバランスが減少し、被験体の食欲が減少する。化合物が視床下部ニューロンにおけるATPレベルを増加(または減少)させるかを測定することは難しくない。プロトコールの1つは以下である：ニューロンを氷上でTEバッファー(100 mM Tris および4 m

50

M EDTA) を用いて溶解し、プレートから除去すればよい。続いて、ATPレベルは直線範囲内でATP Bioluminescence Kit CLS II (Roche, Indianapolis, IN.)を用いて製造元のプロトコールにしたがい測定し、Perkin-Elmer Victor² 1420により結果を読みとればよい。

【 0 0 1 6 】

FAS阻害およびCPT-1刺激の能力により、C75は、末梢および皮質ニューロンと同様に視床下部ニューロンにおけるATPレベルを増加することができる。この変化が正のエネルギーバランスのシグナルを伝え、AMPK活性の減少をもたらし、その結果NPY発現を減少させる。絶食において、エネルギーが枯渇している場合、AMPKが刺激され、それによりCREB-N PY経路と食物摂取とが活性化される。正常な摂食中のリン酸化視床下部AMPKのレベルは比較的变化が少なく、視床下部pAMPKレベルが上昇するまでには食物摂取の減少の期間が長い必要があるようである。視床下部AMPKは、C75処置または絶食によるエネルギー状態における変化に応答するようである。つまり、AMPKはCNSにおける「燃料センサー」として機能する。

【 0 0 1 7 】

肥満の処置には手強い問題が残っている。本発明は、C75の作用の結果の1つがAMPK活性の変化であることを示す。C75の効果は絶食により誘発される合図よりも優位であり、ob/ob マウスにおける食物摂取さえも減少させることができることから、AMPKはマスター燃料センサーとして機能する。

【 0 0 1 8 】

AMPKを阻害する化合物も刺激する化合物も、食物摂取の調節に使用することができる。本発明の組成物は、ヒトその他の動物に投与するために単位投与形態にて提供することができ、それは例えば錠剤、カプセル、丸剤、粉末剤、顆粒剤、滅菌非経口溶液または懸濁液、経口溶液または懸濁液、好適な量の化合物を含有する水中油滴および油中水滴エマルジョン、坐剤および液体懸濁液または溶液である。本明細書で用いる場合、用語「医薬用希釈体」および「医薬用担体」は同義である。経口投与のため、固体または液体の単位投与形態のいずれも調製可能である。固体組成物、例えば錠剤を調製するため、化合物は常套的な成分と混合することができ、それは例えばタルク、ステアリン酸マグネシウム、第二リン酸カルシウム、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、硫酸カルシウム、デンプン、乳糖、アカシア、メチルセルロース、および医薬用希釈体または担体として機能的に同様の物質である。カプセルは、化合物を不活性な医薬用希釈体と混合し、この混合物を適當な大きさの硬ゼラチンカプセルに充填することによって調製する。軟ゼラチンカプセルは、化合物と許容される植物油、軽流動ワセリンまたは他の不活性油とのスラリーの機械封入によって調製する。

【 0 0 1 9 】

液体単位投与形態または経口投与形態、たとえばシロップ、エリキシルおよび懸濁液が調製可能である。これら形態を水性媒体に糖、芳香族系香料および保存剤とともに溶解して、シロップを作成することができる。懸濁液は、水性媒体を用いて、懸濁剤、例えばアカシア、トラガカント、メチルセルロースなどの補助のもと調製可能である。

【 0 0 2 0 】

非経口投与には、液体単位投与形態を、化合物と滅菌媒体とを利用して調製可能である。溶液の調製においては、化合物を注射用水に溶解し、濾過滅菌し、そして適當なバイアルまたはアンプルに充填し密閉すればよい。アジュバント、例えば局所麻酔薬、保存剤および緩衝剤を媒体に溶解してもよい。組成物をバイアルに充填後凍結して、水分を吸引により除去することができる。凍結乾燥粉末は、続いてバイアル中で計量し、使用前に再構成することができる。

【 0 0 2 1 】

治療の投与量および期間は、以下のような様々な因子に依存する：(1) 被験体の年齢、体重および臓器機能(例えば、肝臓および腎臓機能)；(2) 処置しようとする疾患過程の性質および程度、および何らかの既存の顕著な併存疾患および使用中の併用薬、および(3

10

20

30

40

50

) 薬物関連パラメーター、例えば投与経路、治癒に必要な投与頻度および期間、および薬物の治療インデックス。通常、投与量は、血清レベル1 ng/ml ~ 100 ng/mlを達成し、標的部位での有効濃度が約 1 μg/ml ~ 10 μg/mlに到達するよう選択される。

【0022】

以下の実施例により、限定することなく、特許請求する発明をさらに説明する。

【実施例】

【0023】

方法

動物

動物実験はすべて、Johns Hopkins University School of Medicine Institutional Animal Care and Use Committeeにより確立された、動物管理および使用のガイドラインにしたがって行った。

10

【0024】

雄BALB/cマウス(7-9週齢)は、Charles River Laboratoriesから購入し(そして、光を制御した環境(12時間明/12時間暗サイクル)にて飼育し(0200-1400hの明期))、標準的な研究用食餌および水を自由に摂取可能とした。絶食のため、暗サイクルの開始時から24時間食餌をケージから抜き取ったが、水は自由に摂取できるようにした。

20

【0025】

食物摂取の測定

マウスの脳の側脳室に、ブレグマ(Bregma)の0.6 mm尾側、正中線の1.2 mm外側、頭蓋表面下2.2 mmの深さにて、耐久性ステンレススチールカニューレを移植した。移植マウスを個々のケージで飼育し、示したi.c.v.およびi.p.注射に用いた。C75(RPMI1640(Gibco-BRL)に溶解)、AICAR(Toronto Research Chemicals Inc)(生理食塩水中)または化合物C(46)(FASgen, Inc.) (生理食塩水中)を、所望の投与量が容量2.5 μlにて投与できるようにi.c.v.注射し、一方コントロール群には媒体のみを施した。注射は暗期開始の直前に行い、食物摂取の測定は暗期開始後1時間(0-1時間の間隔)、3時間(1-3時間の間隔)および24時間(3-24時間の間隔)にて行った。C75 i.p./AICAR i.c.v.処置群には、暗期開始1時間前に5 mg/kg(体重)のC75(200 ml グルコース不含RPMI中)をi.p.注射し、続いて暗期開始直前に3 μg/2.5 μl(生理食塩水)のAICARをi.c.v.注射した。コントロール群には200 μl グルコース不含RPMIを消灯1時間前に与え、その後2.5 μlの生理食塩水を与えた。化合物C(10または30 mg/kg(体重))またはC75(10 mg/kg(体重))のi.p.投与の後、食物摂取を先と同じ時間に測定した。

30

【0026】

ウェスタンプロット解析

視床下部を、視交叉を吻方の、乳頭体を尾側の目印として、深さ2 mmにて解剖した。解剖した視床下部および肝臓組織を液体窒素で即座に凍結した。組織を200 μlの溶解バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM ショ糖, 5 mM ピロリン酸ナトリウム, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM ベンズアミジン, 50 μg/ml ロイペプチド, 50 μg/ml ダイズトリプシン阻害薬)にてホモジナイズした。SDS界面活性剤を最終濃度0.2%にて添加し、溶解物を5分間沸騰させた。上清を回収後、タンパク質濃度をBCA kit(Bio Rad)により測定した。AMPKのリン酸化は、4-15%勾配SDS-ポリアクリルアミドゲル上で抗リン酸化AMPK(1および2, Thr172)抗体(1:1000, Cell Signaling)を用いて測定した。抗AMPK抗体(1および2, 1:1000, Cell Signaling)をローディングコントロールとして使用した。

40

【0027】

初代視床下部ニューロン培養およびATP測定

視床下部をE17 Sprague-Dawleyラット(Harlan)から単離し、トリプシン(0.125%)-DNA(0.001%)溶液にて分離し、Landree, et al., J. Biol. Chem., 279, 3817-3827に記載のようにしてばらばらにした。細胞を 6×10^4 にてポリ-D-リジンコート化96ウェルプレート(Corning Inc.)に神経基礎培地(B27, 0.5 mM L-グルタミン, 1%ペニシリン-スト

50

レプトマイシン (Gibco-BRL) 添加) 中にて播種した。非神経細胞の増殖を抑制するため、細胞にシトシンアラビノシドフラノシド ($1\mu M$) を播種4日後に処置し、6-8日齢の細胞をATPについて評価した。視床下部ニューロンをTE (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 4 mM EDTA) に溶解し、ATPレベルを直線範囲内でATP BioLuminescence Kit CLSII (Roche) を用いて製造元の推奨に従い測定した。データはPerkin-Elmer Victor² 1420により解析した。

【0028】

RNAの調製およびノザンプロット解析

視床下部全RNAをTrizol試薬 (Gibco-BRL) を用いて精製し、ノザンプロット解析を $15\mu g$ の全RNAを用いてKim, et al, Am J Physiol Endocrinol Metab., 283, E867-879 (2002) に記載のように行った。RNAを、マウスAGRP (Genebank #U89486)、ヒトNPY (XM004941)、ラットCART(U10071)、およびマウスPOMC (AH005319)のクローン化プラスミドから作成したランダムプライム³²P標識DNAプローブとハイブリダイズさせた。ローディングコントロールとして、マウスGAPDH遺伝子に対するプローブと同じプロットで使用した。シグナルは、Image Analyzer (Molecular Dynamics) および Imagequant ソフトウェアを用いて定量した。

【0029】

免疫組織化学

浮遊脳切片を、Kim, et al, Am J Physiol Endocrinol Metab., 283, E867-879 (2002) に記載のように、Shimuzu-Albergeine, et al., J Neurosci 21, 1238-1246 (2001)に示される改変を加えて、調製した。自由浮遊切片をPBS (5% ヤギ血清, 0.1% BSA, 0.05% Triton-X100, 1 mM NaF含有) 中にて1時間室温でプロッキングし、抗リン酸化AMPK (1および2) 抗体 (1:100) または抗リン酸化CREB抗体 (1:500, Cell Signaling) とPBS (1% ヤギ血清, 0.1% BSA, 0.05% Triton-X100, 1 mM NaF含有) 中において一晩4度インキュベートした。シグナルはVectastain ABC kit (Vector)により可視化した。

【0030】

インサイトハイブリダイゼーション

アンチセンスDIG標識NPYリボプローブをNPY遺伝子 (XM004941)を含有するプラスミドから作成した。ハイブリダイゼーションおよび洗浄をKim, et al, Am J Physiol Endocrinol Metab., 283, E867-879 (2002)に記載のように行った。ダブル蛍光インサイトハイブリダイゼーションのため、AMPK 2 (FITC)についてはAMPK 2遺伝子を含有するプラスミド (pEBG 2、L. A. Wittersより供与) からDIG標識リボプローブを作成し、NPY (テキサスレッド)についてはビオチン標識リボプローブを使用した。FITC検出のため、ヒツジFITC結合抗DIG抗体 (1:50, Roche) とTNBバッファー (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, および0.5% プロッキング試薬) 中においてインキュベートした。テキサスレッド検出のため、ストレプトアビジン-テキサスレッド (1:50, Amersham Pharmacia)、ウサギ抗テキサスレッド抗体 (1:50, Molecular Probes)、ヤギビオチン結合抗ウサギIgG抗体 (1:50, Santa Cruz Biotechnology) およびストレプトアビジン-テキサスレッド (1:30) と順番にTNBバッファー中においてインキュベートした。

【0031】

画像の解析および定量

インサイトハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学の画像をAxiocam HRc デジタルカメラ (Carl Zeiss) を用いて可視化し、Improvision Openlab softwareを用いて画像を取得し、NIH Image program (Macro)により定量した。

【0032】

統計学的解析

データは、複数($n > 4$)の測定の平均±標準誤差で表す。特記無き限り、データはOne-way ANOVAで解析し、Dunnett事後テストにより処置サンプルとコントロールとを比較した。事後テストの相違は、*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ で統計学的に有意と判断した。AMPK活性の結果の解析のため(図5 C および D)、対応のない片側 t 検定を行って各時間点をコントロールサンプルとを比較した。

10

20

30

40

50

【0033】

初代皮質神経培養

皮質を、Dawson, et al. J Neurosci 13, 2651-2661 (1993)に記載されるように、E17 Sprague-Dawley rats (Harlan, Indianapolis, IN)から切除し、中程度のトリプシン処理および粉碎により分離した。細胞を、ポリ-D-リジンコート化プラスチック Nunclon 培養皿に、密度 5×10^5 細胞/cm² にて最小必須培地 (MEM) (ウマ血清、ウシ胎児血清、グルタミン、および抗生物質ゲンタマイシンおよびカナマイシン含有) 中にて播種した。細胞を各タイプの実験に必要とされる所望の容器に播種した：T-25 フラスコ、酸化アッセイ；6 ウェルプレート、ウェスタンプロット、SAMSペプチドアッセイ、およびHPLC解析；24 ウェルプレート、FASおよびCPT-1活性アッセイ；4 ウェルチャンバースライド、免疫細胞化学；および96 ウェルプレート、ATPレベルの測定および細胞生存率アッセイ。標準培養細胞にはシトシンアラビノシドを4日目に処置し、7-10日後にインビトロで試験した。グリア細胞が過剰増殖した培養物については、細胞にシトシンアラビノシドを処置せず、6日目に免疫細胞化学に使用した。薬物処置は、媒体またはC75 (RPMIに再懸濁)、；セルレニン (Sigma) (RPMIに再懸濁)；および5-(テトラデシルオキシ)-2 フロイック酸 (Furoic Acid) (TOFA) (100% DMSOに再懸濁) により行った。

10

20

30

40

【0034】

免疫細胞化学

皮質ニューロンを前述のように培養し、免疫細胞化学のため播種7日後に回収した。細胞を4% PFAおよび20% ショ糖で20分間4 にて固定し、0.2% Triton X-100 (PBS中) を10 分間4 で浸透させた。これら培養物は通常グリア細胞が1 % 未満なので、前記のようにグリアを過剰増殖させた培養物も調製し、グリアにおけるFASおよびAMPKの発現もより良く評価できるようにした。細胞をブロッキング溶液 (4%正常血清含有 PBS) 中において1時間4 でインキュベートした。以下の抗原に対する一次抗体をブロッキング溶液で希釈し、一晩4 インキュベートした：グリア細胞纖維性酸性タンパク質 (GFAP) (Chemicon International Temecula, CA) 1:1000；神経特異的チューブリン (NST) (Bacbo, Richmond VA) 1:1000；AMPK (1:500)；およびFAS (1:1000)。細胞を1時間室温にて、NSTおよびGFAP染色についてはFITC結合二次抗体と、FASおよびAMPK染色についてはローダミンと、インキュベートした。

【0035】

酢酸塩取り込みの測定

細胞を示した濃度の媒体またはC75により15分間馴化培地中にて前処置し、その後、Pizer, et al., Cancer Research 1996, 745-751 (1996)に記載のように、100 μM ³H 酢酸 (NEN) にてさらに1.75時間かけて標識した。液体をクロロホルム/メタノールにより抽出し、N₂下で乾燥し、液体シンチレーションカウンターを用いて計測した。

【0036】

ATP測定

ニューロンを氷上でTEバッファー (100 mM Trisおよび4 mM EDTA) を用いて溶解し、プレートから除去した。次いでATPレベルを直線範囲においてATP Bioluminescence Kit CLS II (Roche, Indianapolis, IN.) を用いて製造元のプロトコールにしたがい測定し、結果をPerkin-Elmer Victor² 1420にて読み取った。

【0037】

細胞生存率アッセイ

皮質ニューロンを示した時間示した投与量の薬物で処置し、生存率をLive/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Eugene, OR)を用いて測定した。細胞透過性非蛍光カルセインAM色素から強蛍光カルセイン色素への変換は、肝臓細胞における細胞内エステラーゼ活性により触媒され、Perkin-Elmer Victor² 1420を用いて吸光度を485 nm/535 nmにて検出することで測定される。

【0038】

HPLC

50

初代皮質ニューロン溶解物におけるアデニンヌクレオチドレベルは、Stocchi, et al., Anal Biochem 167, 181-190 (1987)に記載のように、HPLC解析により測定した。簡単に説明すると、6ウェルプレートの各ウェルを2 mlの氷冷PBSで洗浄し、70 μlの氷冷0.5 M K OHで溶解し、そして剥離した。140 μlのH₂Oを溶解物に添加し、氷上で5分間インキュベートし、次いで1 M KH₂PO₄を添加してpHを6.5に調節した。細胞溶解物をMicrocon YM-50遠心フィルターにて遠心し、後のHPLC解析のため-80°で保存した。使用したHPLCは、可変波長検出機付きAgilent 1100 LCであった。解析は、Chemstation A. 10.01 ソフトウェアを用いて行った。

【0039】

脂肪酸酸化の測定

脂肪酸酸化は、Watkins, et al., Arch Biochem Biophys, 289, 329-336 (1991)に記載のように測定した。簡単に説明すると、フラスコに接着した初代皮質ニューロンに、HAM-F10培地(10% FBS添加)中ににおいて、トリプリケートでC75を示した投与量、示した時間にて処置した。0.5 μCi/ml(20 nmol)の[1-¹⁴C]-パルミチン酸(Moravek Biochemicals, Brea, California)(-シクロデキストラン(10 mg/ml、10 mM Tris中)に懸濁)および2 μMカルニチンを、各処置の最後の30分間に添加した。フラスコに血清ストッパー(serum stopper)およびプラスチックセンターウェル(Kontes, Vineland, New Jersey)(ガラスマイクロファイバーフィルター(事前に10 μlの20% KOHに浸潤)を含む)を取り付けた。インキュベーション後、200 μlの2.6 N HC1O₄をフラスコに注射し、¹⁴CO₂を2時間37度で捕捉した。フィルターを除去し、液体シンチレーション計測により定量した。次いでフラスコの内容物を200 μlの4N KOHで加水分解し、H₂SO₄にて中和した。水溶性生成物をHCl₃/MeOHおよびH₂Oを用いて抽出し、液体シンチレーション計測により定量した。脂肪酸酸化の全量は¹⁴CO₂および水溶性生成物の添加により得て、%コントロールとして、または特異的活性(nmol/hr/mg)として表した。

【0040】

グルコース酸化の測定

グルコース酸化アッセイは、Rubi, et al., Biochem J364, 219-226 (2002)による研究に基づいた。フラスコに接着したニューロンを、C75によりトリプリケートで、示した投与量、示した時間にて、Krebs-RingerビカルボナートHEPESバッファー(KRBHバッファー: 135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 0.5 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 5 mM NaHCO₃および10 mM HEPES)(1% BSAおよび10 mM D-グルコース含有)中にて処置した。0.5 μCi/ml [U-¹⁴C]-グルコース(NEN)を各処置の最後30分間添加し、フラスコを脂肪酸酸化アッセイに記載のようにセットした。反応を7%過塩素酸をフラスコに注射して停止させ、次いで400 μlのベンゼトニウムヒドロキシドをそのセンターウェルに注射した。37°2時間の後、全酸化をセンターウェルの¹⁴CO₂の量を液体シンチレーション計測により測定することによって定量し、%コントロールまたは特異的活性(pmol/hr/mg)として表した。

【0041】

CPT-1活性の測定

CPT-1活性は、Sleboda, et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1436, 541-549 (1999)に記載のようにジギトニン透過化を用いて測定した。薬物および媒体コントロールは、各実験について示したように添加した。2時間後、培地を除去し、細胞をPBSで洗浄し、700 μlのアッセイ培地(50 mM イミダゾール, 70 mM KCl, 80 mM ショ糖, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM KCN, 1 mM ATP, 0.1% 脂肪酸不含ウシ血清アルブミン, 70 μM パルミトイール-CoA, 0.25 μCi [メチル-¹⁴C]L-カルニチン(Amersham Pharmacia, Biotech, Piscataway, NJ), 40 μg ジギトニンからなる、100 μM マロニル-CoA含有または不含)とともにインキュベートした。37°6分のインキュベーション後、反応を500 μlの氷冷4M過塩素酸を添加して停止させた。次いで細胞を回収し、13,000 × gで5分間遠心分離した。ペレットを500 μlの氷冷2 mM過塩素酸で洗浄し、再び遠心した。得られたペレットを800 μlのdH₂Oに再懸濁し、400 μlのブタノールで抽出した。ブタノール層を、これはアシルカルニチン誘導体を表すが、液体シンチレーション計測により測定した。

10

20

30

40

50

【0042】

AMP活性化プロテインキナーゼ活性の測定

AMPK活性は、Witters, et al., J Biol Chem 267, 2864-2867 (1992)に記載のように、SAMSペプチドアッセイを行うことで測定した。6ウェル培養皿に播種されたニューロンを350 µl/ウェルのTritonX-100溶解バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 250 mM ショ糖, 50 mM NaF, 5 mM NaPPi, 1 mM ジチオスレイトール, 50 µg/ml ロイペプチド, 0.1 mM ベンズアミジン, および50 µg/ml トリプシン阻害薬) にて溶解した。各条件につき3ウェルを保存し、AMPK をプロテインA/Gビーズ結合抗AMPK (2-20)抗体 (Santa Cruz, CA)の存在下で免疫沈降した。次いで免疫沈降物を洗浄し、4X アッセイバッファーに再懸濁し、そして合成SAMSペプチド基質であるHMRSAMSGLHLVKRR (Princeton Biomolecules)への³²Pの取り込みを測定(20分間30')することによりキナーゼ活性を評価した。サンプルをP81ホスホセルロース紙にスポットし、十分に洗浄し、Cerenkov計測により定量した。各サンプルをタンパク質濃度を調べるために回収し、%コントロールまたはpmol/分/mgとして示した。

【0043】

電気生理学およびmEPSC解析

ホールセルパッチクランプ記録を、インビトロ14-21日目において皮質培養物について行なった。AMPA媒介mEPSCを単離するため、ニューロンを継続的に人工脳脊髄液 (aCSF) により流速<1 ml/分にて還流した。aCSFの組成は以下のとおりである(mMで表示) :150 NaCl, 3.1 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 0.1 DL-APV, 0.005 ストリキニーネ, 0.1 ピクロトキシン, および0.001 テトロドトキシン (TTX)。aCSFの浸透圧は305-310に、pHは7.3-7.4に調節した。細胞内生理食塩水は以下から構成される(mMで表示) :135 CsMeSO₄, 10 CsCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 2 MgCl₂, 4 Na-ATP, および0.1 Na-GTP。この生理食塩水は290-295 mOsm、pH 7.2に調節した。

【0044】

ホールセル記録の配置が完成したら、ニューロンをボルテージクランプし、全体を通して受動性をモニターした。記録中にRsまたはRiの変化が15%を超えた場合には、そのデータをセットから除去した。mEPSCは、Axopatch 200B 増幅装置 (Axon Instruments, Union City, CA) (2 kHzにてフィルター、5 kHzにてデジタル化) を通して取得した。スイープ (sweep) (20秒) (待ち時間0(zero latency)) を充分な数のイベントが記録されるまで(最低5分)取得した。データは細胞が安定した1-2分後にのみ連続的に記録した。mEPSCは、MiniAnalysis (Synaptosoft Inc, Decatur, GA) を用いて振幅閾値を RMS * 3 (通常4 pA)にセットし手動で検出した。ニューロンから最低100イベントを収集したら、振幅、周波数、立ち上がり時間(ピークまでの時間)、減衰時間(10%-90%)および受動性を測定した。すべての電気生理学的実験において、同様の量のデータ(n)を各実験群(すなわちDMSO、薬物)から取得した。次いで、各群のデータを平均し、統計学的有意差をスクレーデントTテストにより決定した。データは、再利用、すなわちある実験群から別の群へ移行させることはしなかった(DMSOコントロールは除く)。

【0045】

実施例 1

摂食行動はC75、AICARまたは化合物 Cの処置により変化する

マウスに脳室内(i.c.v.)カニューレを移植し、暗期開始時にC75を投与した後に食物摂取を測定した(図1a)。マウスはすべてこの24時間サイクル中は自由に食餌を摂取できる状態(不断給餌)であった。C75は、1-3および3-24時間の間に用量依存的に有意に食物摂取を減少させた(図1a)。5および10 mgのC75を注射すると、24時間で食物摂取がそれぞれ20.3% (p<0.05)および37.7% (p<0.01) 減少した。10 µgの投与量でも体重の減少が見られた(図1d)。これらの結果は、C75が中枢機構を介して食物摂取を減少させることを示す。

【0046】

AICAR(5-アミノイミダゾール-4-カルボキサミド-1-b-D-リボフラノシド)は、AMPK活性

10

20

30

40

50

を刺激する化合物であるが、細胞内に取り込まれリン酸化されてZMPを形成し(参照 : Sabina, et al., J Biol Chem, 260, 6107-14 (1985))、ここで、ZMPはAMPK活性に対するAMPの作用を模倣する(参照 : Sullivan, J. E., et al., FEBS Lett 353, 33-6 (1994))。C75による摂食阻害とは反対に、AICARのi.c.v.投与により食物摂取が増加した。投与量3μgで食物摂取が1時間以内に230% (p<0.01)、3-24時間で135% (p<0.01) 増加し、24時間合計の食物摂取はコントロールの130% (p<0.05) に増加した(図1 b)。この食物摂取の増加にもかかわらず、このAICARの単回投与では体重に有意な効果が見られなかった(図1 d)。Abu-Elheiga, L., et al. (Science, 291, 2613-6(2001))に報告されるように、体重は常に食物摂取に比例して変化するわけではない。以前の報告によると、慢性的な4週間のAICARの皮下注射 (1 g/kg 体重) では食物摂取にも体重にも影響がなかったが、(Winder, W. W., et al., J Appl Physiol 88, 2219-26((2000)))、脂肪体量の減少と肝臓重量の増加が見られた。つまり、AICARの単回i.c.v.投与は、食物摂取は増加するが体重は変化しないように、これら末梢組織の重量に影響するのかもしれない。

【 0 0 4 7 】

AMPKの食物摂取に対する効果を確認するため、選択的AMPK阻害薬である化合物 C、(Zhou, G., et al., J Clin Invest 108, 1167-74 (2001))を使用した。5 mgの化合物 Cのi.c.v.注射により、36.2%、37.8%および35.6%の食物摂取の減少が、それぞれ0-1、3-24時間および24時間合計で起こった(図1 c)。この投与量の化合物 Cは体重減少をもたらした(図1 d)。興味深いことに、AICARの摂食刺激効果と同様に、化合物 Cの摂食阻害作用は0-1時間および3-24時間で強かった。化合物 Cの腹腔内 (i.p.) 注射によっても同様の食物摂取の減少が見られ(図1 e)、より高い投与量 (30 mg/kg 体重) によりすべての時間間隔において食物摂取が減少することが示された (0-1、1-3、3-24および合計で、それぞれコントロールの27.4%、3.68%、65.7%および57.8%)。AICARまたは化合物 Cが無視できないさらなる細胞効果を有する可能性はあるが、AMPK活性化薬および阻害薬を用いて得られた食物摂取に対する相反する結果は、AMPKが摂食行動に関与することを示す。AMPK活性化における変化に対するC75の中枢効果と末梢効果とを比較し、かつC75処置とAICAR処置を組み合わせるために設計されたさらなる実験に、C75についてi.p.投与経路を利用する目的で、C75のi.p.投与の作用のタイムコースを測定した。C75のi.p.投与 (10 mg/kg 体重) により、測定したすべての間隔において食物摂取が劇的に減少した(コントロールの8.3%、23.3%および30.1%、それぞれ0-1、1-3および3-24時間)(図1 f)。24時間の食餌消費の合計は、コントロールの26.3%まで有意に減少した (p<0.001)。C75の食物摂取に対する効果はより顕著であり、化合物 Cよりも長く持続した。C75の末梢投与後の食物摂取に対する効果の方が大きいことは、この経路を介して投与できる量がより大きいこと、またはi.c.v.経路の投与と比較してさらなる末梢効果があることを反映しているのかもしれない。

【 0 0 4 8 】

まとめると、これらの結果は、C75および化合物 Cは (i.c.v.投与またはi.p.投与のいずれも)、AICARのi.c.v.投与と比較して食物摂取に対して相反する効果をよく似たタイムコースでもたらすことを示す。

【 0 0 4 9 】

実施例 2

C75は視床下部AMPKのリン酸化を減少させる

視床下部は、エネルギーバランスのモニターおよび食物摂取に影響する末梢シグナルの統合に重要な役割を果たす。脳におけるAMPKの発現は報告されているが、脳におけるその機能は知られていないかった。C75は、FASを阻害し、-酸化のためパルミテートをミトコンドリア内に取り込む酵素であるカルニチンパルミトイльтランスフェラーゼ-1 (CPT-1)を刺激する。これらの作用はいずれも、視床下部のニューロンにおける正のエネルギーバランスのシグナルを伝えることができ、それは視床下部AMPKを不活性化しうる。視床下部AMPK活性に対するC75の効果を調べるために、その活性と一致するAMPKの触媒サブユニットのリン酸化(pAMPK)のレベルに対するC75処置の効果を調べた(図2)。

10

20

30

40

50

【0050】

マウスに媒体、 $5\mu\text{g}$ または 10 mg のC75 i.c.v.を施し、視床下部pAMPK のレベルをウェスタンプロットにより測定した。AMPK (1および 2サブユニット) のレベルがローディングコントロールの役割を果たした。媒体処置コントロール動物におけるpAMPK のレベルと比較して、C75は、視床下部におけるpAMPK (1および 2)のレベルを30分および3時間にそれぞれ3および6倍減少させた (図 2 a、 b)。C75の中核投与で見られたように、C75のi.p.注射 (10 mg/kg 体重) により、視床下部におけるpAMPK のレベルは30分および3時間で有意に減少した (図 2 c、 d)。これに対して、C75は、肝臓pAMPK レベルに投与後30分ではほとんど効果を示さず、一方3時間ではpAMPK レベルを増加させた (図 2 e、 f)。これらの結果は、C75が視床下部におけるAMPK活性を迅速に減少させることを示す。視床下部pAMPK レベルの減少は、エネルギー消費を減少させ好ましいエネルギーバランスのシグナルを伝えるFAS阻害の結果として生じる代謝変化に起因しうる。これらの結果はまた、AMPKのリン酸化は、視床下部では肝臓とは異なるようにC75に応答して調節されることを示す。この相違は、ニューロンおよび肝臓において見られる代謝経路またはこれら経路を通る流れの相違を反映している可能性が高い。3時間までに、C75処置により見られる食物摂取の減少が、肝臓においてエネルギー不足状態のシグナルを伝え (図 2 e)、AMPK活性化をもたらしている可能性があり、このことは、例えば脂肪酸酸化の刺激を介してエネルギーレベルを保存する試みを示唆する。

【0051】

C75は絶食誘発視床下部AMPKリン酸化を減少させる

AMPK活性は、絶食ラット肝臓において上昇することが知られている。視床下部AMPKが絶食に応答するかを調べるために、不断給餌マウスにおいて暗サイクルの開示時に食餌を除去した後、pAMPK レベルをモニターした。食餌除去の3時間以内ではpAMPK レベルに変化はなかった (図 3 a、 b)。しかしながら、24時間の絶食により、視床下部pAMPK レベルは2倍に刺激された (図 3 a、 b)。Davies, et al. (FEBS Lett, 377, 421-5(1995))は、1つの時点 (6時間目) でしか調べておらず、この測定を行う前の間隔における給餌プロファイルは一致していないが、不断給餌ラットにおいて暗および明サイクルの間でAMPK活性に相違がないことを指摘した。本発明者らの結果は、視床下部AMPKの活性化が絶食誘発食物摂取刺激に関与しうることを示す。

【0052】

次に、C75がAMPKリン酸化の増加する絶食条件下においてAMPKリン酸化を減少しうるかについて調べた。これは、C75が絶食マウスにおいても摂食を阻害するので、C75誘発FAS阻害とAMPK活性の間のつながりを確立するのに重要である。24時間の絶食の後、媒体 (RP MI) またはC75のいずれかをi.p.投与し、視床下部pAMPK のレベルを測定した。C75処置により、pAMPK のレベルは、コントロールと比較して著しく減少した (図 3 c、 d)。C75が絶食マウスにおいても食物摂取を抑制するという本発明者らの観察から考えると、C75がpAMPK のレベルを絶食マウスにおいて減少させる能力は、C75がAMPK仲介機構により摂食を阻害する可能性を支持する。

【0053】

C75は視床下部ニューロンのATPレベルを増加させる

C75は3T3-L1脂肪細胞およびさらに初代皮質ニューロンにおけるATPレベルを増加させることができている。AMP/ATP比の増加がAMPKを活性化することは知られているので、本発明者らは、視床下部ATPレベルのC75誘発増加がAMP/ATPの減少に寄与し、視床下部AMPK活性の減少をもたらすと仮定した。

【0054】

視床下部ニューロン初代培養を 40 mg/ml のC75で処置すると、ニューロンのATPレベルが30分および2時間でそれぞれコントロールの118および128%に有意に増加した (図 4 a)。C75処置は、初代皮質ニューロンにおけるATPレベルにも同様の変化を引き起こし、AMP/ATP比の減少およびAMPKの不活性化をもたらした。それゆえ、C75により生じたATPの増加もまた視床下部におけるAMPK活性の減少に寄与したと考えられる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

AICARはC75の食欲抑制作用に拮抗し視床下部AMPKリン酸化を増加させる

AICARがC75誘発食物摂取減少に拮抗しうるかを調べるために、暗サイクル開始1時間前にマウスを媒体またはC75 (5 mg/kg 体重) i.p. にて処置し、1時間後に媒体またはAICAR (3 mg)をi.c.v. 注射した(図4 b)。C75により、食物摂取は1時間でコントロール(RPMI/生理食塩水)の37.5%まで減少した(p<0.01)。これに対して、AICAR処置により、食物摂取は1時間でC75/生理食塩水処置の346%まで増加した(p<0.001)。AICAR処置はC75誘発拒食症に拮抗し、食物摂取はコントロール媒体処置マウスと同程度になった。C75処置マウスに対するAICARの効果は持続時間が限られており、AICARの代謝と一致した。3-24時間の間の食物摂取に対して効果がなかったことは、C75とAICARの相反する作用の正味の効果を表しているのかもしれない。AICARによるC75介拒食症の拮抗にAMPK活性の変化が関与するならば、AICARは同様にC75処置により起こる視床下部pAMPK のレベルの減少に拮抗するはずである。不断給餌マウスに、i.p. 注射を、続いて1時間後にi.c.v. 注射を、以下のように施した: i.p. RPMIおよびi.c.v. 生理食塩水; i.p. RPMIおよびi.c.v. AICAR; i.p. C75 およびi.c.v. 生理食塩水; ならびにi.p. C75およびi.c.v. AICAR (図4 c)。視床下部組織はi.c.v. 注射の30分後にウェスタンプロット用に準備した(図4 c, d)。低レベルのpAMPK が媒体処置マウスにおいて検出され、これはAICAR処置動物において増加した(図4 c, d)。C75 i.p. および生理食塩水 i.c.v. を受けたマウスは、pAMPK レベルの著しい減少を示した。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

C75処置後のAICAR処置は、視床下部pAMPK レベルのC75誘発減少に完全に拮抗した。閾値より低い投与量は行動データでのみ使用したが、AICARが行動とAMPKリン酸化状態の両方におけるC75誘発変化を抑制するという事実は、C75とAICARの効果のための作用部位が共通することを支持する。これらの結果は、AICARがC75誘発拒食症とC75誘発AMPK活性抑制の両方を回復させることを示す。

【 0 0 5 7 】

C75は弓状核ニューロンにおけるpAMPK、pCREBおよびNPY発現を変化させる

AMPKは細胞代謝を敏感に調節し、また常時遺伝子発現を調節する。視床下部におけるAMPKリン酸化状態の変化が弓状核におけるpAMPK レベルを反映するのかを確かめるため、弓状核を含む冠状脳切片を用いてpAMPK に対する免疫組織化学を行った(図5 a 1 - 3)。pAMPK は不断給餌マウスの弓状核において検出され(図5 a 1)、また免疫染色はリン酸化AMPK ペプチドで事前に吸収することでうまく阻害された(データ非提示)。コントロールと比較して、pAMPK 免疫活性は、24時間絶食マウスの弓状核においてコントロールの171%まで増加した(図5 a 3)。pAMPK 免疫活性は、C75処置マウスにおいて、食物摂取を減少させた条件下においても、コントロールの12%まで減少した(図5 a 2)。これらの変化はウェスタンプロットデータ(図2 a, c)と一致し、C75が弓状核におけるpAMPK レベルを減少させることが確認された。

【 0 0 5 8 】

本発明者らは以前にノザンプロット解析によりC75が視床下部NPY発現を減少させることを示している(4,9)。本発明者らは次に、弓状核におけるpAMPK の減少がC75処置により起こるNPYの変化と一致するかについて調べた。弓状核内のニューロンにおけるNPY発現を、コントロール、C75処置および絶食マウスにおいて測定した(図5 a 4 - 6)。以前の視床下部組織のノザンプロット解析(9)と一致して、NPY mRNA発現は、C75処置マウスの弓状核においてコントロールの66%まで下方調節され(図5 a 5)、絶食マウスにおいてコントロールの140%まで上方調節された(図5 a 6)。cAMP-CREB経路が絶食条件下においてNPY発現を仲介することが知られており(37, 38)、レブチンがこの経路を介してNPY遺伝子発現を調節することが示唆されている(38)。C75処置により起こるNPYの下方調節に関与する経路を明らかにするため、弓状核におけるpCREBレベルを測定した(図5 a 7 - 9)。既報のように(38)、24時間の絶食により、弓状核におけるpCREB免疫活性はコントロールの197%まで増加した(図5 a 9)。これに対して、C75はpCREBのレベルをコントロールの39%

まで減少させ(図5a~8)、このことは、C75によって起こるNPY遺伝子発現の減少はpCREBレベルの減少により仲介されるという仮説と一致する。弓状核におけるAMPKとNPYの共局在化を明らかにするため、ダブルインサイツハイブリダイゼーションを行った(図5b)。AMPK mRNAを発現する弓状核におけるニューロンの亜集団はNPYmRNAも発現していた(図5b)。NPYとCREBは弓状核におけるニューロンに共局在することが知られている。これらの結果は、AMPK、NPYおよびCREBが弓状核内のニューロンの亜集団に共発現することを示し、AMPKがCREBリン酸化を調節してNPY発現に影響するという仮説を支持する。

【0059】

C75に対して、AICARは相反する効果を有していた(図5c、d)。つまり、AICARが摂食を刺激した本発明者らの知見と一致して、AICARは視床下部のNPY発現をi.c.v.投与の20時間後に有意に増加させた(図5c)。AICAR処置により見られるNPY発現の増加は、図1bにおいて後期(3-24時間)に見られる食物摂取の刺激を仲介するのかもしれない。AICAR処置によるNPY発現の変化は5時間以内には検出されなかつたので(データ非提示)、摂食における初期(0-1時間)の変化は、NPY遺伝子発現非依存機構によって仲介されると考えられる。AICARはまた、弓状核におけるpCREBレベルをコントロールの231%まで増加させ(図5d)、このことはAMPKがCREBリン酸化を調節することを支持する。

10

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】食物摂取はC75、AICAまたは化合物Cによる影響をうける。

20

【図2】C75処置は視床下部AMPKのリン酸化を減少させる。

【図3】C75はまた、視床下部AMPKの絶食誘発リン酸化を減少させる。

【図4】C75は視床下部ニューロンのATPレベルを変化させ、AICARはC75誘発拒食症とpAMP Aレベルの減少との両方に拮抗する。

【図5】C75は弓状核におけるpAMPK、NPYおよびpCREBの発現に影響する。

【図6】図6は、神経エネルギーバランスの変化が摂食に影響するメカニズムの案を示す。

【図1】

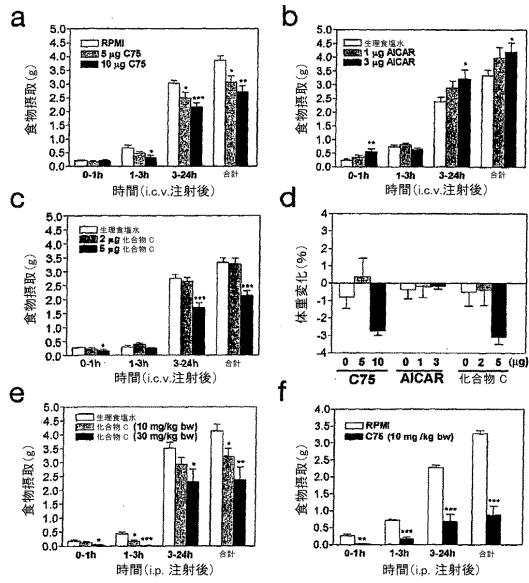


図1

【図2】

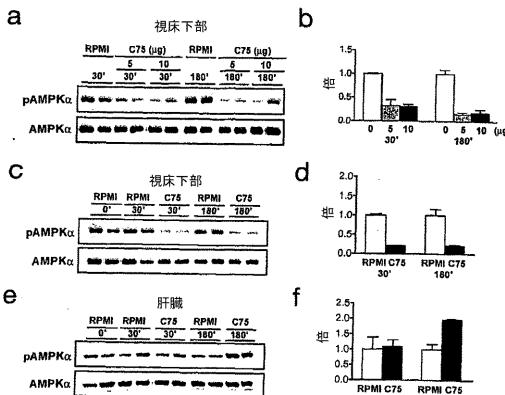


図2

【図3】

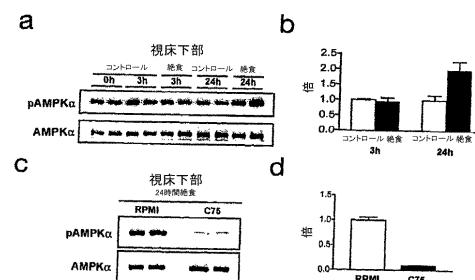


図3

【図4】

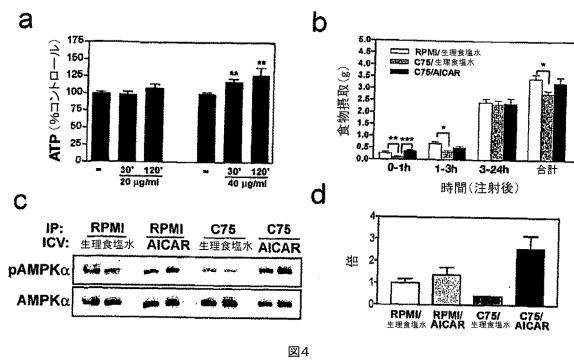


図4

【図5】

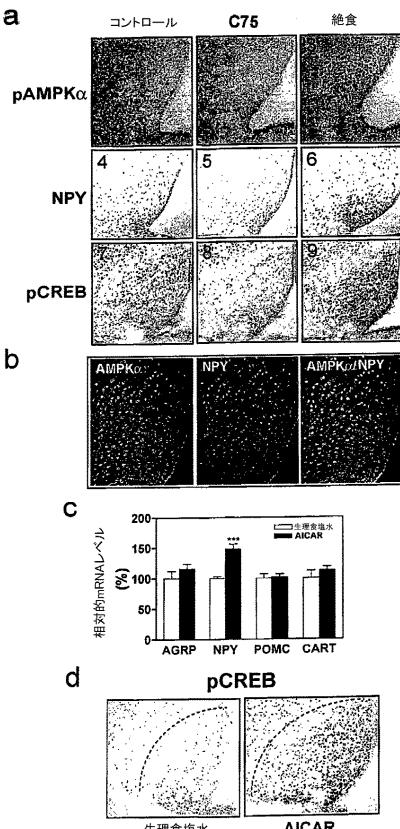


図5

【図6】

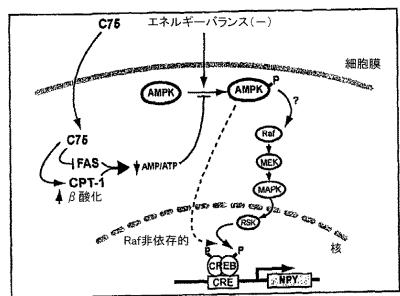


図6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/09069
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : A61K 31/70,31/34 US CL : 514/43,47,473 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/43,47,473		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,981,575 (KUHAJDA et al) 09 November 1999 (09.11.1999), see entire document.	1-2,4-5,7-8,9-10,12-13
A	WO 01/93873 A1 (RUDERMAN et al) 13 December 2001 (13.12.2001), see entire document.	1-14
X	WO 02/009726 A1 (RUDERMAN et al) 07 February 2002 (07.02.2002), see entire document.	1-3,6,7-9,11-14
X	WO 01/10449 A1 (RUDERMAN et al) 15 February 2001 (15.02.2001), see entire document.	1-3,6,7-9,11-14
A	US 2003/0212013 A1 (WINDER) 13 November 2003 (13.11.2003), see entire document.	1-14
<input type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"C"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"D"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"E"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 12 July 2005 (12.07.2005)	Date of mailing of the international search report 20 JUL 2005	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer  Christopher Low Telephone No. (703)-872-9306	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US05/09069

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST Online (Search Terms: AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-D-ribofuranoside, C75, AMPK, AMP-activated protein kinase, obesity, food intake/regulation, hypothalamic AMPK, neuronal energy balance, AICA, 5-amino-4-imidazole carboxamide riboside)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100106518

弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 ガブリエル・ブイ・ロネット

アメリカ合衆国21205メリーランド州ボルチモア、ノース・ウルフ・ストリート725番、ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ・スクール・オブ・メディシン、プレクリニカル・ティーチング・ビルディング1006ビー、デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(72)発明者 フランシス・ピー・クハジュダ

アメリカ合衆国21224メリーランド州ボルチモア、イースタン・アベニュー4940番、ペイビュー・キャンパス・デパートメント・オブ・パソロジー・ビルディング・エイエイ、ジョンズ・ホプキンス・ペイビュー・メディカル・センター

(72)発明者 ジャガン・エヌ・トゥバリ

アメリカ合衆国21205メリーランド州ボルチモア、ノース・ウルフ・ストリート725番、ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ・スクール・オブ・メディシン、プレクリニカル・ティーチング・ビルディング1006ビー、デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(72)発明者 レスリー・イー・ランドリー

アメリカ合衆国21205メリーランド州ボルチモア、ノース・ウルフ・ストリート725番、ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ・スクール・オブ・メディシン、プレクリニカル・ティーチング・ビルディング1006ビー、デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(72)発明者 ティモシー・エイチ・モラン

アメリカ合衆国21205メリーランド州ボルチモア、ノース・ウルフ・ストリート725番、ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ・スクール・オブ・メディシン、プレクリニカル・ティーチング・ビルディング1006ビー、デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

(72)発明者 ユン・キョン・キム

アメリカ合衆国21205メリーランド州ボルチモア、ノース・ウルフ・ストリート725番、ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシティ・スクール・オブ・メディシン、プレクリニカル・ティーチング・ビルディング1006ビー、デパートメント・オブ・ニューロサイエンス

F ターム(参考) 4C037 JA03

4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA702 ZC192 ZC202

4C086 AA01 AA02 DA06 MA01 MA04 NA14 ZA70 ZC20