

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年1月14日(14.01.2016)

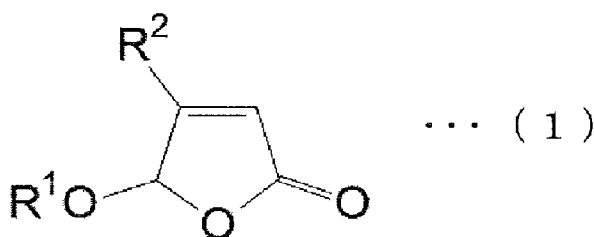


(10) 国際公開番号
WO 2016/006548 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/341 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/069281
 - (22) 国際出願日: 2015年7月3日(03.07.2015)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ:
特願 2014-143247 2014年7月11日(11.07.2014) JP
特願 2015-051006 2015年3月13日(13.03.2015) JP
 - (71) 出願人: 日本恒順株式会社 (KOJUN JAPAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5300043 大阪府大阪市北区天満一丁目5番20号日本恒順ビル Osaka (JP).
 - (72) 発明者: 榎谷 文武 (MASUTANI, Bumbu); 〒5300043 大阪府大阪市北区天満一丁目5番20号日本恒順ビル 日本恒順株式会社内 Osaka (JP). 辻野 義雄 (TSUJINO, Yoshio); 〒6580003 兵庫県神戸市東灘区本山北町四丁目7番54号 Hyogo (JP). 安 芝英 (AN, Jiyeong); 〒6158245 京都府京都市西京区御陵大原1-4-9 株式会社ファーマフーズ内 Kyoto (JP). 山津 敦史 (YAMATSU, Atsushi); 〒6158245 京都府京都市西京区御陵大原1-4-9 株式会社ファーマフーズ内 Kyoto (JP). 山下 裕輔 (YAMASHITA, Yusuke); 〒6158245 京都府京都市西京区御陵大原1-4-9 株式会社ファーマフーズ内 Kyoto (JP). 原田 清佑 (HARADA, Seiyu); 〒6158245 京都府京都市西
 - 京区御陵大原1-4-9 株式会社ファーマフーズ内 Kyoto (JP).
 - (74) 代理人: 吉田 芳春 (YOSHIDA, Yoshiharu); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目2番5号 共同通信会館9階 Tokyo (JP).
 - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロアジア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: PPAR γ ACTIVATING AGENT

(54) 発明の名称: P P A R γ 活性化剤



(57) Abstract: This PPAR γ activating agent is characterized by containing a butenolide compound represented by expression (1), or a pharmaceutically permissible salt thereof. [In formula expression (1), R¹ is a hydrogen atom, a phosphate group, a fatty acid group, an alkyl group of 1-4 carbon atoms optionally and having a substituent, or a sugar residue optionally having a substituent, and R² is a phenyl group, a methyl phenyl group, a dimethyl phenyl group, an ethylphenyl group, a benzyl group, a methylbenzyl group, a dimethylbenzyl group, an ethyl benzyl group, a phenethyl group, a methylphenethyl group, a dimethyl phenethyl group or an ethyl phenethyl group.]

(57) 要約: 式(1)で表わされるブテノライド化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することを特徴とするPPAR γ 活性化剤。[式(1)中、R¹は水素原子、リン酸基、脂肪酸基、置換基を有していてもよい炭素数1~4のアルキル基又は置換基を有していてもよい糖残基を示し、R²はフェニル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、エチルベンジル基、フェネチル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基又はエチルフェネチル基を示す。]



WO 2016/006548 A1

明 細 書

発明の名称： P P A R γ 活性化剤

技術分野

[0001] 本発明は、脂質代謝活性化剤、抗糖尿病剤又は肥満症や生活習慣病などの予防・改善等に用いることのできる P P A R γ 活性化剤に関する。

背景技術

[0002] 香醋（香酢）は、主に糯米を発酵させ、長期間熟成させて製造される発酵食品であり、中国では古くから酢調味料として用いられている。香醋は、日本で一般的に用いられる酢である米酢よりもアミノ酸等の有機化合物の含有率が高く、近年は日本でも健康の保持増進に役立つ健康食品として人気が高まっている。

[0003] 例えば、本発明者らは特許文献 1 において、香醋の低級アルカノール抽出物を有効成分として含有するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 α 活性化剤及び γ 活性化剤を開示している。これによれば、香醋の低級アルカノール抽出物に、脂肪酸酸化の刺激及び血清脂質の仲介作用に関与し糖代謝を改善するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（P P A R） α の活性化作用、並びに脂肪細胞の分化に関与し血糖値及び血中脂質の低下等をもたらす P P A R γ の活性化作用が認められることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献 1：特開 2009-249322 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、特許文献 1 で開示された P P A R 活性化剤は、香醋を低級アルカノールで抽出することにより得られた抽出物であるところ、この抽出物の P P A R γ 活性化作用に関する効果確認は、一般に生体内に比べて反応条件が整えられた実験系で行われており、香醋の低級アルカノール抽出物を

1. 0% (すなわち、10000 ppm) という高い割合で細胞培養液に添加した場合において、PPAR γ 活性化作用がみられることが確認されている。よって、この香醋の低級アルカノール抽出物をPPAR γ 活性化剤として使用するにあたっては、これを多量に添加又は摂取する必要がある。

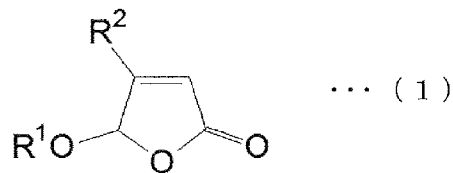
[0006] また、特許文献1で開示された香醋の低級アルカノール抽出物は、複数の成分が含まれる混合物であり、PPAR活性化剤としての有効成分が具体的に何であるのかは示されていない。

[0007] 従って、本発明の目的は、香醋中に含まれる優れたPPAR活性化作用を有する有効成分を特定し、その有効成分を含むPPAR活性化剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するため、本発明者らは、香醋に種々の分画処理を施し、得られた分画物を検討した結果、優れたPPAR活性化作用を有するブテノライド化合物を発見した。すなわち、本発明のPPAR γ 活性化剤は、式(1)で表わされるブテノライド化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する。

[0009] [化1]



[0010] [式(1)中、R¹は水素原子、リン酸基、脂肪酸基、置換基を有していてもよい炭素数1~4のアルキル基又は置換基を有していてもよい糖残基を示し、R²はフェニル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、エチルベンジル基、フェネチル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基又はエチルフェネチル基を示す。]

[0011] このブテノライド化合物は、PPAR γ リガンド活性を有し、PPAR γ

を活性化させる作用を有している。また、このブテノライド化合物は白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞化し、脂質代謝を活性化させる作用を特に有している。さらに、このブテノライド化合物は、糖尿病、インスリン抵抗性、高脂血症、高血圧、動脈硬化、内臓脂肪型肥満、皮下脂肪蓄積、体重増加、レプチン抵抗性、脂肪肝又は生活習慣病などのPPAR γ が関与する病態、症状又は疾患の予防、改善又は治療等に有効である。

[0012] また、本発明のPPAR γ 活性化剤は、前述した式(1)において、R¹が水素原子、リン酸基又は置換基を有していてもよい糖残基であり、R²がフェニル基、4-メチルフェニル基、ベンジル基又は4-メチルベンジル基であることが好ましい。これにより、水溶性の性質を有し、PPAR γ 活性化剤として好適なブテノライド化合物が選択される。

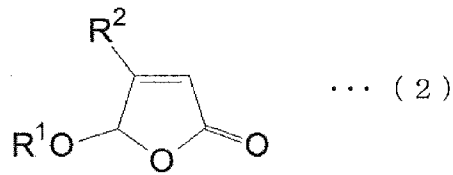
[0013] また、本発明の医薬は、糖尿病、インスリン抵抗性、肥満症、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、レプチン抵抗性、脂質代謝異常、高脂血症、動脈硬化及びメタボリックシンドロームからなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは治療のための医薬であって、上述のPPAR γ 活性化剤を含有する。これにより、上述したブテノライド化合物からなるPPAR γ 活性化剤の好適な用途が選択される。

[0014] また、本発明のサプリメントは、糖尿病、インスリン抵抗性、肥満症、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、レプチン抵抗性、脂質代謝異常、高脂血症、動脈硬化及びメタボリックシンドロームからなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のためのサプリメントであって、上述のPPAR γ 活性化剤を含んでいる。これにより、上述したブテノライド化合物からなるPPAR γ 活性化剤の好適な用途が選択される。

[0015] また、本発明のPPAR γ が関与する病態、症状又は疾患の治療、予防、抑制又は改善用組成物は、式(2)で表わされるブテノライド化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する。

[0016]

[化2]



[0017] [式(2)中、R¹は水素原子、リン酸基、脂肪酸基、置換基を有していてもよい炭素数1～4のアルキル基又は置換基を有していてもよい糖残基を示し、R²はフェニル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、エチルベンジル基、フェネチル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基又はエチルフェネチル基を示す。]

[0018] PPAR γ は、主に糖・脂質代謝に関与する因子であり、メタボリックシンドローム、代謝性疾患、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、肥満、糖尿病、インスリン抵抗性、高血圧、動脈硬化、高脂血症、炎症性疾患及び悪性腫瘍などの増殖性疾患に関与している。上述したブテノライド化合物は、PPAR γ リガンド活性を有し、PPAR γ を活性化させる作用を有しているため、PPAR γ が関与する病態、症状又は疾患の予防、改善、抑制又は治療に有効に用いられる。

[0019] また、PPAR γ が関与する病態、症状又は疾患としては、糖尿病、インスリン抵抗性、肥満症、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、レプチン抵抗性、脂質代謝異常、高脂血症、動脈硬化及びメタボリックシンドロームからなる群から選択される1種以上の病態、症状又は疾患であることが好ましい。これにより、上述したブテノライド化合物の特に好適な用途が選択される。このブテノライド化合物は、白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞化させ、脂質を利用した熱産生を促進し、脂質代謝を活性化させる作用を有するほか、体重増加抑制作用、内臓脂肪蓄積抑制作用、皮下脂肪蓄積抑制作用、アディポネクチン増強作用、インスリン分泌抑制作用及びレプチン分泌抑制作用等を有している。それゆえ、これらのPPAR γ が関与する病態、症状又は疾

患を治療、予防、抑制又は改善することができる。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、高いPPAR γ 活性化作用を有するブテノライド化合物が得られる。このブテノライド化合物は、白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞化させて脂質代謝を活性化する作用を有するほか、体重増加抑制作用、内臓脂肪蓄積抑制作用、アディポネクチン増強作用、インスリン分泌抑制作用及びレプチン分泌抑制作用等を有している。それゆえ、インスリン抵抗性、糖尿病、体重増加、肥満症、高脂血症、高血圧、動脈硬化、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、脂肪肝又はメタボリックシンドロームなどのPPAR γ が関与する病態、症状又は疾患を治療、予防、抑制又は改善するために使用することができる。このように、上述のような病態等の予防又は改善に役立ち、食品やサプリメント、薬剤等に広く応用可能なブテノライド化合物が得られる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]本発明のPPAR γ 活性化剤の有効成分であるブテノライド化合物を香醋から製造する方法を概略的に説明するフローチャートである。

[図2]実施例1における、香醋から順相カラム分画物を調整する方法を概略的に説明するフローチャートである。

[図3]実施例1における、順相カラム分画物のPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図4]実施例2における、逆相カラム分画物を調整する方法を概略的に説明するフローチャートである。

[図5]実施例2で得られた逆相カラム分画物（f r. 1～5）と実施例1で得られた順相カラム分画物（分画前 f r. 1）のHPLC分析の結果を示すクロマトグラムである。横軸は保持時間（分）を示す。

[図6]実施例2における、逆相カラム分画物のPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図7]実施例3における、ピーク分画物のPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図8]実施例3で得られたピーク分画物のうち、ピーク5のHPLC分析の結果を示すクロマトグラムである。縦軸は検出強度を、横軸は保持時間（分）を示す。

[図9]実施例3における、ピーク5の分画物及び実施例2で得た逆相カラム分画物のフラクション5のPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図10]実施例4における、ピーク5の分画物のLC/MSの結果を示すチャートである。縦軸は検出強度を、横軸はm/z値を示す。

[図11]実施例5における、UCP-1遺伝子の発現量の結果を示すグラフである。

[図12]実施例7における、5-ヒドロキシ-4-フェニルブテノライド合成品のPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図13]実施例8におけるブテノライド化合物のPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

[図14]実施例9における、5-ヒドロキシ-4-フェニルブテノライド投与によるマウスの体重増加抑制効果を示すグラフである。

[図15]実施例10における、マウス血液中に含まれるアディポネクチンの量を示すグラフである。

[図16]実施例11における、マウス血液中に含まれるインスリンの量を示すグラフである。

[図17]実施例12における、マウス血液中に含まれるレプチンの量を示すグラフである。

[図18]実施例13における、5-ヒドロキシ-4-フェニルブテノライド投与によるマウスの皮下脂肪及び内臓脂肪の蓄積抑制効果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

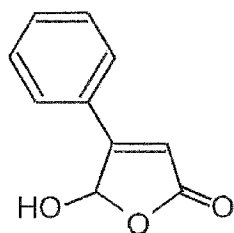
[0022] 以下、本発明を詳細に説明する。本発明のPPAR γ 活性化剤には有効成分として上述の式(1)で表されるブテノライド化合物が含まれる。この式(1)中、R¹で示される原子としては水素原子が好ましく、分子としては、

リン酸基、脂肪酸基、置換基を有していてもよい炭素数1～4のアルキル基又は置換基を有していてもよい糖残基が挙げられる。脂肪酸基としては、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、マルガリン酸又はステアリン酸等が挙げられる。炭素数1～4のアルキル基としては、メチル基、エチル基、各種プロピル基又は各種ブチル基が挙げられる。また、リン酸基、糖残基による配糖体は、体外での安定性及び体内での吸収性の観点から好ましく、糖としては、特に限定されないが、各種グルコース、各種ガラクトース又は各種マンノース等が用いられ、特にグルコースが好適な配糖体を形成する糖として用いられる。

[0023] また、 R^2 はフェニル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、エチルベンジル基、フェネチル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基又はエチルフェネチル基が好ましく、特に、作用効果の観点から、フェニル基、4-メチルフェニル基、ベンジル基又は4-メチルベンジル基が好適に用いられる。

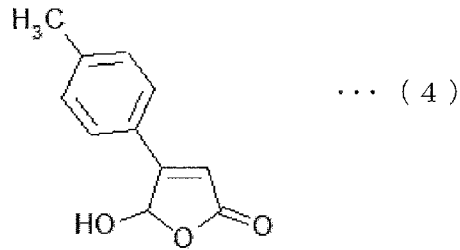
[0024] この式(1)で表わされる化合物のうち、特に薬理活性の点から好ましい化合物としては、以下式(3)に示す5-ヒドロキシ-4-フェニルブテノライドや以下式(4)に示す5-ヒドロキシ-4-(4-メチルフェニル)ブテノライドのほか、5-ヒドロキシ-4-(4-メチルベンジル)ブテノライドや5-ヒドロキシ-4-ベンジルブテノライドを挙げることができ、後述するように、PPAR γ 活性化剤として香醋中から発見された5-ヒドロキシ-4-フェニルブテノライド又は5-ヒドロキシ-4-(4-メチルフェニル)ブテノライドが特に好ましい。

[0025] [化3]



... (3)

[0026] [化4]



[0027] 式(3)に示すブテナイド化合物、すなわち、5-ヒドロキシ-4-フェニルブテナイドは、発酵食品である香醋から抽出して得ることができる。香醋からこのブテナイド化合物を得る方法としては、特に限定されないが、一例として、図1のフローチャートに示すように、香醋(を準備する工程)S0と、香醋に含まれている脂質成分を除去する脱脂処理工程S1と、溶媒を用いて目的の成分を抽出する溶媒抽出処理工程S2と、順相クロマトグラフィーによる分画工程S3と、逆相クロマトグラフィーによる分画工程S4とから概略構成される。

[0028] この香醋S0とは、糯米に麴を添加してアルコール発酵させ、粬殻を添加して酢酸発酵させ、水を添加して抽出し、その抽出液を一定期間熟成させたものである。

[0029] 図1に示す脱脂処理S1は、香醋S0に含まれている余分な脂質成分を除去する目的で行われる。香醋S0の脱脂処理を行うことにより、香醋に含まれている余分な脂質成分が除去されるため、後に行われる溶媒抽出処理S2や分画工程S3及びS4において、式(3)で表わされるブテナイド化合物を有効に抽出することが可能となる。具体的には、特に限定されないが、香醋S0に有機溶媒を加えてよく攪拌し、有機溶媒相に余分な脂質成分を移動させた後、遠心分離機などを用いて水相と有機溶媒相とに分離し、水相を回収することにより行うことができる。この操作は複数回行われることが好ましい。有機溶媒としては、脱脂効果を有するものであればよく、たとえば、石油系有機溶媒やアルコール類などが好適に用いられ、特にn-ヘキサンが好適に用いられる。用いる有機溶媒の量としては、香醋の10重量%から

1000重量%程度が好ましく、香醋の量の半分から2倍程度が最も好ましい。

[0030] 次に図1に示す溶媒抽出処理S2では、脱脂処理した香醋に溶媒を加え、加えた溶媒に目的となるブテノライド化合物を移動させることが行われる。用いられる溶媒としては、有機溶媒が好適に用いられ、特に限定されないが、*n*-ブタノール又はエタノールなどのアルカノール、酢酸エチル、ブチレングリコール及びクロロホルム等を用いることができる。これらの溶媒抽出処理S2は、単一の処理に限られず、同じ溶媒での抽出処理を複数回行うことや、複数種類の溶媒抽出処理を組み合わせることも可能である。

[0031] 上述した溶媒抽出処理S2の一例として、有機溶媒としてクロロホルムを用いた際の抽出処理について説明する。このクロロホルム抽出処理では、脱脂した香醋にクロロホルムを加え、クロロホルム相に目的成分であるブテノライド化合物を効率よく移動させることが行われる。具体的には、たとえば香醋とクロロホルムとを分液漏斗を用いて分配し、クロロホルム相を回収することにより行われる。この場合、分配は複数回行われることが好ましい。クロロホルムの添加量としては、水相（香醋）の10重量%から1000重量%程度が好ましく、水相の量の半分から2倍程度が最も好ましい。回収されたクロロホルム相は、減圧濃縮処理等により溶媒を簡単に除去することができ、固形又は濃縮された香醋のクロロホルム抽出物を得ることができる。

[0032] 次に、図1に示す順相クロマトグラフィーによる分画工程S3について説明する。この分画工程S3では、工程S2で得られた溶媒抽出物に含まれている目的成分のブテノライド化合物を精製分離することを目的としている。一例として、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画処理について説明する。具体的には、特に限定されないが、シリカゲルが充填されたクロマト管の上に溶媒抽出物を吸着させたシリカゲルをのせ、その上から所定の移動相を流して溶出させることにより行われる。移動相としては、特に限定されないが、ベンゼン-アセトンが好適に用いられ、例えば、ベンゼン：アセトンの比を40：1から0：1までの勾配とした移動相で溶出するこ

とにより、好適に分離することが可能である。得られた分画物のうち、どの分画物に目的物質が含まれているかを確認するにあたっては、後述する P P A R γ 活性化試験や、P P A R γ が関与する遺伝子（U C P - 1 遺伝子等）の発現量を測定する試験等を行うことができる。

[0033] 次に、図 1 に示す逆相クロマトグラフィーによる分画工程 S 4 について説明する。この分画工程 S 4 では、工程 S 3 で得られた順相カラム分画物に含まれている目的成分のブテノライド化合物をさらに精製分離し、略単離することを目的としている。一例として、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画処理について説明する。具体的には、特に限定されないが、オクタデシルシリル基（C₁₈）で修飾されたシリカゲルをカラムに充填し、工程 S 3 で得られた分画物をカラムに添加した後、所定の移動相を流して溶出させることにより行われる。移動相としては、特に限定されないが、メタノール水が好適に用いられ、例えば、メタノール：水の比を 1：9 から 1：0 までの勾配とした移動相で溶出することにより、好適に単離することが可能である。得られた分画物のうち、どの分画物に目的物質のブテノライド化合物が含まれているかを確認するにあたっては、後述する P P A R γ 活性化試験や、P P A R γ が関与する遺伝子（U C P - 1 遺伝子等）の発現量の測定試験等を行うことができる。また、得られた分画物について H P L C 分析を行い、クロマトグラムを確認して、単一ピークが得られているかを確認することによりブテノライド化合物を単離できたか否かの確認を行うことができる。

[0034] なお、上述した分画処理 S 3、S 4 は、単一の処理に限られず、同じ充填材又は異なる充填材による分画処理を複数回行うことや、同じ移動相又は異なる移動相による分画処理を組み合わせることも可能である。

[0035] また、式（3）で表されるブテノライド化合物は、香醋から抽出分離して得る方法の他に、公知の合成方法で製造することも可能である。例えば、フェニルアセトアルデヒドとグリオキシル酸エステルとをアルドール縮合させ、3-フェニル-4-オキソ-2-ヒドロキシブタン酸エステルを得たの

ち、水の存在下で酸を作用させること（特開平6-211825号公報）、フェニルアセトアルデヒドとグリオキシル酸エステルとをモルホリン塩酸塩存在下で反応させること（特開平11-152280号公報）等により本発明のブテノライド化合物を製造することができる。同様に、式（4）及び式（1）で表わされるその他のブテノライド化合物についても、公知の合成方法（J. Org. Chem.、1981年、第46巻、pp. 4889-4894及びTetrahedron Letters、2013年、第54巻、pp. 5322-5324等参照）にて製造することが可能である。

[0036] 上述したブテノライド化合物の薬理的に許容される塩としては、酸又は塩基と形成される塩であればよく、特に限定されない。また、このブテノライド化合物又はその塩は、水和物やアルコール等の有機溶媒和物などであってもよく、無水物であってもよい。また、各種異性体やラセミ体、又はこれらの混合物なども含まれる。さらに、このブテノライド化合物又はその塩は、分子構造中に含まれる官能基が修飾される等した、生体の代謝作用により効果を示すようになるプロドラッグであってもよい。

[0037] 式（1）で表されるブテノライド化合物はPPAR γ を活性化させる作用を有する。なお、本発明において、PPAR γ 活性化剤とは、PPAR γ に結合する等してPPAR γ を活性化させ、標的遺伝子の発現を調整できる物質のことをいう。PPAR γ の標的遺伝子としては、例えば、アディポネクチン、UCP-1、脂肪酸結合タンパク質又はaP2等が挙げられる。また、本明細書において、PPAR γ リガンド活性とPPAR γ アゴニスト活性とは同義である。

[0038] 本発明のPPAR γ 活性化剤はPPAR γ が関与する病態、症状又は疾患の治療、予防、抑制又は改善に用いることができる。ここでの治療や病態の改善には、これらの疾患や病態に対する予防や予後の処置も含まれる。PPAR γ が関与する疾病には、脂肪細胞の分化や代謝に関与するものが広く含まれ、特にインスリン抵抗性、糖尿病、高脂血、高血圧、内臓脂肪型肥満、

内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、脂肪肝、体重増加、肥満、レプチン抵抗性、動脈硬化、炎症性疾患、悪性腫瘍若しくはメタボリックシンドローム又はこれらに関連する疾患が含まれる。本発明のPPAR γ 活性化剤は、これらの疾患の一つ又は複数に対する治療や改善、症状や病態の抑制や予防等に用いられる。

[0039] また、本発明のブテノライド化合物は、脂肪を蓄積させる白色脂肪細胞を、脂肪を燃焼させる褐色脂肪細胞に変換させる作用を有していることから、脂質代謝活性化剤として用いることができる。なお、脂質代謝活性化剤としての作用機序は上述した白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞化させることのみに限定されず、本発明の化合物がPPAR γ 活性化作用を有し、PPAR γ の標的遺伝子の転写が亢進することも関係する。

[0040] さらに、式(1)で表されるブテノライド化合物は、PPAR γ 活性化作用を有することから、抗糖尿病剤、インスリン抵抗性治療剤、抗肥満症剤、体重増加抑制剤、内臓脂肪蓄積抑制剤、皮下脂肪蓄積抑制剤、レプチン抵抗性治療剤、脂質代謝異常治療剤、抗高脂血症剤、動脈硬化治療剤及びメタボリックシンドローム抑制剤として用いることができる。

[0041] 本発明のPPAR γ 活性化剤等は、上述した式(1)で表されるブテノライド化合物を有効成分として含むものであり、ヒト又は動物のための医薬品、医薬部外品及び食品として用いることができる。食品には、サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品等も含まれる。

[0042] 本発明のPPAR γ 活性化剤等を医薬品又は医薬部外品として用いる場合には、従来慣用されている方法により種々の形態に調製することができる。この場合、通常製剤用の薬理的に許容される担体や賦形剤、滑沢剤、分散剤、崩壊剤、緩衝剤、溶剤、増量剤、保存剤、香料又は安定化剤など、医薬品の添加剤として許容されている添加剤を用いて製剤化することができる。さらに、このブテノライド化合物のバイオアベイラビリティや安定性を向上させるために、マイクロカプセル、リポソーム製剤、微粉末化又はシクロデキストリン等を用いた包接化などの製剤技術を含むドラッグデリバリーシ

ステムを用いることもできる。

[0043] 本発明のPPAR γ 活性化剤等を経口投与製剤として用いる場合には、錠剤、顆粒剤、カプセル剤又は内服用液剤等の形態で用いることができるが、消化管からの吸収に適した形態で用いることが好ましい。また、流通性、保存性などの理由により所望される形態での製剤を提供する場合にも従来の製剤技術を用いることができる。また、外用剤等の非経口投与剤として用いる場合には、注射剤、坐剤およびテープ剤、パップ剤などの経皮吸収剤等の形態とすることができる。また、流通性や保存性などの理由から固形製剤を使用時に適当な溶剤で溶解してから用いることもでき、液剤および半固形剤の形態で提供することも従来の製剤技術により可能である。

[0044] また、本発明のPPAR γ 活性化剤等を食品として用いる場合には、錠剤やカプセル剤、顆粒剤、シロップ剤などのサプリメント形態、スープ、粥、飲料、麺類、ゼリー、シリアル、パン、乳製品、調味料、食用油、菓子等の形態が挙げられる。また、動物用食品（飼料、ペットフード；ドライタイプ、ウェットタイプ、動物用サプリメント、動物用飲料等）として用いることも可能である。食品として用いる際には、香醋に由来するエキス等の成分や、ビタミン、ミネラル若しくはアミノ酸等の栄養素等を種々添加することも可能である。

[0045] 本発明のPPAR γ 活性化剤等の投与量又は有効摂取量は、目標とする治療効果、投与方法、投与対象及び剤形によって変化するため、特に限定されないが、一日の経口投与量としては、有効成分として約0.01 μ g/60kg体重～約300mg/60kg体重であり、好ましくは、0.05 μ g/60kg体重～約100mg/60kg体重であり、これを1～3回に分割して投与することが好ましい。また、一日の非経口的な投与量としては、有効成分として約0.01 μ g/60kg体重～100mg/60kg体重であり、好ましくは約0.03 μ g/60kg体重～50mg/60kg体重が好ましい。

[0046] 次に、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明は、これら

の実施例によってなんら限定されるものではない。

実施例

[0047] 以下の実施例におけるPPAR活性化試験の測定方法は、下記の通りである。

(1) PPAR γ 活性化試験

(1-1) 準備

ヒト由来のPPAR γ リガンド結合ドメインと酵母由来のGAL4転写因子のDNA結合ドメインからなるキメラタンパク質を発現するプラスミドのpM-PPAR γ と、このキメラタンパク質によって発現が制御されるようにデザインされた、GAL4応答配列の下流にウミホタル由来のルシフェラーゼ構造遺伝子を連結したプラスミドのp4×UASg-tk-lucを準備した。また、トランスフェクション効率補正用プラスミドとして、細胞内で恒常的に発現するウイルス性発現プロモーターを持ったウミシイタケ由来のルシフェラーゼ発現プラスミドのpRL-CMVを準備した。他方、CV-1細胞（アフリカミドリザル腎臓由来）の培地として、10%FBS/D MEMを用い、100mmシャーレにCV-1細胞を 4.5×10^5 cellsとなるように播き、37℃、5%CO₂環境下でインキュベーターにて培養を行った。

[0048] (1-2) CV-1細胞の形質転換

24時間培養後のCV-1細胞に、2.0 μ gのpM-PPAR γ 、4.0 μ gのp4×UASg-tk-luc、及び0.04 μ gのpRL-CMVをコトランスフェクトし、CV-1細胞の形質転換を行った。形質転換はリポソーム法で行い、LipofectAMINE（登録商標）Reagent（インビトロジェン社製品）を使用した。形質転換操作後、37℃、5%CO₂環境下で3.5時間培養を行った。

[0049] (1-3) 被検試料の添加

インキュベート後、トリプシン処理によりCV-1細胞を回収し、96wellプレートに 1×10^5 cells/mLの濃度になるように50mL播

種した。被検試料を4% FBS / DMEMで希釈して最終濃度の2倍の濃度となるように調整し、上述した96wellプレートに50mL添加した。なお、コントロール物質としては、DMSOを用いた。被検試料及びコントロール物質(DMSO)を添加した後、37℃、5%CO₂環境下で24時間インキュベートを行った。

[0050] (1-4) ルシフェラーゼ活性の測定

ルシフェラーゼ活性の測定は、Dual-Luciferase (登録商標) Reporter Assay System (プロメガ社製品) を用いて行った。96wellプレートから培養液を除き、細胞をPBS(-)で洗浄し、ペーパータオルで水分を除去した。細胞溶解液(Passive Lysis Buffer)を30mL加え、96wellプレートを15分振とうした。細胞抽出液を10mLずつ96wellルミノプレートに移した。発光基質液70mLを添加し、測定時間10秒の設定でルシフェラーゼによる発光強度をルミノメーター(Micro Lumat Plus、ベルトールドジャパン社製品)を用いて測定した。

[0051] 被検試料のPPAR γ 活性化作用は、コントロールに対する割合(%)で評価した。トランスフェクション効率を補正するために、測定したウミホタル・ルシフェラーゼ活性値(A)を測定したウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性値(B)で除した値(A/B)を求めた。コントロール群のA/B値の平均値を算出し、この平均値を100とした。被検試料のA/B値を算出し、コントロールの平均値に対する割合(%)を被検試料のPPAR γ 活性化能とした。

[0052] [実施例1 順相カラム分画物の調整及び活性測定]

図2に示す分画フローにより、香醋より7つの順相カラム分画物を調整した。以下、分画フローの各処理について詳述する。

[0053] (1) ヘキサン脱脂処理

香醋(製品名; 8年熟成恒順香醋、日本恒順株式会社製品)1Lに対して、等量のn-ヘキサンを加えてよく攪拌したのち、5000rpmで10分間遠心分離を行い、水層を回収した。この分配操作を3回行い、香醋に含ま

れる余分な脂質成分を除去した。

[0054] (2) クロロホルム抽出処理

次に、回収した水層に等量のクロロホルムを加え、分液ロートを用いて3回分配操作を行い、クロロホルム層を回収した。回収したクロロホルム層の減圧下濃縮を行って溶媒を除去し、3970mgのクロロホルム抽出物を得た。

[0055] (3) 順相シリカゲルカラム処理

クロロホルム抽出により得た抽出物3970mgを少量のアセトンに溶かし、130gのシリカゲル（シリカゲル60、0.040–0.063mmカラムクロマトグラフィー用；メルクミリポア社製品）に吸着させた。次に、ガラスクロマト管（クロマト管の長さ60cm、直径2.7cm、容量343mL）にシリカゲルを130g充填し、その上に香醋のクロロホルム抽出物を吸着させたシリカゲルをのせた。ベンゼン：アセトン＝20：1、10：1、5：1、3：1、2：1、1：1及びアセトン100%の溶媒の順に550mLずつ各溶媒を流し、溶媒毎に溶出した分画物を分け、順相カラム分画物（フラクション1～7）として回収した。回収した分画物をそれぞれ減圧下濃縮して溶媒を除去し、得られた分画物の固形重量を測定した。PPAR γ リガンド活性測定における最終濃度の1000倍以上の濃度となるように、得られた分画物の一部を適量のジメチルスルホキシド（DMSO、ナカライテスク株式会社製品）に溶解させた。

[0056] (4) 順相カラム分画物の活性測定

実施例1で得た7つの順相カラム分画物を被検試料として、PPAR γ 活性化試験を行い、各分画物のPPAR γ リガンド活性を評価した。各分画物の最終濃度は100 μ g/mL及び50 μ g/mLとした。各分画物のPPAR γ リガンド活性を図3に示す。これらの図の縦軸はコントロール物質（DMSO）の活性に対する分画物の活性の割合である。図3に示すように、フラクション1の分画物（溶出溶媒がベンゼン：アセトン＝20：1）について、濃度依存的なPPAR γ リガンド活性が認められた。

[0057] [実施例2 逆相カラム分画物の調整及び活性測定]

(1) 逆相ODSカラム処理

図4の分画フローに示すように、実施例1で得たPPAR γ 活性化作用が認められるフラクション1の順相カラム分画物について、さらに逆相クロマトグラフィーを行い、5つの逆相カラム分画物を調整した。逆相クロマトグラフィーは以下のように行った。ガラスクロマト管（クロマト管の長さ40cm、直径2.2cm、容量152mL）に充填材として、ODSシリカゲル（YMC*GEL ODS-A 6nm S-150 μ m；ワイエムシ社製品）50gをメタノールで懸濁させて充填した。脱気したメタノール100%を、気泡を作らないようにこの充填材に100mL注いで流した。次に、充填材の10倍量（760mL）の脱気したメタノール10%水溶液で充填材を平衡化した。実施例1で得たフラクション1の分画物117mgをメタノールに溶かし、その溶液を充填材の上から添加した。そして、メタノール濃度が10%、20%、30%、40%及び100%の脱気したメタノール水溶液を、この濃度の順に充填材の上から180mLずつ流し、溶媒毎に溶出した分画物を分け、逆相カラム分画物（フラクション1～5）として回収した。得られた逆相カラム分画物は減圧下濃縮して溶媒を除去し、得られた分画物の一部を適量のジメチルスルホキシドに溶解させた。回収した分画物について、高速液体クロマトグラフィー（使用カラム：YMC-Pack ODS-A 250 \times 4.6mm I.D. S-5 μ m 30nm、移動相：メタノール20%水溶液-メタノール70%水溶液、流速：1mL/分、カラム温度：40 $^{\circ}$ C、検出条件UV：280nm）を用いて分離状況の確認を行った。各分画物のHPLCの結果を図5に示す。図5の横軸は保持時間（分）を示す。

[0058] (2) 逆相カラム分画物の活性測定

実施例2で得た逆相カラム分画物（フラクション1～5）及び実施例1で得た順相カラム分画物のフラクション1を被検試料として、PPAR γ 活性化試験を行い、各分画物のPPAR γ リガンド活性を評価した。各分画物の

最終濃度は $100\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。また、PPAR γ アゴニストであるトログリタゾン (Tro) についてもPPAR γ 活性化試験を行った。トログリタゾンの最終濃度は $1\mu\text{M}$ とした。PPAR γ リガンド活性を図6に示す。これらの図の縦軸はコントロール物質 (DMSO) の活性に対する分画物の活性の割合である。図6に示すように、逆相カラム分画物のフラクション4 (溶出溶媒が水:メタノール=60:40) 及びフラクション5 (溶出溶媒がメタノール100%) について、PPAR γ リガンド活性が認められた。

[0059] [実施例3 ピーク分画物の調整及び活性測定]

(1) 高速液体クロマトグラフィーによる分画

図5に示す逆相カラム分画物のHPLCクロマトグラムをみると、PPAR γ 活性化作用が認められるフラクション4及び5には、複数の特異的なピークが認められる。そこで、フラクション4及び5について特異的なピークを示す物質の分画を行い、活性物質を精製することを試みた。分画は、逆相高速液体クロマトグラフィー (使用カラム: YMC-Pack ODS-A 250 \times 4.6mm I.D. S-5 μm 30nm、移動相: メタノール20%水溶液-メタノール70%水溶液、流速: 1mL/分、カラム温度: 40 $^{\circ}\text{C}$ 、検出条件UV: 280nm) を用いて行った。

[0060] (2) ピーク分画物の活性測定

実施例3で得たピーク分画物及びトログリタゾン (Tro) を被検試料として、PPAR γ 活性化試験を行い、各分画物のPPAR γ リガンド活性を評価した。各分画物の最終濃度は $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 、トログリタゾンの最終濃度は $1\mu\text{M}$ とした。結果を図7に示す。図7に示すように、フラクション4のピーク5の分画物に明確なPPAR γ リガンド活性が認められた。なお、このピーク5の分画物をHPLC分析したところ、シングルピークとして検出され (図8参照)、単一成分として単離できたことがわかった。

[0061] さらに、実施例3で得たピーク5の分画物、実施例2で得た逆相カラム分画物のフラクション5及びトログリタゾンについて、PPAR γ 活性化試験

を行い、各分画物のPPAR γ リガンド活性を評価した。ピーク5の分画物の最終濃度は低濃度；50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び高濃度；100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とし、逆相カラム分画物のフラクション5の最終濃度は25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、トログリタゾンの最終濃度は10 μM とした。結果を図9に示す。図9に示すように、ピーク5の分画物のPPAR γ リガンド活性は、濃度依存的に上昇することが認められた。

[0062] [実施例4 ピーク分画物の構造決定]

実施例3で得たピーク5の分画物について構造解析を行った。構造解析は、LC/MS、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMBC及びHSQCを行った。LC/MSの結果を図10に示す。図10の横軸は m/z 値を、縦軸は検出強度を示す。図10よりピーク5の分画物は分子量176.1687、示性式は $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ であることが示唆された。また、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、HMBC及びHSQCの結果より、ピーク5に含まれている成分は、5-ヒドロキシ-4-フェニルブテノライド（以下、「5H4PB」という）であることが明らかとなった。

[0063] [実施例5 UCP-1 遺伝子発現量の測定]

ミトコンドリア脱共役型タンパク質（Uncoupling Protein；UCP）はミトコンドリア内膜での酸化的リン酸化反応を脱共役させ、エネルギーを熱として消費する機能を有している。そのうち、UCP-1は脂肪燃焼による熱産生を行う褐色脂肪細胞に特異的に発現している。近年、特定のPPAR γ 合成アゴニストが脂肪を貯蔵する白色脂肪細胞を脂肪燃焼させる褐色脂肪細胞のように変化させることが報告されている（H. Ohno et al, Cell metabolism, 2012年、Vol.15、pp.395-404）。そこで、PPAR γ リガンド活性が認められたピーク5の分画物、すなわち、5H4PBが白色脂肪細胞を褐色脂肪細胞化させる作用を有するか確認するため、UCP-1遺伝子の発現量を測定する試験を行った。

[0064] 試験は次のように行った。間葉系細胞株10T1/2を12wellプレートに 1×10^4 cells/mLとなるように播種した。細胞がコンフルエ

ントになるまで培養した後、ピーク5の分画物（5H4PB）を最終濃度が100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した。また、コントロール物質としてはDMSOを用いた。サンプル添加から24時間後、細胞からmRNAを回収し、mRNA量を定量した。mRNA定量は、ライトサイクラー（登録商標、ロシュ・アプライド・サイエンス社）を用いて行った。結果を図11に示す。図の縦軸はコントロール物質（DMSO）のUCP-1発現量に対するピーク5の分画物のUCP-1発現量の比である。図11に示すように、ピーク5の分画物はUCP-1の発現レベルを上昇させる作用を有することがわかった。UCP-1の発現量の増加は脂質からの熱産生の亢進を表わす。この結果より、ピーク5の分画物、すなわち、5H4PBはUCP-1の活性化を介して脂質代謝の改善、促進に寄与することがわかった。

[0065] [実施例6 5H4PBの合成]

化学合成により得た5H4PBが香醋から抽出して得た5H4PBと同様のPPAR γ 活性化作用を有するか確認するため、5H4PBを合成した。合成は次のようにして行った。グリオキシル酸一水和物100mgとモルホリン150mgを1,4-ジオキサン450 μL に分散させて、水55 μL を一滴ずつ加えた。フェニルアセトアルデヒド140mgを加え、室温で1時間静置した後、24時間加熱還流した。生成物を減圧濃縮し、ジエチルエーテル2.5mLで抽出した。抽出したジエチルエーテル層に無水硫酸マグネシウムを加えて脱水乾燥させた後、再び減圧濃縮した。濃縮物をアセトン/クロロホルム混合溶液に溶かし、再結晶により5H4PBを140mg得た。得られた合成5H4PBについて、液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）を行い、香醋から抽出して得た5H4PB（実施例3で得たピーク5の分画物）と同一であることを確認した。

[0066] [実施例7 合成品の活性測定]

実施例6で得た5H4PB合成品を被検試料として、PPAR γ 活性化試験を行った。合成5H4PBの最終濃度は3.5 μM とした。結果を図12に示す。これらの図の縦軸はコントロール物質（DMSO）の活性に対する

合成品の活性の割合である。図12に示すように、化学合成により得られた5H4PBについても、香醋由来物と同様に高いPPAR γ リガンド活性が認められた。

[0067] [実施例8 各種ブテノライド化合物の合成及び各合成品の活性測定]

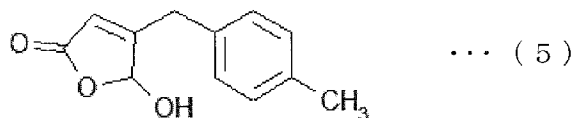
5H4PBをはじめとする各種ブテノライド化合物を化学合成し、種々濃度におけるPPAR γ リガンド活性を測定した。本実施例において、5H4PB及び各種ブテノライドの合成は以下のようにして行った。まず、上記式(3)で表わされる5H4PBについては、1L容量の4口フラスコにモルホリン53mL(0.6mol)と1,4-ジオキサン120mLを順次加え、氷浴しながら50%グリオキシル酸水溶液を62mL(0.6mol、1.5当量)及び濃塩酸50mLを順次滴下して加えた。この混合物を内温87℃まで加熱し、フェニルアセトアルデヒド(48%フタル酸ジエチル溶液、0.4mol)を1,4-ジオキサンの3倍希釈したものをゆっくり滴下し、この混合液を終夜還流させた。薄層クロマトグラフィーを用いて還流後の反応液中にアルデヒドが含まれないことを確認し、反応液を室温まで放冷した。反応液を濃縮して200mLの酢酸エチルを加えた。飽和重曹水で洗浄し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過及び濃縮して一部オイル状の黄色固体101gを得た。この黄色固体に200mLの酢酸エチルを加えて溶解させ、アルミナ(塩基性)を加えて攪拌しバッチ処理した。アルミナをろ過して除いた後、ろ液を濃縮して黄色固体(一部オイル)96gを得た。これを0.5倍量の酢酸エチルに溶解させ、1倍量のヘキサンを加えて攪拌し、析出した固体をろ取して乳白色固体の5H4PBを30.2g(収率40%、GC純度98.6%)を得た。

[0068] また、上記式(4)で表わされる5-ヒドロキシ-4-(4-メチルフェニル)ブテノライド(式(1)におけるR²:メチルフェニル基)の化学合成については、フェニルアセトアルデヒドの代わりに4-メチルフェニルアセトアルデヒド(48%フタル酸ジエチル溶液、0.4mol)を用い、このアルデヒドの滴下温度を混合物の内温60℃とし、滴下終了後に内温87℃

にまで加熱したほかは、本実施例の5H4PBの合成方法（各試薬のモル比、反応時間等）と同様に行った。得られた化合物の収率は30%、GC純度は97.6%であった。

[0069] また、以下式（5）に示す5-ヒドロキシ-4-(4-メチルベンジル)ブテノライド（式（1）におけるR²:メチルベンジル基）の化学合成については、フェニルアセトアルデヒドの代わりに3-(4-メチルフェニル)プロピオンアルデヒド（48%フタル酸ジエチル溶液、0.4mol）を用いたほかは、上述の5H4PBの合成方法と同様にして混合液を終夜還流させて反応させた。薄層クロマトグラフィーを用いて還流後の反応液中にアルデヒドが含まれないことを確認し、反応液を室温まで放冷した。反応液を濃縮して2倍量の酢酸エチルを加えた。この溶液を希塩酸と飽和重曹水で洗浄し、カラムで分けにくい成分を除去した。得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過及び濃縮して粗製固体を得た。この固体を10倍量のヘキサン/酢酸エチル=1の混合溶媒に溶解させ、シリカゲル（PQS100B）3倍量でバッチ処理した。得られた濃縮液にヘキサンを加え、析出した固体をろ取して無色固体の5-ヒドロキシ-4-(4-メチルベンジル)ブテノライドを収率24%、GC純度99.2%で得た。

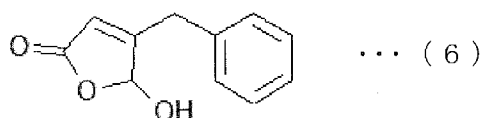
[0070] [化5]



[0071] さらに、以下式（6）に示す5-ヒドロキシ-4-ベンジルブテノライド（式（1）におけるR²:ベンジル基）の化学合成については、フェニルアセトアルデヒドの代わりに3-フェニルプロピオンアルデヒド（48%フタル酸ジエチル溶液、0.4mol）を用いたほかは、上述の5H4PBの合成方法と同様にして混合液を終夜還流させて反応させた。薄層クロマトグラフィーを用いて還流後の反応液中にアルデヒドが含まれないことを確認し、反

応液を室温まで放冷した。反応液を濃縮して2倍量の酢酸エチルを加えた。飽和重曹水で洗浄し、得られた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過及び濃縮して粗製固体を得た。この粗製固体をシリカゲル（PQS100B、展開溶媒：ヘキサン／酢酸エチル＝4→2、3）で精製した。得られた濃縮液にヘキサンを加え、析出した固体をろ取して無色固体の5-ヒドロキシ-4-ベンジルブテノライドを収率60%、GC純度99.6%で得た。

[0072] [化6]



[0073] 上述のようにして合成した4種のブテノライド化合物、すなわち、5H4PB（式（1）における R^2 ：フェニル基）、5-ヒドロキシ-4-（4-メチルフェニル）ブテノライド（式（1）における R^2 ：メチルフェニル基）、5-ヒドロキシ-4-ベンジルブテノライド（式（1）における R^2 ：ベンジル基）及び5-ヒドロキシ-4-（4-メチルベンジル）ブテノライド（式（1）における R^2 ：メチルベンジル基）について、以下表1に示す被検試料濃度における試験を行った。PPAR γ リガンド活性の測定は、被検試料添加後のインキュベート時間を48時間とした以外は、実施例7と同様にして行った。結果を以下表1及び図13に示す。以下表に示す値及び図の縦軸はコントロール物質（DMSO）の活性に対する各合成品の活性の割合（%）である。表1及び図13では被検試料である各種ブテノライド化合物を式（1）における R^2 の官能基で表わしている。

[0074]

[表1]

		被検試料濃度 ($\mu\text{g/mL}$)								
		0.032	0.08	0.16	0.4	0.8	2	4	10	20
式 1 の R 2	フェニル(5H4PB)	100	80	120	120	220*	370*	520*	710*	—
	メチルフェニル	170	110	120	180	260*	560*	710*	1270*	—
	ベンジル	120	220	110	130	170	310*	360*	—	—
	メチルベンジル	130	110	120	130	140	130	240*	340*	520*

[0075] 表1及び図13に示すように、4種の被検試料いずれもPPAR γ リガンド活性を有することがわかった。このうち、表1において*が付された数値の試験区はコントロールに比べて2倍以上の活性を示し、 $p < 0.05$ （有意差有り）であった。この結果より、5H4PB（ R^2 ：フェニル基）及び5-ヒドロキシ-4-(4-メチルフェニル)ブテノライド（ R^2 ：メチルフェニル基）は $0.8 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の範囲で高い活性を示し、5-ヒドロキシ-4-ベンジルブテノライド（ R^2 ：ベンジル基）は $2 \sim 4 \mu\text{g/mL}$ の範囲で高い活性を示し、5-ヒドロキシ-4-(4-メチルベンジル)ブテノライド（ R^2 ：メチルベンジル基）は $4 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ の範囲で高い活性を示すことが分かった。このうち、5H4PB及び5-ヒドロキシ-4-(4-メチルフェニル)ブテノライドは低濃度範囲において高い活性を有し、特に5-ヒドロキシ-4-(4-メチルフェニル)ブテノライドは最も高い活性を有することが明らかとなった。

[0076] [実施例9 食餌性肥満モデルマウスに対する抗肥満作用の検証]

実施例6で得た5H4PBを、高脂肪食を給餌したマウスに投与し、その抗肥満作用を検証した。5週齢の雄性C57BL/6Jマウス（供給源：日本チャールス・リバー株式会社）を温度が $20 \sim 26^\circ\text{C}$ 、湿度が $35 \sim 75\%$ 、照明が12時間（7:00～19:00）の環境条件下にて、1ケージあたり1匹ずつ単飼した。1週間程度馴化させた後、以下表2に示すように、6～8匹ずつ6群に分けた。試験群のうち、ノーマル群には、試験期間中、通常固形飼料CRF1（オリエンタル酵母株式会社製品、 3.57 kca

1 / g) を給餌し、コントロール群及び薬剤投与群には、試験期間中、高カロリー固形飼料 D 1 2 4 9 2 (リサーチダイエツト社製品、5. 2 4 k c a l / g) を給餌した。飼料は自由摂取とし、飲水も給水瓶からの自由飲水とした。

[0077] [表2]

NO.	試験群	薬剤投与量	給餌飼料	個体数
1	ノーマル	—	通常飼料 CRF1 (3.57kcal/g)	6
2	コントロール	—	高脂肪飼料 D12492 (5.24kcal/g)	8
3	5H4PB	0.037 μ g/kg/日		8
4		0.01mg/kg/日		8
5	ロシグリタゾン (陽性対照)	0.037 μ g/kg/日		6
6		10mg/kg/日		6

[0078] 各薬剤投与群のマウスに対し、被検物質である5H4PB (実施例6にて製造) 又は陽性対照物質であるロシグリタゾン (和光純薬工業株式会社製品) を、表2に示す所定の投与量で1日1回12週間に亘り投与した。なお、ロシグリタゾンは選択的PPAR γ リガンドであり、PPAR γ と結合してグルコース、脂肪酸、インスリンの血中濃度を低下させる作用を有する物質である。投与にあたっては、週に1回体重測定を行い、各個体への投与量を算出した。5H4PB及びロシグリタゾンはそれぞれ0.5w/v%メチルセルロース水溶液に懸濁させ、同水溶液にて希釈して、投与容量が10mL/kgとなるように調整したのち、注射筒及びフレキシブル胃ゾンデを用いて胃内に強制投与した。なお、ノーマル群及びコントロール群のマウスに対しては、0.5w/v%メチルセルロース水溶液のみを10mL/kgの投与容量で1日1回12週間に亘り投与した。

[0079] 試験 (投与) 開始から週1回の頻度で各個体の体重を測定し、試験群ごとの平均値を求めた。結果を図14に示す。図の縦軸はマウスの体重 (g) であり、横軸は試験開始からの日数 (日) を示している。図14に示すように、コントロール群は、試験開始21日以降、ノーマル群と比較して体重の有意な増加が認められた。また、5H4PBを投与した群では、コントロール

群と比べて、高カロリー食による体重増加が抑制されることが示された。具体的には、試験終了時点（84日目）における高カロリー食によるコントロール群の体重増加量（コントロール群の体重からノーマル群の体重を減じた値）に対し、5H4PBを $0.037\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与した試験群は体重増加が25.8%抑制され、5H4PBを $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 投与した試験群は体重増加が27.8%抑制された。このように、5H4PBは高い抗肥満効果があることが認められた。一方、PPAR γ リガンド活性を有するロシグリタゾンの投与結果によれば、ロシグリタゾンを $0.037\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与した低用量の試験群ではコントロール群よりも体重が増加し、抗肥満効果は観察されなかった。また、ロシグリタゾンを $10\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 投与した高用量の試験群については5H4PBを $0.037\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 投与した試験群と比較しても体重増加抑制率は低かった。これらより、5H4PBは低用量の投与であっても抗肥満効果が得られることがわかった。

[0080] [実施例10 食餌性肥満モデルマウスにおける血中アディポネクチンの測定]

アディポネクチンは、インスリン抵抗性や糖尿病、動脈硬化等の代謝異常症候群と関係する分泌蛋白である。アディポネクチン欠損マウスは、野生型マウスと比べてインスリン抵抗性を発症しやすく、動脈硬化に罹患しやすい性質を有しており、ヒトにおいてもアディポネクチン濃度の低下と糖尿病及び動脈硬化等の代謝異常症候群とが関連することが知られている。そこで、実施例9における食餌性肥満モデルマウスについて、血中アディポネクチン量を測定する試験を行った。

[0081] 実施例9の試験開始から85日経過した雄性C57BL/6Jマウスの各個体について、2%イソフルラン麻酔下にてヘパリン添加した注射筒を用いて腹部大静脈より採血を行った。採血量は約0.8mLとした。採取した血液は遠心分離するまで氷冷下で保存し、遠心分離（条件：4℃、約1800×g、10分間）した後、上層を回収して血漿を得た。血漿はサンプリングチューブに分注し、測定を行うまで冷凍保存した。各個体から得たマウス血

漿中に含まれるマウスアディポネクチン濃度を市販のELISAキットを用いて測定し、試験群ごとの平均値を求めた。結果を図15に示す。

[0082] 図の縦軸はマウス血漿中のアディポネクチンの濃度 (ng/mL) であり、棒グラフの各バーは、左側からノーマル群、コントロール群、5H4PB 0.037 μg/kg/日投与群、5H4PB 0.01 mg/kg/日投与群、ロシグリタゾン0.037 μg/kg/日投与群及びロシグリタゾン10 mg/kg/日投与群を示している。この結果によれば、コントロール群と比べて、5H4PBを投与した群では、アディポネクチン濃度が上昇することが認められた。また、t検定の結果、特に0.01 mg/kg/日の投与群において、有意なアディポネクチン濃度の上昇が確認された。これらのことから、5H4PBの投与により、アディポネクチンが作用するインスリン抵抗性や糖尿病、高脂血症、動脈硬化等の予防・改善効果が得られることがわかった。

[0083] [実施例11 食餌性肥満モデルマウスにおける血中インスリンの測定]

実施例10において、各個体から得たマウス血漿中に含まれるマウスインスリン量を市販のELISAキットを用いて測定し、試験群ごとの平均値を求めた。結果を図16に示す。図の縦軸はマウス血漿中のインスリン濃度 (ng/mL) であり、棒グラフの各バーが示す試験群は上述した図15と同様である。この結果によれば、肥満による高インスリン血症が認められるコントロール群と比べて、5H4PBを投与した群では、特に低用量の群において、インスリン濃度の上昇が抑制されていることが確認された。これらのことから、5H4PBの投与により、インスリン抵抗性や糖尿病の予防・改善効果が得られることがわかった。

[0084] [実施例12 食餌性肥満モデルマウスにおける血中レプチンの測定]

レプチンは、食欲と代謝の調節を行うタンパク質ホルモンであるが、肥満により血中レプチン濃度が上昇し、レプチン抵抗性が生じることが知られている。実施例10において、各個体から得たマウス血漿中に含まれるマウスレプチン量を市販のELISAキットを用いて測定し、試験群ごとの平均値

を求めた。結果を図17に示す。図の縦軸はマウス血漿中のレプチン濃度（ pg/mL ）であり、棒グラフの各バーが示す試験群は上述した図15及び図16と同様である。この結果によれば、肥満による高レプチン血症が認められるコントロール群と比べて、5H4PBを投与した群では、用量依存的にレプチン濃度の上昇が抑制されていることが確認された。これらのことから、5H4PBの投与により、レプチン抵抗性や肥満の予防・改善効果が得られることがわかった。

[0085] [実施例13 食餌性肥満モデルマウスにおける皮下脂肪量及び内臓脂肪量の測定]

実施例9の試験開始から85日経過した雄性C57BL/6Jマウスの各個体について、2%イソフルラン麻酔下にて採血後、安楽死させた。各個体から鼠径部皮下脂肪、精巣周囲脂肪、腎臓周囲脂肪及び腸間膜脂肪を採取して各脂肪の重量を測定し、試験群ごとの平均値を求めた。

[0086] 結果を図18(A)～(D)に示す。各図の縦軸は測定した各脂肪組織の重量(g)であり、棒グラフの各バーは、左側からノーマル群、コントロール群、5H4PB $0.037\mu\text{g/kg}$ /日投与群、5H4PB 0.01mg/kg /日投与群、ロシグリタゾン $0.037\mu\text{g/kg}$ /日投与群及びロシグリタゾン 10mg/kg /日投与群を示している。図18に示すように、この結果によれば、コントロール群と比べて、5H4PBを投与した群では、高カロリー食による皮下脂肪及び内臓脂肪の蓄積が抑制されることが示された。具体的には、高カロリー食によるコントロール群の各脂肪組織の増加量（コントロール群の脂肪組織重量からノーマル群の脂肪組織重量を減じた値）に対して、5H4PBを $0.037\mu\text{g/kg}$ /日投与した試験群では、鼠径部皮下脂肪は約35%、精巣周囲脂肪は約18%、腎臓周囲脂肪は約13%及び腸間膜脂肪は約16%、それぞれ脂肪組織の増加が抑制され、5H4PBを 0.01mg/kg /日投与した試験群では、鼠径部皮下脂肪は約34%、精巣周囲脂肪は約15%、腎臓周囲脂肪は約13%及び腸間膜脂肪量は約40%、それぞれ脂肪組織の増加が抑制された。このように、

5 H 4 P Bは低用量の投与において皮下脂肪及び内臓脂肪の蓄積抑制効果があることが認められた。また、P P A R γ リガンド活性を有するロシグリタゾンの投与結果によれば、ロシグリタゾンを低用量（0.037 μ g/kg/日）で投与した試験群ではコントロール群よりも内臓脂肪量が増加し、内臓脂肪の蓄積抑制効果は観察されなかった。これらより、5 H 4 P Bは低用量の投与であっても皮下脂肪及び内臓脂肪の蓄積抑制効果が得られることがわかった。

[0087] [実施例14 5 H 4 P Bの投与による肝臓組織への影響の検討]

実施例13において、各個体から脂肪組織を採取する際に、肝臓を採取して病理組織検査を行った。病理組織検査所見は以下の通りであった。

[0088] ノーマル群の個体については、肝細胞内に脂肪滴の沈着は認められず、ごく軽度の炎症性細胞の浸潤のみが認められた。他方、コントロール群の個体については、8個体のうち7個体に肝細胞内に小型～大型脂肪滴の沈着がごく軽度～軽度に認められ、ノーマル群と同様に炎症性細胞の浸潤がごく軽度に認められた。5 H 4 P Bを0.037 μ g/kg/日投与した試験群及び0.01 mg/kg/日投与した試験群については、肝細胞内の脂肪滴の沈着が全く無いかあるいは弱い沈着に留まった。ロシグリタゾン0.037 μ g/kg/日投与群では、肝細胞内に微細・小型・大型脂肪滴が混在してごく軽度～軽度の沈着が認められ、ロシグリタゾン10 mg/kg/日投与群では、これら脂肪滴は増加し、中程度の沈着が認められると共に肝細胞は軽度の肥大を呈していた。

[0089] これらの病理組織検査所見によれば、ロシグリタゾン投与群やコントロール群と比較して、5 H 4 P Bによる肝障害は認められなかった。これにより、5 H 4 P Bが安全性の高い成分であることが確認された。

[0090] 以上述べた実施例は全て本発明を例示的に示すものであって限定的に示すものではなく、本発明は他の種々の変形態様及び変更態様で実施することができる。従って本発明の範囲は特許請求の範囲及びその均等範囲によるのみ規定されるものである。

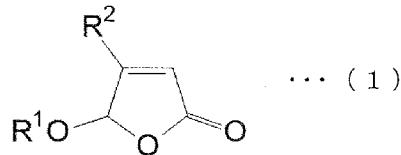
産業上の利用可能性

[0091] 本発明は P P A R γ が関与する生活習慣病やその他病態を予防又は改善する P P A R γ 活性化剤を提供するため、医療や食品分野（サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品等も含む）の産業において幅広く役立つものである。

請求の範囲

[請求項1] 式(1)で表わされるブテノライド化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することを特徴とするPPAR γ 活性化剤。

[化1]



[式(1)中、R¹は水素原子、リン酸基、脂肪酸基、置換基を有していてもよい炭素数1~4のアルキル基又は置換基を有していてもよい糖残基を示し、R²はフェニル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、エチルベンジル基、フェネチル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基又はエチルフェネチル基を示す。]

[請求項2] 前記R¹が水素原子、リン酸基又は置換基を有していてもよい糖残基であり、前記R²がフェニル基、4-メチルフェニル基、ベンジル基又は4-メチルベンジル基であることを特徴とする請求項1に記載のPPAR γ 活性化剤。

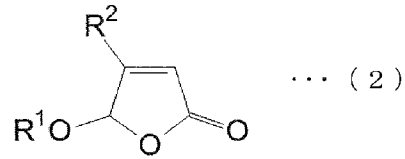
[請求項3] 糖尿病、インスリン抵抗性、肥満症、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、レプチン抵抗性、脂質代謝異常、高脂血症、動脈硬化及びメタボリックシンドロームからなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは治療のための医薬であって、請求項1又は2に記載のPPAR γ 活性化剤を含む医薬。

[請求項4] 糖尿病、インスリン抵抗性、肥満症、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、レプチン抵抗性、脂質代謝異常、高脂血症、動脈硬化及びメタボリックシンドロームからなる群から選択される少なくとも一つの疾病の予防若しくは改善のためのサプリメントであって、請求項1又は2に記載のPPAR γ 活性化剤を含むサプリメント。

[請求項5] 式(2)で表わされるブテノライド化合物又はその薬学的に許容さ

れる塩を有効成分として含有することを特徴とする P P A R γ が関与する病態、症状又は疾患の治療、予防、抑制又は改善用組成物。

[化2]

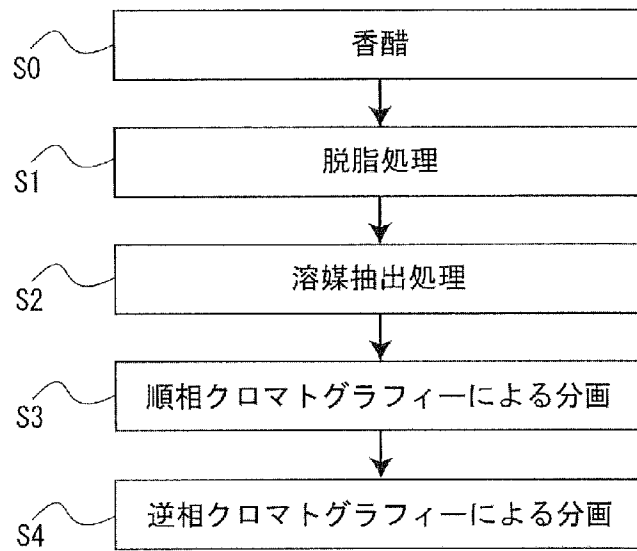


[式 (2) 中、R¹は水素原子、リン酸基、脂肪酸基、置換基を有していてもよい炭素数 1～4 のアルキル基又は置換基を有していてもよい糖残基を示し、R²はフェニル基、メチルフェニル基、ジメチルフェニル基、エチルフェニル基、ベンジル基、メチルベンジル基、ジメチルベンジル基、エチルベンジル基、フェネチル基、メチルフェネチル基、ジメチルフェネチル基又はエチルフェネチル基を示す。]

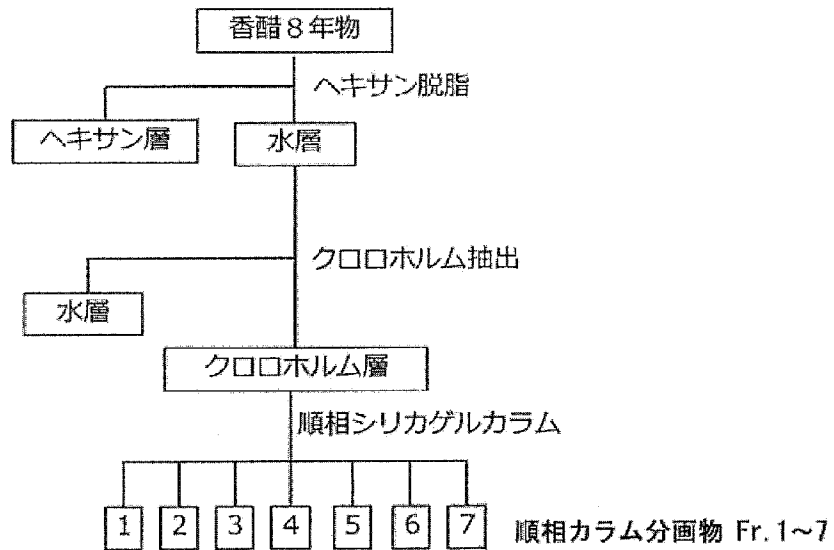
[請求項6]

前記 P P A R γ が関与する病態、症状又は疾患が、糖尿病、インスリン抵抗性、肥満症、体重増加、内臓脂肪蓄積、皮下脂肪蓄積、レプチン抵抗性、脂質代謝異常、高脂血症、動脈硬化及びメタボリックシンドロームからなる群から選択される 1 種以上の病態、症状又は疾患であることを特徴とする請求項 5 に記載の組成物。

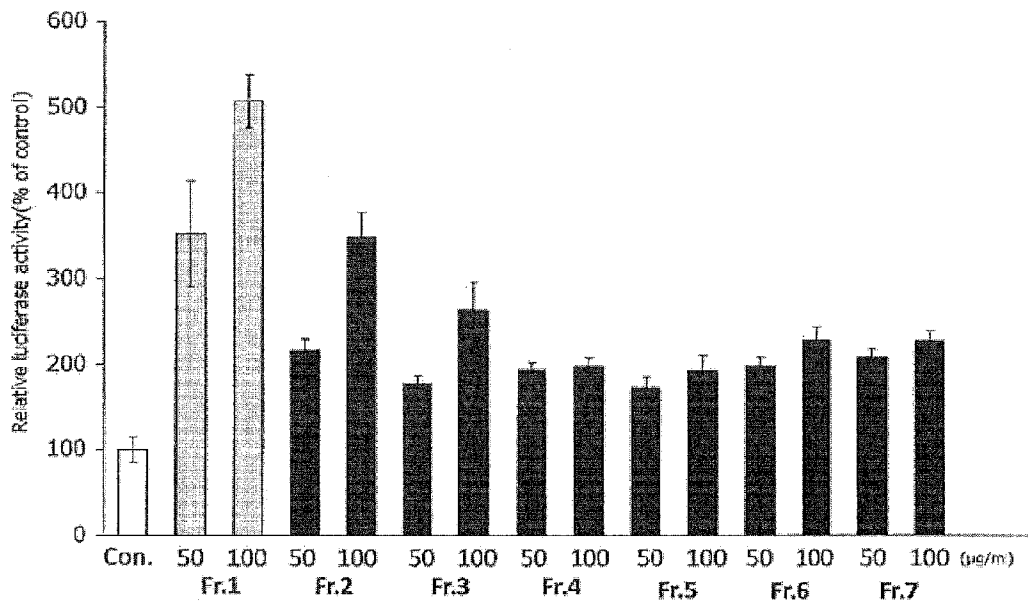
[図1]



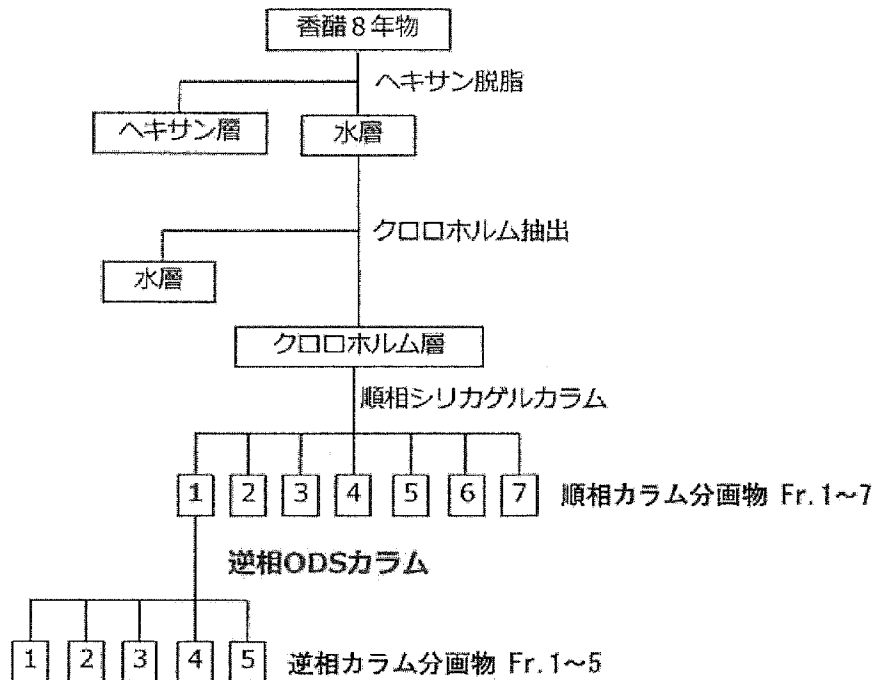
[図2]



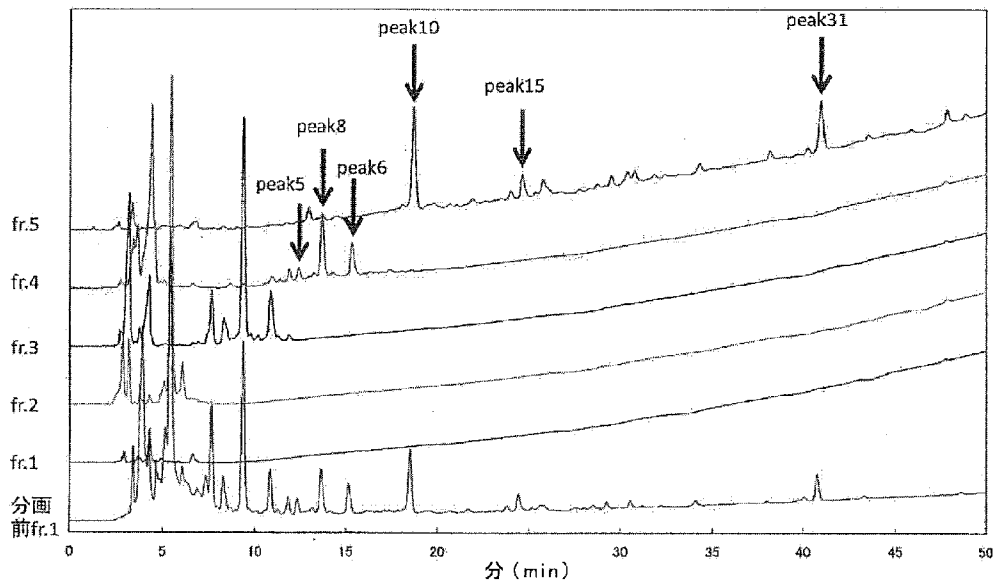
[図3]



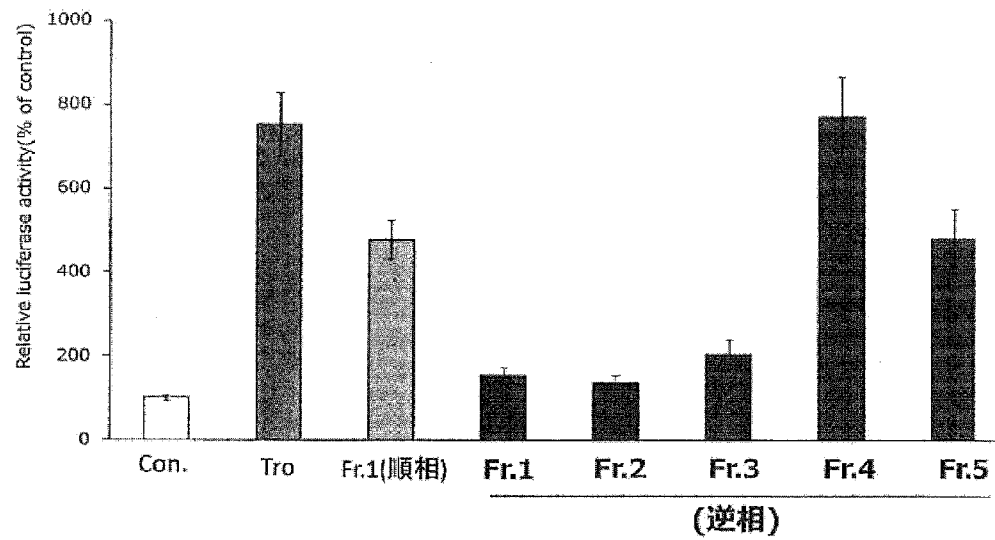
[図4]



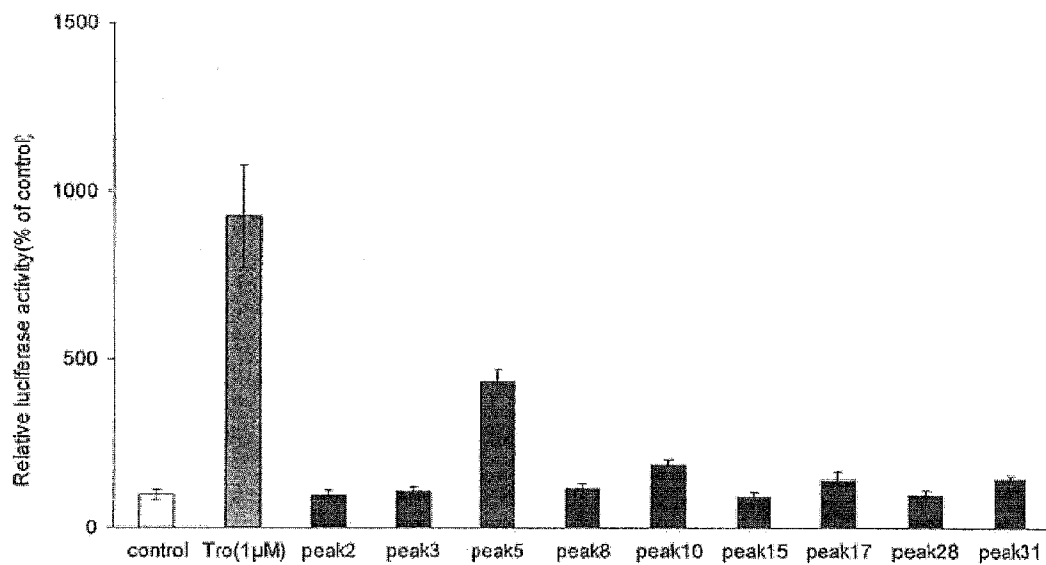
[圖5]



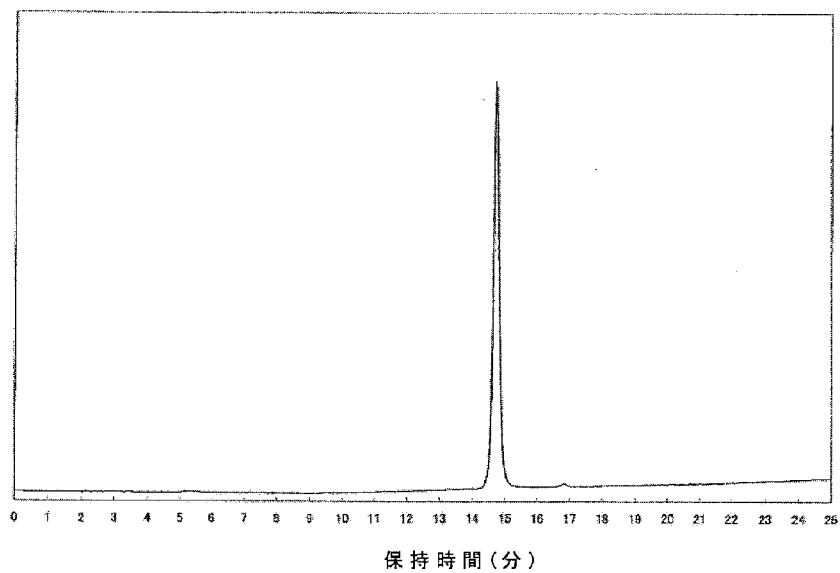
[圖6]



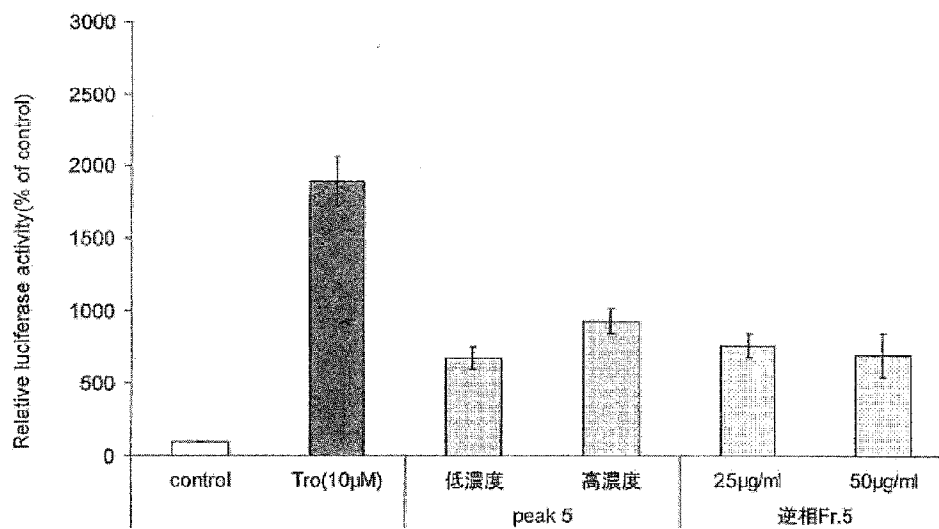
[圖7]



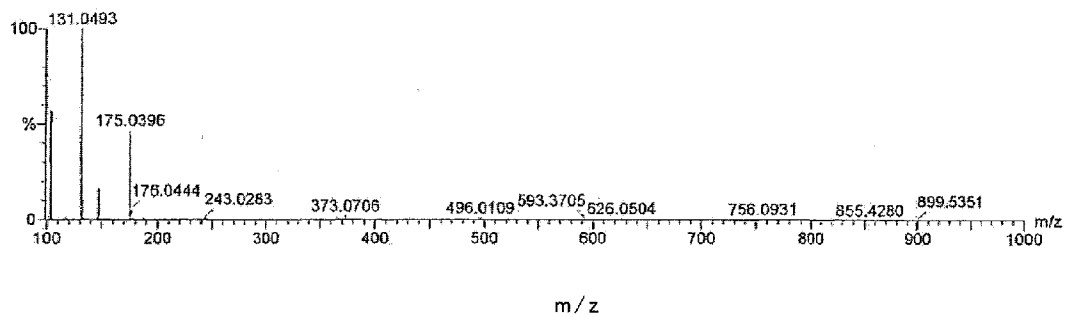
[図8]



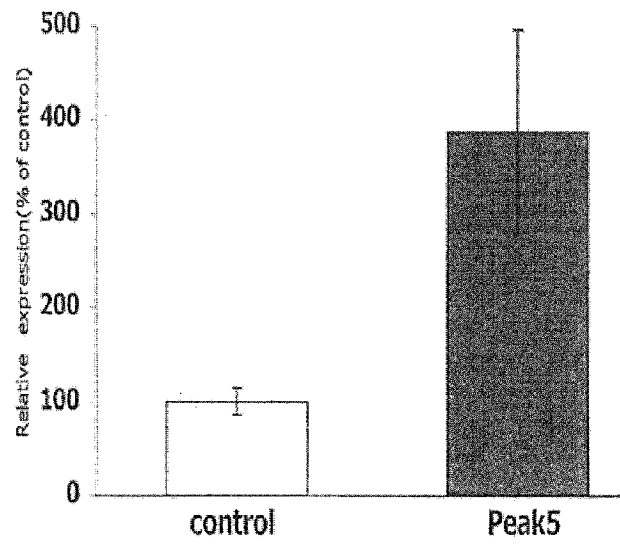
[図9]



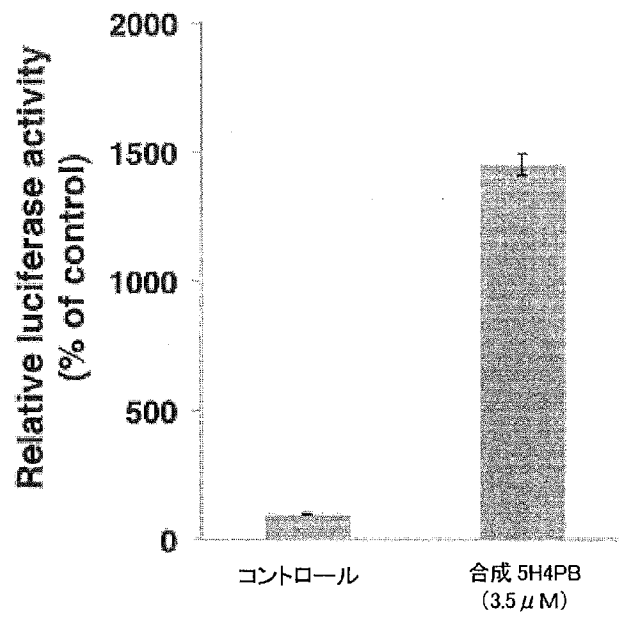
[図10]



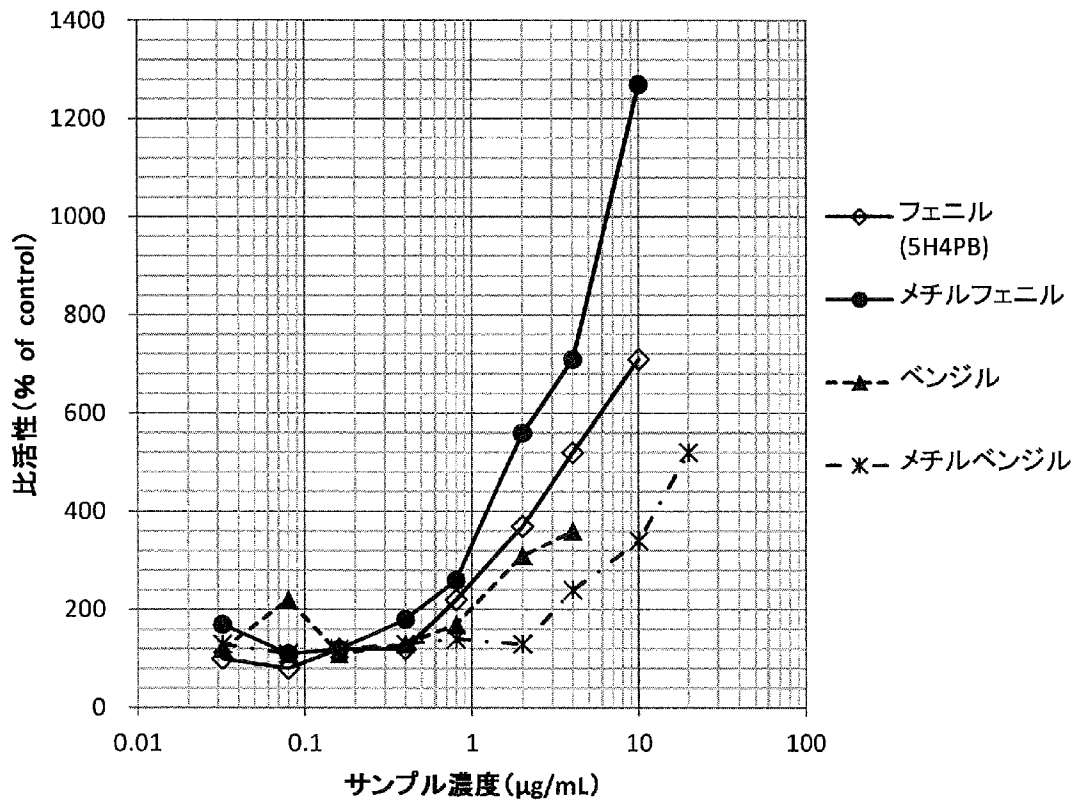
[図11]



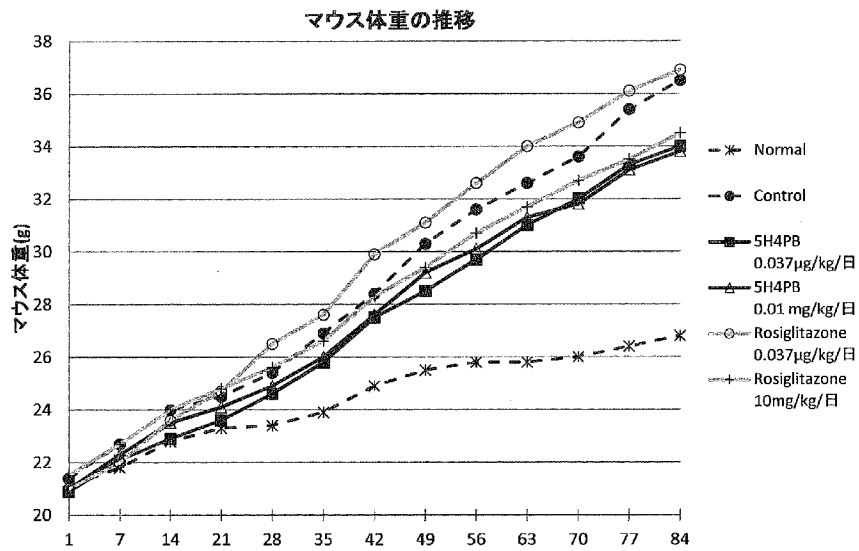
[図12]



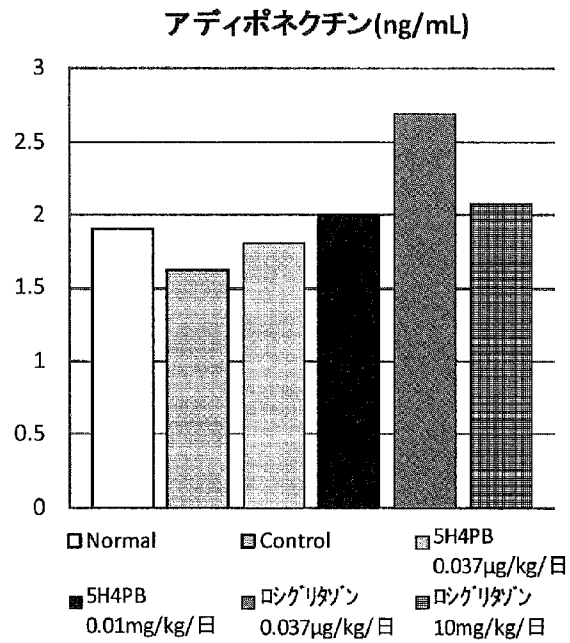
[図13]



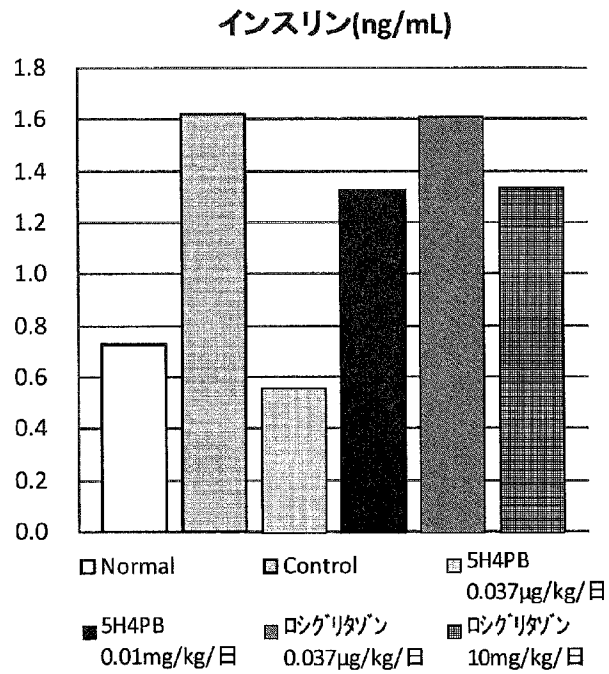
[図14]



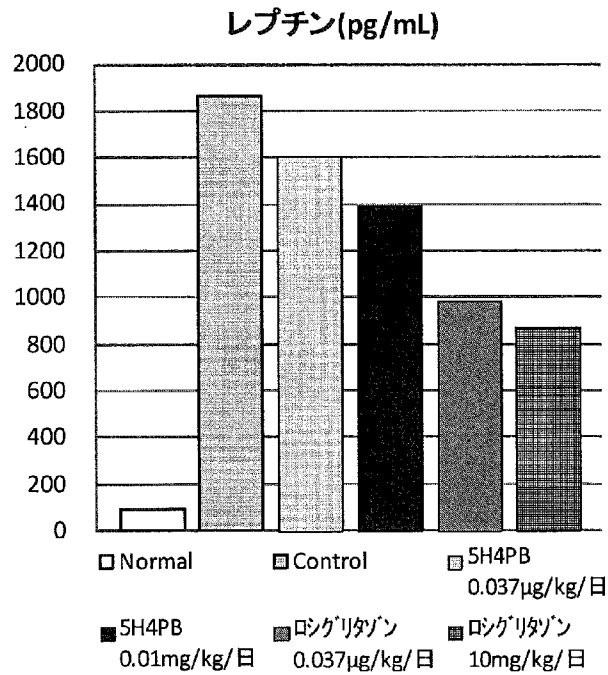
[図15]



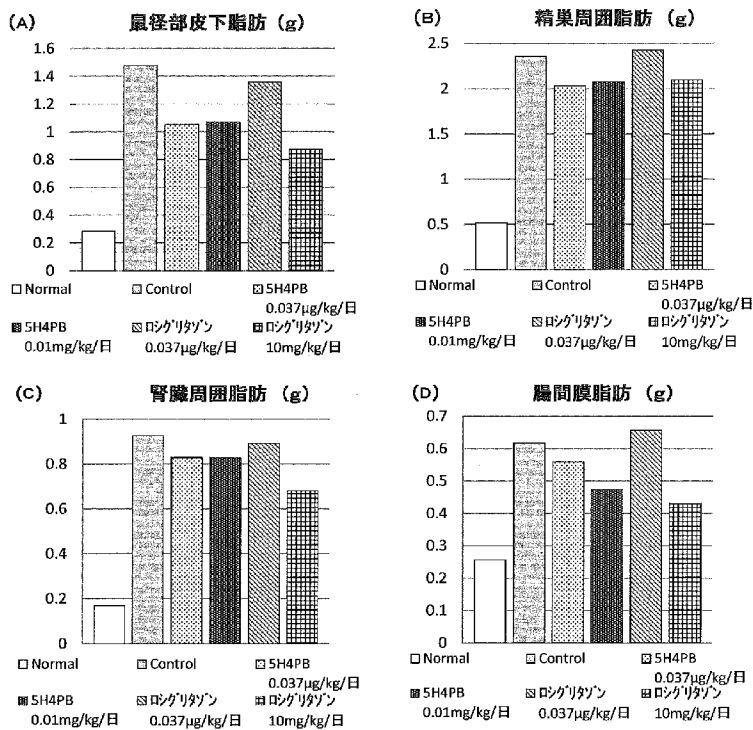
[図16]



[図17]



[図18]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/069281

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K31/341(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)
A61K31/341, A61P3/06, A61P3/10, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/REGISTRY (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP 2005-168387 (Kabushiki Kaisha OT Enterprise), 30 June 2005 (30.06.2005), claims 1 to 4; examples 1 to 3 (Family: none)	1, 2, 4-6 3
X	JP 2011-51952 A (Kojun Japan Co., Ltd.), 17 March 2011 (17.03.2011), claims 1 to 4; paragraphs [0009] to [0012]; examples (Family: none)	1-6
X	JP 2009-249322 A (Kojun Japan Co., Ltd.), 29 October 2009 (29.10.2009), claims 1 to 8; examples (Family: none)	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"L" 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)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 23 July 2015 (23.07.15)	Date of mailing of the international search report 18 August 2015 (18.08.15)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/069281

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/187381 A1 (Kojun Japan Co., Ltd.), 19 December 2013 (19.12.2013), claims 1 to 7; examples (Family: none)	1-6
A	SIMONE, R.D. et al., Toward the Discovery of New Agents Able to Inhibit the Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Enzyme as Promising Tools in Drug Development, Chem. Biol. Drug Des., 2010, Vol.76, p.17-24	1-6

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K31/341(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A61K31/341, A61P3/06, A61P3/10, A61P43/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） CAplus/REGISTRY (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A X	JP 2005-168387 A（株式会社オー・ティーエンタープライズ） 2005.06.30, 請求項 1-4, 実施例 1-3 （ファミリーなし） JP 2011-51952 A（日本恒順株式会社） 2011.03.17, 請求項 1-4, [0009]-[0012], 実施例 （ファミリーなし）	1, 2, 4-6 3 1-6
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 23.07.2015	国際調査報告の発送日 18.08.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA/J P） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 高橋 樹理 電話番号 03-3581-1101 内線 3452	4 C 4498

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2009-249322 A (日本恒順株式会社) 2009. 10. 29, 請求項 1-8, 実施例 (ファミリーなし)	1-6
A	WO 2013/187381 A1 (日本恒順株式会社) 2013. 12. 19, 請求項 1-7, 実施例 (ファミリーなし)	1-6
A	SIMONE, R.D. et al., Toward the Discovery of New Agents Able to Inhibit the Expression of Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Enzyme as Promising Tools in Drug Development, Chem. Biol. Drug Des., 2010, Vol. 76, p. 17-24	1-6