

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-15428

(P2014-15428A)

(43) 公開日 平成26年1月30日(2014.1.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/18 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 Z N A C	4 B O 2 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C O 8 8
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2012-154871 (P2012-154871)	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1 〇号
(22) 出願日	平成24年7月10日 (2012.7.10)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サテライト細胞分化促進剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】植物由来のサテライト細胞分化促進剤、筋量改善剤、筋力改善剤、筋萎縮抑制剤、および非治療的な筋量改善方法、筋力改善方法、又は筋萎縮抑制方法の提供。

【解決手段】キョウチクトウ科の多年生植物であり、その葉は羅布麻(ラフマ)茶又は燕龍(ヤンロン)茶として飲用されているラフマ又はその抽出物を有効成分とする、サテライト細胞分化促進剤、筋量改善剤、筋力改善剤、筋萎縮抑制剤、および非治療的な筋量改善方法、筋力改善方法、又は筋萎縮抑制方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラフマ又はその抽出物を有効成分とするサテライト細胞分化促進剤。

【請求項 2】

ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋量改善剤。

【請求項 3】

ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋力改善剤。

【請求項 4】

ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋萎縮抑制剤。

【請求項 5】

対象にラフマ又はその抽出物を有効量で摂取させることを含む、非治療的サテライト細胞分化促進方法、非治療的筋量改善方法、非治療的筋力改善方法、又は非治療的筋萎縮抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サテライト細胞分化促進剤に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、交通手段の発達や情報・通信技術の発展に伴い、運動が不足している。運動不足による筋量や筋力の低下は、運動機能の低下の原因となり、特に高齢者にとっては、加齢による筋変化と相俟って、その後の生活の質（QOL）に重大な悪影響をもたらすと考えられる。筋萎縮、又は筋量や筋力の低下に起因する日常動作中の転倒、及びそれに伴う骨折等は高齢者における主要な寝たきりの原因である。

一般的に、筋萎縮、又は筋量や筋力の低下を防ぐ手段としては、適度な運動を実践する、或いはリハビリテーションを実践する等がある。しかし、時間的又は物理的理由、モチベーションの維持の困難さ等から、運動の継続的实践は現実的には難しい。筋萎縮、又は筋量や筋力の低下を防ぐためのより効果的な方法が望まれている。

【0003】

栄養学的アプローチにより運動機能を調節し得る成分の探索が行われている。例えば、プロアントシアニジンを含む有効成分とする筋萎縮抑制剤（特許文献1）、果実由来のポリフェノールを含む有効成分とする筋張力増強剤及び体脂肪調整剤（特許文献2）等が提案されている。また、発酵茶から抽出された高分子ポリフェノールを含む有効成分とする筋肉遅筋化促進剤（特許文献3）が提案されている。

しかしながら、従来方法は効果の面で十分とは云えず、また、特許文献3では、持久性運動と組み合わせたときの骨格筋の筋線維タイプの変化（IIbからIIaへの移行、遅筋化）促進が検討されているものの、運動不足や加齢等に伴う筋萎縮、筋量の低下に対する効果は何ら検討されていない。

【0004】

筋には、筋肥大と筋萎縮に関するプロセスがそれぞれ存在し、これらのプロセスの働きにより筋量が制御されていると考えられている（非特許文献1）。これら筋肥大と筋萎縮のプロセスを制御することで、筋萎縮や筋量の低下を防止することができる。

【0005】

サテライト細胞は、筋線維の基底膜と細胞膜の間隙に存在する幹細胞である。サテライト細胞は、通常は未分化な状態にあるが、筋が損傷したり筋が成長したりするときには活性化されて増殖し、筋管細胞へと分化して筋線維を形成する。筋組織を増強させる因子として知られているIGF-1の過剰発現により、サテライト細胞の筋管細胞への分化が促進されたことが報告されている（非特許文献1～2）。

したがって、サテライト細胞の分化を促進することで、筋肉の肥大及び再生を促すことができ、筋量及び筋力の増加や、筋萎縮の予防又は改善を実現することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 6 】

ラフマは、キョウチクトウ科の多年生植物であり、その葉は羅布麻（ラフマ）茶又は燕籠（ヤンロン）茶として飲用されている。ラフマはフラボノイドを多く含み、血圧抑制に効果があることが知られている（非特許文献4）。

一方、ラフマのサテライト細胞分化に対する作用はこれまで知られていなかった。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 2 - 3 3 8 4 6 4 号 公 報

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 0 5 / 0 7 4 9 6 2 号

【 特許文献 3 】 特開 2 0 1 0 - 3 7 3 2 3 号 公 報

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 TRENDS Mol Med, 2003, Vol.9(8):344-350

【 非特許文献 2 】 Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290:C453-C462

【 非特許文献 3 】 Proc Natl Acad Sci USA, 1998, Vol.95:15603-15607

【 非特許文献 4 】 Clin Exp Pharmacol Physiol, 2005, 32:789-795

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、サテライト細胞の分化を促進し、筋量及び筋力を向上させ、筋萎縮を抑制する素材の提供に関する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明者は、サテライト細胞の分化を促進する物質について鋭意研究を重ねた結果、ラフマ又はその抽出物に、優れたサテライト細胞分化促進作用があることを見出した。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は、ラフマ又はその抽出物を有効成分とするサテライト細胞分化促進剤を提供する。

また本発明は、ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋量改善剤を提供する。

また本発明は、ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋力改善剤を提供する。

また本発明は、ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋萎縮抑制剤を提供する。

また本発明は、対象にラフマ又はその抽出物を有効量で摂取させることを含む、非治療的サテライト細胞分化促進方法、非治療的筋量改善方法、非治療的筋力改善方法、又は非治療的筋萎縮抑制方法を提供する。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 2 】

本発明によれば、サテライト細胞の分化を促進することができ、さらに筋量や筋力の改善、又は筋萎縮の抑制等の効果を得ることができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 3 】

【 図 1 】 C 2 C 1 2 細胞におけるクレアチンキナーゼ活性。

【 図 2 】 C 2 C 1 2 細胞におけるミオシン重鎖遺伝子発現。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 4 】

本明細書において、「サテライト細胞」とは、筋線維の基底膜と細胞膜の間隙に存在する未分化の筋幹細胞である。また本明細書において、「サテライト細胞の分化促進」とは、サテライト細胞が増殖期から分化期へと移行し、周辺のサテライト細胞、又は筋線維と融合して、筋線維の主要な構成タンパク質であるミオシン重鎖を合成するようになるまでの一連の過程を亢進することをいう。

10

20

30

40

50

【0015】

本明細書において、「筋量改善」とは、筋量の増加及び筋量の減少の抑制を含む概念である。本明細書において「筋量増加」及び「筋量減少」とは、筋肉組織中の筋線維断面積もしくは筋線維径が増加すること、又は例えばミオシン重鎖を含む筋タンパク質の合成速度が分解速度を上回ることにより、筋組織中のタンパク質含量が増加し、筋質量が増加すること、及びその逆の概念をいう。

【0016】

本明細書において、「筋力改善」とは、筋力の増加及び筋力の減少の抑制を含む概念である。本明細書において「筋力増加」及び「筋力減少」とは、各筋肉が発揮可能な張力が増加すること、及びその逆の概念をいう。

10

【0017】

また、本明細書において「筋萎縮」とは、筋蛋白の分解速度が合成速度を上回ることにより筋細胞が減少若しくは縮小し、筋量が低下することをいう。筋萎縮は、不活動（長期間の安静臥床や骨折後のギブス固定など）に起因する重力暴露の低減による廃用性筋萎縮と、筋萎縮性側索硬化症（ALS）等の疾病による進行性筋萎縮とに大別される。さらに、加齢に伴って起こる加齢性筋減弱症（サルコペニア）でも、筋萎縮と同様の症状が起きる。したがって、本明細書における「筋萎縮」とは、不活動や加齢、疾病等による筋量の低下を包含し、「筋萎縮の抑制」とは、当該不活動や加齢、疾病等による筋量の低下を抑制することをいう。

【0018】

本明細書において、「非治療的」とは、医療行為を含まない、すなわち人間を手術、治療又は診断する方法を含まない、より具体的には医師、または医療従事者もしくは医師の指示を受けた者が人間に対して手術、治療又は診断を実施する方法を含まない概念である。

20

【0019】

本明細書において、「改善」とは、疾患、症状又は状態の好転、疾患、症状又は状態の悪化の防止、抑制又は遅延、あるいは疾患又は症状の進行の逆転、防止、抑制又は遅延をいう。

【0020】

本明細書において、「予防」とは、個体における疾患若しくは症状の発症の防止、抑制又は遅延、あるいは個体の疾患若しくは症状の発症の危険性を低下させることをいう。

30

【0021】

本明細書において「ラフマ」とは、キョウチクトウ科の *Apocynum venetum* L. をいう。本発明で使用される「ラフマ」とは、ラフマの任意の部位、例えばラフマの全草、地上部、葉、茎等であり得る。本発明において、ラフマは、そのまま、又は乾燥、切断、破碎、粉末化、それらの組み合わせ等の処理の後に、本発明で使用され得、又はラフマ抽出物の調製に供され得る。

本発明で使用される「ラフマ抽出物」は、ラフマの任意の部位、例えばラフマの全草、地上部、葉、茎等から得られた抽出物であり、好ましくはラフマの全草から得られた抽出物である。ラフマ抽出物は、市販されているものを利用してよい。

40

【0022】

抽出のための溶媒には、極性溶媒、非極性溶媒のいずれをも使用することができる。溶媒の具体例としては、例えば、水；1価、2価又は多価のアルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状又は環状のエーテル類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；飽和又は不飽和の炭化水素類；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類；ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素類；ピリジン類；ジメチルスルホキシド；アセトニトリル；二酸化炭素、超臨界二酸化炭素；油脂、ワックス、その他のオイル類；ならびにこれらの混合物が挙げられる。好適には、薬理活性及び操作性の点で、水、アルコール類及びアルコール水溶液が挙げられる。

50

【0023】

上記アルコール類としては、特に限定されないが、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、アミルアルコール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール等の1価アルコール類；1,3-ブチレングリコール、エチレングリコール、プロピレングリコール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール、1,6-ヘキサジオール等の2価アルコール類；グリセリン等の3価以上のアルコール類等が挙げられる。このうち、薬理活性及び操作性の点で、1価アルコール類及び2価アルコール類が好ましい。また好ましくは、上記アルコール類は、炭素数1以上10以下、より好ましくは炭素数1以上4以下であり得る。

【0024】

上記アルコール類の好ましい例としては、メタノール、エタノール、1,3-ブチレングリコール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、t-ブタノール等が挙げられる。

【0025】

上記アルコール水溶液における、アルコール濃度(v/v)%は、特に限定されないが、0.1(v/v)%以上が好ましく、5(v/v)%以上がより好ましく、20(v/v)%以上がさらに好ましく、30(v/v)%以上がさらにより好ましく、40%以上がなお好ましい。また、99.9(v/v)%以下が好ましく、95(v/v)%以下がより好ましく、80(v/v)%以下がさらに好ましく、70(v/v)%がさらにより好ましく、60(v/v)%以下がなお好ましい。

【0026】

上記アルコール類のうち、操作性の観点から、エタノールがより好ましい。したがって、本発明で用いられるラフマ抽出物を調製するためのより好適な溶媒としては、水、エタノール及びエタノール水溶液が挙げられる。

【0027】

抽出における溶媒の使用量としては、ラフマ(乾燥質量換算)1gに対して1mL以上100mL以下が好ましい。抽出条件は、十分な抽出が行える条件であれば特に限定されないが、抽出時間としては、1分間以上2ヶ月間以下が好ましく、10分間以上5週間以下がより好ましく、抽出温度は、0以上溶媒沸点以下が好ましく、5以上70以下がより好ましい。通常、低温なら長時間、高温なら短時間の抽出を行う。

【0028】

抽出の方法としては、特に限定されず、固液抽出、液液抽出、浸漬、煎出、浸出、還流抽出、超音波抽出、マイクロ波抽出、攪拌等の通常の手段を用いることができる。抽出時間を短縮する場合には、攪拌を伴う固液抽出が望ましい。

【0029】

上述のようにして得られた抽出物は、そのまま用いることもできるが、さらに希釈、濃縮もしくは凍結乾燥等するか、及び/又は液状、粉末状もしくはペースト状に調製して用いることもできる。

【0030】

後記実施例で示すとおり、ラフマ抽出物は、骨格筋細胞におけるクレアチンキナーゼの活性を増加させ、またミオシン重鎖の遺伝子発現を亢進した。

クレアチンキナーゼ(CK)はクレアチンとATPからクレアチンリン酸とADPが生成する反応を媒介する機能を持ち、筋収縮の際のエネルギー代謝に参与する酵素である。筋細胞のCK活性は筋分化の進行と共に上昇することが知られており、一般にCK活性の上昇は筋細胞分化の指標として用いられている。

またミオシン重鎖(MyHC)は筋肉の主要構成タンパク質であり、筋収縮において重要な役割を担っている。MyHC遺伝子発現の亢進は筋収縮タンパク質の合成を亢進し、その結果筋線維の肥大や骨格筋の肥大をもたらす。

【0031】

したがって、ラフマ又はその抽出物はサテライト細胞の分化促進に有用である。またラ

10

20

30

40

50

フマ又はその抽出物は、筋量の改善、筋力の改善、又は筋萎縮の抑制等に有用である。さらにラフマ又はその抽出物は、筋量減少や筋萎縮に起因する各種疾病や症状の予防、改善又は治療に有用である。

【0032】

筋量や筋力を改善するためには、筋組織中のタンパク質合成の促進及びタンパク質分解の抑制という2つの手段があり得る（非特許文献1）。ラフマ又はその抽出物は、サテライト細胞の筋管細胞への分化を促進すること、及び筋組織中のタンパク質合成を促進することによって、筋量や筋力の改善、筋萎縮抑制等に寄与し得る。

【0033】

従って、一態様において、本発明は、ラフマ又はその抽出物を有効成分とするサテライト細胞分化促進剤を提供する。また本発明は、ラフマ又はその抽出物を有効成分とする、筋量改善剤、筋力改善剤、又は筋萎縮抑制剤を提供する。

10

【0034】

別の態様において、本発明は、サテライト細胞分化促進剤、筋量改善剤、筋力改善剤、又は筋萎縮抑制剤の製造のためのラフマ又はその抽出物の使用を提供する。

【0035】

一実施形態において、上記サテライト細胞分化促進剤、筋量改善剤、筋力改善剤、及び筋萎縮抑制剤は、ラフマ又はその抽出物から本質的に構成され得る。

【0036】

また別の態様において、本発明は、サテライト細胞分化促進、筋量改善、筋力改善、又は筋萎縮抑制のためのラフマ又はその抽出物の使用を提供する。

20

さらに別の態様において、本発明は、サテライト細胞分化促進、筋量改善、筋力改善、又は筋萎縮抑制のために使用されるラフマ又はその抽出物を提供する。

上記ラフマ又はその抽出物は、ヒトもしくは非ヒト動物、又はそれらに由来する組織、器官、細胞において使用され得、好ましくは筋組織、より好ましくはサテライト細胞を標的として使用され得る。当該使用は、治療的使用であってもよいが、健康増進、筋肉の老化防止、筋力増強による体力若しくは運動能力の維持や向上、等を目的とした非治療的使用であってもよい。

【0037】

本発明によれば、ラフマ又はその抽出物は、いずれかが単独で使用されても、組み合わせて使用されてもよい。

30

【0038】

また本発明によれば、ラフマ又はその抽出物は、サテライト細胞分化促進、筋量改善、筋力改善、又は筋萎縮抑制のための医薬、医薬部外品、化粧品、飲食品、飼料等の製造のために使用することができる。当該、医薬、医薬部外品、化粧品、飲食品、飼料等は、ヒト又は非ヒト動物用として製造され、又は使用され得る。

【0039】

上記医薬、医薬部外品及び化粧品は、ラフマ又はその抽出物を有効成分として含有する。当該医薬、医薬部外品及び化粧品は、当該ラフマ又はその抽出物を単独もしくは組み合わせて含有し得る。さらに、当該医薬、医薬部外品及び化粧品は、ラフマ又はその抽出物のサテライト細胞分化促進作用が失われない限り、他の有効成分、薬理成分、化粧成分等を含有していてもよい。

40

【0040】

上記医薬、医薬部外品及び化粧品は、ラフマ又はその抽出物から、あるいは必要に応じて薬学的に又は化粧品として許容される担体や、上記他の有効成分や薬理成分、化粧成分等を組みあわせて、常法により製造することができる。当該医薬、医薬部外品及び化粧品は、経口投与又は非経口投与のための任意の剤型に調製され得る。当該医薬、医薬部外品及び化粧品におけるラフマ又はその抽出物の含有量は、当該抽出物の乾燥質量換算で、0.01質量%以上とするのが好ましく、0.1質量%以上とするのがより好ましく、1質量%以上とするのがさらに好ましい。また、100質量%以下とするのが好ましく、70質

50

量%以下とするのがより好ましく、50質量%以下とするのがさらに好ましい。

【0041】

上記飲食品や飼料は、サテライト細胞分化促進、筋量改善、筋力改善、又は筋萎縮抑制等の機能を得ることを企図し、当該機能を必要に応じて表示した飲食品、機能性飲食品、病者用飲食品、特定保健用飲食品、飼料、ペットフード等であり得る。

【0042】

上記飲食品は、あらゆる形態及び種類の食品及び飲料を含み得、特に限定されない。例えば、食品の形態は、固形、半固形、液状等の任意の形態であってよく、またその種類も特に限定されない。上記飼料は、任意の動物のための飼料又はペットフードであってよく、その形態や種類も上記飲食品の場合と同様に特に限定されない。

10

【0043】

上記飲食品や飼料は、ラフマ又はその抽出物を有効成分として含有する。当該飲食品、飼料、又はそれらの原料は、ラフマ又はその抽出物を単独で含有していてもよく、あるいは他の食材や、溶剤、軟化剤、油、乳化剤、防腐剤、香料、安定剤、着色剤、酸化防止剤、保湿剤、増粘剤等の添加剤を組み合わせる含有していてもよい。当該飲食品又は飼料中のラフマ又はその抽出物の含有量は、抽出物の乾燥質量として、0.001質量%以上が好ましく、0.01質量%以上がより好ましく、0.05質量%以上がさらに好ましい。また、10質量%以下が好ましく、5質量%以下がより好ましく、1質量%以下がさらに好ましい。

【0044】

なお別の態様において、本発明は、サテライト細胞の分化を促進する方法を提供する。また本発明は、筋量を改善する方法を提供する。また本発明は、筋力を改善する方法を提供する。また本発明は、筋萎縮を抑制する方法を提供する。当該方法は、対象に、ラフマ又はその抽出物を有効量で投与するか、または摂取させることを含む。

20

上記方法は、治療的方法であってもよいが、健康増進、筋肉の老化防止、筋力増強による体力若しくは運動能力の維持や向上、等を目的とした非治療的なサテライト細胞分化促進、筋量改善、筋力改善、又は筋萎縮抑制方法であってもよい。

【0045】

上記方法における「対象」としては、サテライト細胞分化促進を必要とする動物、筋量の改善を必要とする動物、筋力の改善を必要とする動物、筋萎縮の抑制を必要とする動物、筋量減少や筋萎縮に起因する各種疾病に罹患する動物、等が挙げられる。上記動物は、好ましくはヒト又は非ヒト哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。

30

例えば、上記「対象」のさらなる例としては、筋力の向上を望むアスリート；不活動や加齢、疾病等による筋量や筋力の低下に悩むヒトや動物、例えば、加齢性筋減弱症（サルコペニア）患者、神経-筋疾患（炎症性筋疾患、内科的疾患に伴うミオパチー、筋ジストロフィー、先天性ミオパチー、ミトコンドリア脳筋症、糖原病等）患者、運動不足者、ベッドレスト者、外科的もしくは内科的疾患後のリハビリトレーニング中の者；筋力の低下や日常生活の支障の問題はないが、体力や筋力の維持や向上を所望するヒト；現状では筋力の低下の問題はないが、将来予想される加齢や不活動等による筋力低下を予防することが所望される又は所望するヒトや動物、等が挙げられる。

40

【0046】

上記方法における投与または摂取の「有効量」は、対象においてサテライト細胞の分化の促進を達成できる量であり得る。好ましくは、有効量は、筋組織におけるサテライト細胞の分化活性を、投与前の5%以上、好ましくは20%以上に増加させることができる量であり得る。また好ましくは、有効量は、筋組織におけるMyHC遺伝子発現を、投与前の10%以上、好ましくは30%以上に亢進させることができる量であり得る。また好ましくは、有効量は、筋線維の断面積を、筋組織における全筋線維の平均値として、投与前の5%以上、好ましくは20%以上に増加させることができる量であり得る。

筋組織におけるサテライト細胞の分化活性は、例えば、当該筋組織に分布するサテライト細胞における筋分化マーカー分子の発現頻度を免疫染色等の常法により測定することに

50

よって決定することができる。例えば、筋組織切片をサテライト細胞マーカー分子（Pax7、m-cadherin等）抗体と筋分化マーカー分子（myogenin等）抗体により二重染色し、全サテライト細胞に占める分化マーカー分子陽性細胞の割合を測定することにより、分化活性を評価することができる。

MyHC遺伝子の発現量は、定量PCR等の常法により測定することができる。

筋線維の断面積は、例えば、免疫組織学染色した筋組織を顕微鏡観察することにより決定することができる。

【0047】

投与または摂取の有効量は、対象の種、体重、性別、年齢、状態又はその他の要因に従って変動し得る。投与または摂取の用量、経路、間隔は、当業者によって適宜決定され得る。例えば、上記本発明の方法における有効量は、ラフマ抽出物の乾燥質量換算で、成人（60kg）1人当たり、0.01mg/日以上が好ましく、0.1mg/日以上がより好ましく、1mg/日以上がさらに好ましい。また、5000mg/日以下が好ましく、3000mg/日以下がより好ましく、1000mg/日以下がさらに好ましい。

投与は全身投与でも局所投与でもよいが、好ましくは筋組織、より好ましくはサテライト細胞を標的とした投与であり得る。

【0048】

本発明の例示的实施形態として、さらに以下の組成物、製造方法、用途又は方法を本明細書に開示する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない。

【0049】

<1>ラフマ又はその抽出物を有効成分とするサテライト細胞分化促進剤。

【0050】

<2>ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋量改善剤。

【0051】

<3>ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋力改善剤。

【0052】

<4>ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋萎縮抑制剤。

【0053】

<5>ラフマ又はその抽出物を有効成分とする筋量減少や筋萎縮に起因する各種疾病や症状の予防、改善又は治療剤。

【0054】

<6>ラフマ抽出物がラフマの水、エタノール又はエタノール水溶液の抽出物である、<1>~<5>のいずれか1に記載の剤。

【0055】

<7>サテライト細胞分化促進のためのラフマ又はその抽出物の使用。

【0056】

<8>筋量改善のためのラフマ又はその抽出物の使用。

【0057】

<9>筋力改善のためのラフマ又はその抽出物の使用。

【0058】

<10>筋萎縮抑制のためのラフマ又はその抽出物の使用。

【0059】

<11>筋量減少や筋萎縮に起因する各種疾病や症状の予防、改善又は治療のためのラフマ又はその抽出物の使用。

【0060】

<12>ラフマ抽出物がラフマの水、エタノール又はエタノール水溶液の抽出物である、<7>~<11>のいずれか1に記載の使用。

【0061】

<13>非治療的使用である、<7>~<10>および<12>のいずれか1に記載の使用。

10

20

30

40

50

- 【 0 0 6 2 】
 < 1 4 > サテライト細胞分化促進のために使用されるラフマ又はその抽出物。
- 【 0 0 6 3 】
 < 1 5 > 筋量改善のために使用されるラフマ又はその抽出物。
- 【 0 0 6 4 】
 < 1 6 > 筋力改善のために使用されるラフマ又はその抽出物。
- 【 0 0 6 5 】
 < 1 7 > 筋萎縮抑制のために使用されるラフマ又はその抽出物。
- 【 0 0 6 6 】
 < 1 8 > 筋量減少や筋萎縮に起因する各種疾病や症状の予防、改善又は治療のために使用
 されるラフマ又はその抽出物。 10
- 【 0 0 6 7 】
 < 1 9 > ラフマ抽出物がラフマの水、エタノール又はエタノール水溶液の抽出物である、
 < 1 4 > ~ < 1 8 > のいずれか 1 に記載のラフマ又はその抽出物。
- 【 0 0 6 8 】
 < 2 0 > サテライト細胞分化促進剤の製造のためのラフマ又はその抽出物の使用。
- 【 0 0 6 9 】
 < 2 1 > 筋量改善剤の製造のためのラフマ又はその抽出物の使用。
- 【 0 0 7 0 】
 < 2 2 > 筋力改善剤の製造のためのラフマ又はその抽出物の使用。 20
- 【 0 0 7 1 】
 < 2 3 > 筋萎縮抑制剤の製造のためのラフマ又はその抽出物の使用。
- 【 0 0 7 2 】
 < 2 4 > 筋量減少や筋萎縮に起因する各種疾病や症状の予防、改善又は治療剤の製造のた
 めのラフマ又はその抽出物の使用。
- 【 0 0 7 3 】
 < 2 5 > ラフマ抽出物がラフマの水、エタノール又はエタノール水溶液の抽出物である、
 < 2 0 > ~ < 2 4 > のいずれか 1 に記載の使用。
- 【 0 0 7 4 】
 < 2 6 > 対象にラフマ又はその抽出物を有効量で投与するか又は摂取させることを含む、
 サテライト細胞分化促進方法。 30
- 【 0 0 7 5 】
 < 2 7 > 対象にラフマ又はその抽出物を有効量で投与するか又は摂取させることを含む、
 筋量改善方法。
- 【 0 0 7 6 】
 < 2 8 > 対象にラフマ又はその抽出物を有効量で投与するか又は摂取させることを含む、
 筋力改善方法。
- 【 0 0 7 7 】
 < 2 9 > 対象にラフマ又はその抽出物を有効量で投与するか又は摂取させることを含む、
 筋萎縮抑制方法。 40
- 【 0 0 7 8 】
 < 3 0 > 対象にラフマ又はその抽出物を有効量で投与することを含む、筋量減少や筋萎縮
 に起因する各種疾病や症状の予防、改善又は治療方法。
- 【 0 0 7 9 】
 < 3 1 > ラフマ抽出物がラフマの水、エタノール又はエタノール水溶液の抽出物である、
 < 2 6 > ~ < 3 0 > のいずれか 1 に記載の方法。
- 【 0 0 8 0 】
 < 3 2 > 非治療的方法である、< 2 6 > ~ < 2 9 > および < 3 1 > のいずれか 1 に記載の
 方法。
- 【 実施例 】 50

【0081】

製造例1：ラフマ抽出物の調製

ラフマエキス末（キョウチクトウ科ラフマ（*Apocynum venetum* L.）全草の水抽出物；松浦薬業（株）製）を濃度1（w/v）%となるように50（v/v）%エタノール水に溶解し、試験サンプルとした。

【0082】

実施例1：ラフマ抽出物によるマウス骨格筋由来細胞株におけるサテライト細胞分化誘導

(1) 試験細胞及び培養条件

マウス骨格筋由来細胞株（C2C12）を 1.0×10^5 細胞/ウェルとなるように24穴プレートに播種し、10%ウシ胎児血清を含むDMEMを用いて24時間培養した。プレート表面への細胞の接着を確認した後、製造例1の抽出物を終濃度0.001~0.004%となるよう添加し、48時間後に細胞のクレアチンキナーゼ（CK）活性及びミオシン重鎖（MyHC）遺伝子発現を調べた。ネガティブコントロールとしてラフマ抽出物無添加区、ポジティブコントロールとして、10mM LiCl添加区を設けた。

10

【0083】

(2) クレアチンキナーゼ（CK）活性の測定

CK活性測定は、和光純薬工業社の「クレアチンキナーゼキットCPKII-テストワークー」を用い、添付プロトコルに従い行った。要約すると、細胞をPBSにより2回洗浄し、1%Protease Inhibitor Cocktail（シグマ・アルドリッチ社）を含むCellytic M（シグマ・アルドリッチ社）により溶解した。12000xg、4、15分間の遠心分離を行った後、上清を回収し、細胞溶解液を得た。基質酵素液8μL、発色試薬12μLを添加した混合液を37で3分間加温した後、20倍希釈した細胞溶解液2μLを添加し、37で10分間反応させた。200μLの0.1N HClを加えて基質酵素反応を停止させ、560nmの吸光をマイクロプレートリーダーにより測定した。得られた値はタンパク質量（BCA法により測定）で補正した。

20

【0084】

(3) ミオシン重鎖（MyHC）遺伝子発現解析

細胞のTotal RNAの調製は、RNA抽出キット（RNeasy micro Kit；QIAGEN）を用い、添付プロトコルに従い行った。調製したTotal RNAは、濃度をそろえた後、65、10分間の熱処理を行い、急冷後に使用した。

30

125ng相当のRNAを、20μLの反応液（1xPCR buffer II（Applied Biosystems）、5mM MgCl₂、1mM dNTP mix、2.5μM Oligo d(T)18（New England Biolabs）、1U/μL RNase inhibitor（Takara））中で逆転写した。逆転写反応は、42、60分 52、30分 99、5分 4の条件で行った。得られたcDNAは、使用時まで-20で保存した。また、定量的PCRのスタンダード用として、500ng相当のRNAを同様の反応系で逆転写してcDNAを得た。

逆転写反応によって得られたcDNAを鋳型として、ABI PRISM7500 Real-time PCR System（Applied Biosystems）にて、Fast SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）を用いて定量的PCRを行った。下記表1に記載のプライマーを使用し、4つのMyHC遺伝子の発現量を測定した。定量的PCRでは、50、2分 95、10分 95、15秒 60、1分の反応を40サイクル行った。

40

7段階希釈したスタンダード用cDNAを用いた定量的PCRにより作成した標準曲線に基づき、MyHC遺伝子の発現量を定量した。得られた解析結果は、ハウスキーピング遺伝子GAPDHの発現量を内部標準として補正した相対発現量として表した。

【0085】

【表 1】

遺伝子名	Forward Primer	配列番号	Reverse Primer	配列番号
GAPDH	ttgtggaagggctcatgacc	1	gatgcagggatgatgttctgg	2
2b型ミオシン重鎖	acaagctgcgggtgaagagc	3	caggacagtgacaaagaacg	4
2x型ミオシン重鎖	actgaggaagaccgcaagaa	5	aatttgccaggttgacatt	6
2a型ミオシン重鎖	aagcgaagagtaaggctgtc	7	gtgattgcttgcaaaggaac	8
1型ミオシン重鎖	ccaagggctgaatgaggag	9	gcaaaggctccaggtctgag	10

【0086】

図1に、マウス骨格筋由来細胞株(C2C12)におけるCK活性の測定結果を示す。図中、Cntはラフマ抽出物無添加群(ネガティブコントロール)、LiClはLiCl添加群(ポジティブコントロール)を表す。CK活性(/Cnt)は、無添加群の活性を1とした際の相対値(平均値±標準偏差)を表す。図中の*は、Cntと比較してCK活性が有意に増加していたことを示す(unpaired T-test、* : P < 0.05)。

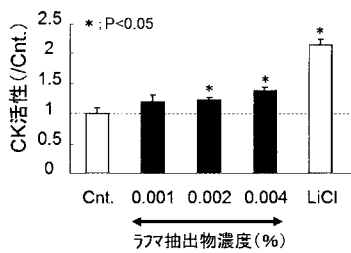
10

【0087】

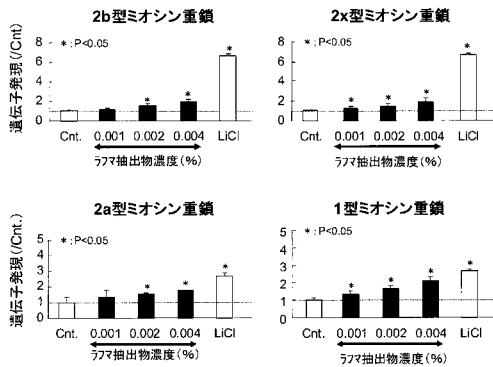
図2に、マウス骨格筋由来細胞株(C2C12)におけるMyHC遺伝子発現の測定結果を示す。図中、Cntはラフマ抽出物無添加群(ネガティブコントロール)、LiClはLiCl添加群(ポジティブコントロール)を表す。遺伝子発現(/Cnt)は、無添加群での発現量を1とした際の相対値(平均値±標準偏差)を表す。図中の*は、Cntと比較して遺伝子発現が有意に増加していたことを示す(unpaired T-test、* : P < 0.05)。

20

【図 1】



【図 2】



【配列表】

2014015428000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 矢野 路子

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 北澤 秀文

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

(72)発明者 太田 宣康

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA04 CA20

4C088 AB31 AC01 BA09 BA10 MA52 NA14 ZA94 ZB22