

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5473191号
(P5473191)

(45) 発行日 平成26年4月16日 (2014. 4. 16)

(24) 登録日 平成26年2月14日 (2014. 2. 14)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 31/353 (2006. 01)

A 6 1 K 31/353

A 6 1 K 36/75 (2006. 01)

A 6 1 K 35/78

K

A 6 1 K 36/00 (2006. 01)

A 6 1 K 35/78

X

A 6 1 P 3/04 (2006. 01)

A 6 1 P 3/04

A 6 1 P 3/06 (2006. 01)

A 6 1 P 3/06

請求項の数 7 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-542437 (P2006-542437)

(86) (22) 出願日 平成17年11月4日 (2005. 11. 4)

(86) 国際出願番号 PCT/JP2005/020268

(87) 国際公開番号 W02006/049234

(87) 国際公開日 平成18年5月11日 (2006. 5. 11)

審査請求日 平成20年10月30日 (2008. 10. 30)

(31) 優先権主張番号 特願2004-324015 (P2004-324015)

(32) 優先日 平成16年11月8日 (2004. 11. 8)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000141897

アークレイ株式会社

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7

(74) 代理人 110000040

特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ

(72) 発明者 佐々木 貴生

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地

アークレイ株式会社内

審査官 深谷 良範

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) 活性化剤、ならびにそれを用いた医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ の活性化剤であって、シイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) 由来のノビレチンを含み、アディポネクチンの分泌促進を介した肥満の予防又は改善のために使用する、PPAR γ 活性化剤。

【請求項 2】

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) γ の活性化剤であって、アディポネクチンの分泌促進を介した肥満の予防又は改善のために使用する、シイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) 由来のノビレチンからなる PPAR γ 活性化剤。

【請求項 3】

アディポネクチンの分泌促進を介した肥満の予防若しくは治療のための医薬であって、請求項 1 記載の PPAR γ 活性化剤を含む医薬。

【請求項 4】

PPAR γ 活性化方法 (但し、対象からヒトを除く) であって、シイクワシャー (Citrus depressa HAYATA) 由来のノビレチンにより PPAR γ を活性化する PPAR γ 活性化方法。

【請求項 5】

哺乳動物 (ヒトを除く) において アディポネクチンの分泌促進を介した肥満の予防、治

療または改善方法であって、請求項 1 又は 2 に記載の P P A R γ 活性化剤を投与することを含む予防、治療または改善方法。

【請求項 6】

P P A R γ 活性化剤の製造のためのシイクワシャー (C i t r u s d e p r e s s a H A Y A T A) 由来のノビレチンの使用。

【請求項 7】

哺乳動物（ヒトを除く）においてアディポネクチンの分泌促進を介した肥満の予防、治療または改善のために、シイクワシャー (C i t r u s d e p r e s s a H A Y A T A) 由来のノビレチンを投与することを含む使用。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (P P A R) 活性化剤、ならびにそれを用いた医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物に関する。

【背景技術】

【0002】

糖尿病の発症には、インスリン分泌低下とインスリン抵抗性の二つが関与しているといわれている。最近、日本人において、糖尿病患者が増えているが、インスリン分泌低下は遺伝的要素が大きいため、糖尿病患者増加の主原因ではなく、インスリン抵抗性が主原因と考えられている。これは、日本人の食生活が欧米化して脂肪摂取量が増えたことや、その他、運動不足、肥満、ストレスが原因であるといわれている。インスリン抵抗性の発生のメカニズムは、脂肪細胞の肥大化に起因することが最近の研究で分かっている。すなわち、脂肪細胞が肥大化すると、T N F - α および遊離脂肪酸 (F F A) が分泌され、これらが筋肉細胞や肝臓細胞での糖の取り込みを阻害すると共に、インスリンの働きを促進するアディポネクチンの分泌が抑制され、この結果、インスリン抵抗性が生じる。

20

【0003】

一方、インスリン抵抗性の研究において、核内受容体である P P A R を活性化すると、インスリン抵抗性の改善に効果があることが分かっている。P P A R には、 α 、 σ 、 γ の 3 つのタイプと、いくつかのサブタイプが知られている。P P A R α は、主として肝臓細胞に発現し、その他、心筋細胞や消化管細胞にも発現が認められ、脂肪酸酸化、ケトン体生成、アポリポタンパク質の生成などに関与している。P P A R σ は、組織特異性が認められず、体全体に発現しているが、大腸がん細胞での発現が顕著である。P P A R γ は、 γ 1 型と γ 2 型の 2 つのサブタイプに分類でき、 γ 1 型は、脂肪組織、免疫系組織、副腎、小腸で発現し、 γ 2 型は、脂肪細胞で特異的に発現しており、脂肪細胞の分化誘導や脂肪合成に重要な役割を担っている。

30

【0004】

このように、P P A R は、インスリン抵抗性の改善に大きく関わっており、加えて、高インスリン血症、2 型糖尿病、その他、肥満、高血圧、高脂血症および動脈硬化の改善にも関わっているといわれている。このような観点から、P P A R を活性化する物質について研究され、例えば、フィブラート系化合物、チアゾリジン誘導体、脂肪酸、ロイコトリエン B 4、インドメタシン、イブプロフェン、フェノプロフェン、15-deoxy- Δ -12, 14-PGJ2 のような合成物質系の P P A R 活性化剤が知られている。しかしながら、合成物質系の P P A R 活性化剤は、長期摂取による副作用の問題があり、日常生活で摂取してインスリン抵抗性等の疾病を予防若しくは改善するのには不向きである。この他、天然成分由来の P P A R 活性化剤として、ウコンに含まれるクルクミンや、油脂の一種であるモノアシルグリセロール、お茶などに含まれるカテキン類などの天然物質が、P P A R 活性化剤として報告されている（例えば、特許文献 1 参照）。しかしながら、天然成分由来のものであっても油脂などはカロリーが高いため、継続的に摂取することには問題がある。また、日常的に摂取するためには、食品等に添加して摂取することが理想的であるが、天然成分由来のものは独特の風味を有するものも多く、このようなものは食品

40

50

等に添加するには不向きである。

【特許文献1】特開2002-80362号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような事情に鑑みなされたもので、副作用の問題がなく、長期摂取可能であり、しかも食品等に添加しても問題のないPPAR活性化剤の提供を、その目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

前記目的を達成するために、本発明のPPAR活性化剤は、ノビレチンを含むことを特徴とする。

【発明の効果】

【0007】

本発明者は、前記課題を解決するために、天然成分のPPAR活性化剤について一連の研究を重ねたところ、柑橘類果実、特に沖縄地方特産のシイクワシャー（学名：Citrus depressa HAYATA）に含まれるノビレチンが、PPARの活性化作用を有することを見出し、本発明に到達した。すなわち、ノビレチンを多く含むシイクワシャーは、長年食用されてきており、その安全性は確認されている。また、ノビレチンは、カロリーが低く、この点で糖尿病患者や肥満患者等が長期摂取しても問題がない。そして、ノビレチンは、無味無臭であるため、食品等に添加しても、その食品独特の風味を損なうことがないため、食品に添加して長期に渡って日常的に摂取することも可能となる。したがって、本発明により、ノビレチンがPPARを活性化することにより、脂肪の燃焼を促進させ、TNF- α および遊離脂肪酸の分泌を抑制し、かつアディポネクチンの分泌を促進させるから、脂肪細胞の状態を正常化でき、インスリン抵抗性を改善でき、その他、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満などの症状を改善できる。なお、これは、人に限られず、その他動物にも有効である。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、本発明の一実施例において、ノビレチンのPPAR γ リガンド活性を示すグラフである。

【図2】図2は、本発明のその他の実施例において、ノビレチンによるアディポネクチンmRNA発現量の増加を示すグラフである。

【図3】図3は、本発明のさらにその他の実施例において、ノビレチンによる糖尿病改善効果を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明のPPAR活性化剤において、活性化されるPPARは、PPAR α およびPPAR γ のいずれかでもよいが、好ましくは双方である。なお、本発明のPPAR活性化剤は、ノビレチン以外の他の成分を含んでいてもよい。前記他の成分としては、例えば、各種添加剤があり、この他、ノビレチン以外の他のPPAR活性化剤等がある。

【0010】

前述のように、ノビレチンは、PPAR活性化作用を有するため、本発明のPPAR活性化剤は、例えば、脂肪細胞におけるTNF- α および遊離脂肪酸の分泌の抑制作用、アディポネクチンの分泌の促進作用および肝臓細胞における脂肪の β 酸化促進作用を有する。また、本発明のPPAR活性化剤は、脂肪細胞のアポトーシス、分化および小型化の少なくとも一つを誘導する。

【0011】

本発明のPPAR活性化剤において、使用するノビレチンは、特に制限されないが、例えば、柑橘類由来のものが使用でき、好ましくは沖縄特産果実として知られるシイクワシ

10

20

30

40

50

ャー由来のものである。シイクワシャーの果汁には、ノビレチンが多く含まれているので、これをそのまま使用してもよく、また、柑橘類から単離精製したものや市販品を使用してもよい。

【0012】

つぎに、本発明の医薬は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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、前記本発明のPPAR活性化剤を含む医薬である。本発明の医薬は、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤および各種添加剤等を含んでいても良い。本発明の医薬において、具体的な剤形としては、例えば、錠剤、細粒剤（散剤を含む）、カプセルおよび液剤（シロップ剤を含む）等があげられる。本発明の医薬は、各剤形に適した添加剤や基材等を適宜使用し、日本薬局方に記載された通常の方法に従い製造できる。また、投与経路としては、特に制限されず、例えば、経口投与および非経口投与があげられ、前記非経口投与としては、例えば、口腔内投与、気道内投与、直腸内投与、皮下投与、筋肉内投与および静脈内投与等があげられる。本発明の医薬において、ノビレチンの1日あたりの投与量が、例えば、10mg以上となるようにノビレチンを含んでいればよく、好ましくは20mg以上である。

10

【0013】

つぎに、本発明のサプリメントは、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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、前記本発明のPPAR活性化剤を含むサプリメントである。本発明のサプリメントは、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤、各種添加剤およびその他のサプリメント等を含んでいてもよく、前記その他のサプリメントとしては、例えば、ビタミンCなどの各種ビタミン類、アミノ酸およびオリゴ糖等があげられる。本発明のサプリメントの形態は、特に制限されず、例えば、錠剤、細粒剤（散剤を含む）、カプセルおよび液剤（シロップ剤を含む）等があげられる。本発明のサプリメントにおいて、ノビレチンの含有量は、前記医薬と同様である。

20

【0014】

つぎに、本発明の機能性食品は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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機能性食品であって、前記本発明のPPAR活性化剤を含む機能性食品である。本発明の機能性食品は、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤および各種添加剤等を含んでいてもよい。なお、本発明の機能性食品の形態は、特に制限されず、例えば、麺類、菓子類および機能性飲料等があげられる。

30

【0015】

つぎに、本発明の食品添加剤は、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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食品添加物であって、前記本発明のPPAR活性化剤を含む食品添加物である。本発明の食品添加剤は、本発明のPPAR活性化剤以外に、例えば、その他のPPAR活性化剤および各種添加剤等を含んでいてもよい。本発明の食品添加剤の形態は、特に限定されないが、例えば、液状、ペースト状、粉末状、フレーク状および顆粒状等があげられる。また、本発明の食品添加剤は、飲料用を含む。

40

【0016】

つぎに、本発明のPPAR活性化方法は、ノビレチンによりPPARを活性化する方法である。前記ノビレチンを、例えば、脂肪細胞等に接触させることによりPPARを活性化することがより好ましい。

【0017】

本発明のPPAR活性化方法において、使用するノビレチンは、前記本発明のPPAR活性化剤に使用するものと同様であり、例えば、柑橘類由来のものが使用でき、好ましく

50

は沖縄特産果実として知られるシイクワシャー由来のものである。前述のように、シイクワシャーの果汁には、ノビレチンが多く含まれているので、これをそのまま使用してもよいし、柑橘類から単離精製したものや市販品を使用してもよい。

【0018】

つぎに、本発明の疾病の予防、治療または改善方法は、哺乳動物におけるインスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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、治療または改善方法であって、ノビレチンを投与することを含む方法である。ノビレチンの一日あたりの投与量は、例えば、10 mg/日以上であり、好ましくは20 mg/日以上である。前記哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタおよびサル等があげられる。

10

【0019】

つぎに、本発明のキットは、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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または治療のためのキットであって、

- a) ノビレチン、
- b) インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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または治療に有用な第二の化合物を含む第二医薬組成物、および
- c) 前記ノビレチンおよび前記第二医薬組成物を入れるための容器を含むキットである。

20

【0020】

つぎに、本発明の使用は、PPAR活性化剤の製造のためのノビレチンの使用である。

【0021】

また、本発明の使用は、哺乳動物における本発明のインスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満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、治療または改善のためにノビレチンを投与することを含む使用である。ノビレチンの一日あたりの投与量および前記哺乳動物は、前述の通りである。

【0022】

本発明の使用において、使用するノビレチンは、前記本発明のPPAR活性化剤に使用するものと同様であり、例えば、柑橘類由来のものが使用でき、好ましくは沖縄特産果実として知られるシイクワシャー由来のものである。前述のように、シイクワシャーの果汁には、ノビレチンが多く含まれているので、これをそのまま使用してもよいし、柑橘類から単離精製したものや市販品を使用してもよい。

30

【0023】

本発明の使用において、ノビレチンは、例えば、脂肪細胞におけるTNF- α および遊離脂肪酸の分泌抑制、脂肪細胞におけるアディポネクチンの分泌促進、肝臓細胞における脂肪の β 酸化促進等の作用を少なくとも一つを誘導する。また、本発明の使用において、ノビレチンは、例えば、脂肪細胞のアポトーシス、分化および小型化等の少なくとも一つを誘導する。

【0024】

つぎに、本発明におけるノビレチンは、例えば、シイクワシャー等の柑橘類果実から以下のようにして製造できる。

40

【0025】

まず、果実を、所望のサイズに裁断または粉碎する。使用する果実は、採取直後の生のものであってもよいし、乾燥した状態のものであってもよい。つぎに、裁断等した果実を、溶媒に浸漬して抽出物を得る。浸漬に使用する溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、t-ブタノール等の低級アルコール類、アセトンなどのケトン類、ジエチルエーテル、石油エーテルなどのエーテル類、クロロホルム、ジクロロメタンなどの塩素系有機溶媒などがあげられ、これらは単独で使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。これらの中で、毒性等の観点から、水とエ

50

タノールの混合物若しくはエタノールを使用することが好ましい。溶媒の使用量は、特に制限されず、例えば、果実量100重量部に対し、200重量部～10000重量部の範囲である。抽出処理は、例えば、室温で行うことができるが、好ましくは4～120℃の範囲、より好ましくは40～100℃の温度条件である。抽出時間は、抽出温度等により適宜決定されるが、例えば、室温での抽出時間は、1～10日間であり、50℃以上では1～96時間である。

【0026】

つぎに、フィルターによるろ過等により、残渣から分離して抽出液を取り出す。この抽出液若しくはその乾燥物は、ノビレチンを含んでいるので、これをそのまま使用してもよい。また、後述のように、さらに精製してノビレチンの純度を高めて使用してもよい。

10

【0027】

前記抽出物の精製は、例えば、適切な溶離液を用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより行うことができる。前記溶離液としては、例えば、酢酸エチル、メタノール、イソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ベンゼン、またはキシレンなどの溶媒と、ヘキサン、ヘプタン、クロロホルム、またはジクロロエタンなどの溶媒との、混合溶媒を使用することが好ましい。

【実施例1】

【0028】

下記に示すように、本実施例は、ノビレチンによるPPAR γ の活性化を確認した例である。

20

【0029】

まず、CV-1細胞（雄性アフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞）を、24穴培養プレートに0.2 μ g/wellとなるように植え込み、37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した。培地には、10%FBS（ウシ胎仔血清）、10mg/mLペニシリン・ストレプトマイシン溶液を含むDMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium: GIBCO社）を用いた。つぎに、リポフェクトアミンシステム（Invitrogen社）を用いて、pM-hPPAR γ とp4×UASg-tk-lucとを、培養したCV-1細胞にトランスフェクションした。なお、前記pM-hPPAR γ は、GAL4結合ドメインである1～147残基とヒトPPAR γ リガンド結合ドメインである204～505残基とを含む融合タンパク質を発現するためのベクターであり、前記p4×UASg-tk-lucは、ルシフェラーゼ遺伝子上流に、4コピーのGAL4結合ドメインのための上流活性化配列（UAS）とチミジンキナーゼ遺伝子プロモーターを含むレポーター・プラスミドである。前記トランスフェクションを行った細胞を約24時間培養し、ついで、前記細胞の培地を、種々濃度（0.1、1.0、10および50 μ M）のノビレチンまたは無処置対照用の培地に変え、さらに24時間培養した。前記ノビレチンを含む培地は、ジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解したノビレチンを培地に加えることにより調製し、無処置対照用の培地は、DMSOのみを培地加えることにより調製した。培養後、前記細胞を溶解し、デュアル・ルシフェラーゼレポータージェンアッセイシステム（Promega社）を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した（測定群）。

30

40

【0030】

前記測定群と同様に、コントロール群としてpM-hPPAR γ の代わりにpM（pM-hPPAR γ においてGAL4結合ドメインである1～147残基を含むが、PPAR γ リガンド結合ドメインである204～505残基を含まないベクター）を用いて測定した。各サンプルについて、測定群及びコントロール群の発光強度の平均値（n=4）の比（測定群／コントロール群）を算出し、無処置対照に対する相対ルシフェラーゼ活性をサンプルのPPAR γ リガンド結合活性とした。この結果を下記表1および図1のグラフに示す。

【0031】

【表 1】

	添加濃度	PPAR γ リガンド活性
無処置対照 (DMSO)	(0.1%)	100
ノビレチン	0.1 μ M	96.5 $\pm$ 10.8
	1.0 μ M	156.8 $\pm$ 11.3
	10 μ M	200.5 $\pm$ 55.1
	50 μ M	246.7 $\pm$ 41.7
(平均値 $\pm$ 標準誤差)		

10

【0032】

前記表1および図1から分かるように、ノビレチンによって、PPAR γ の活性が向上し、その活性は、ノビレチンの濃度が高くなるにつれて、有意に高くなった。

【実施例2】

【0033】

下記に示すように、本実施例は、ノビレチンによるアディポネクチンの分泌促進効果を確認した例である。

【0034】

(前駆脂肪細胞の分化誘導)

まず、以下の2種類の培地を準備した。

20

1. 分化誘導培地 (0.25 μ M : DEX、0.5mM : MIX、10 μ g/mL : インスリン / 10% FBS / DMEM)

DMEM (SIGMA製) 500mLに、FBS (ウシ胎仔血清 (GIBCO製)) を55mL加え、10% FBS / DMEMを調製した。これに、1mM DEX (dexamethasone) / DMSO (ナカライ製) を138.75 μ L、10mg/mLインスリン / PBS (SIGMA製) を555 μ L加えた。なお、インスリン / PBSは、予めPBSに1N HClを加え、インスリンが溶ける程度に酸性にした後、インスリンを溶解させた。MIX (3-Isobutyl-1-methylxanthine) (ナカライ製) を、0.5mMとなるように、使用する直前に必要な量の前記培地に加えることにより、分化誘導培地を調製した。MIXは非常に溶けにくいので、まず少量の99.5%エタノールに溶解させた後、10% FBS / DMEMに加えた。このとき99.5%エタノールは最終濃度が、1%を越えないようにした。

30

2. 分化促進培地 (5 μ g/mL : インスリン / 10% FBS / DMEM)

10% FBS / DMEM 555mLに、10mg/mLインスリン / PBSを277.5 μ L加え、分化促進培地を調製した。

【0035】

つぎに、培養前駆脂肪細胞3T3-L1を解凍し、100mmディッシュにまき、3T3-L1が、約80%コンフルエントに達するまで培養した。約80%コンフルエントに達したディッシュ1枚分の10T1/2を6ウェルプレート1枚に継代し、3T3-L1が6ウェルプレートにおいてコンフルエントに達するまでさらに培養した後、分化誘導培地に培地交換し、分化誘導させた。48時間後、分化促進培地に培地交換し、以降2日おきに分化促進培地で培地交換した。分化誘導開始7日後、セパゾールRNA Isup (ナカライ製) を用いてmRNAを抽出し、Light Cycler (TM) を用いて、脂肪細胞分化初期の指標である36B4、aP2およびアディポネクチンのmRNA発現量の測定を行った。

40

【0036】

(Light Cycler (TM) によるmRNAの定量)

total RNAの抽出と定量

前記6ウェルプレートから培地を除去し、各ウェルに1mLずつセパゾールRNA Isup (ナカライ製) を加え、ピペティングを数回繰り返すことにより細胞を分散

50

させた。この液を1.5 mLのチューブに移し、室温で5分間放置した後、クロロホルムを200 μ L加え、Vortexでよく攪拌し、室温で3分間放置した。4℃に冷却し、12000 $\times$ gで15分間遠心した。フェノール層（下層、黄色）と水層（上層、無色）との界面を乱さないように注意しながら、水層のみを別のチューブ（容量1.5 mL）へ移した。この際、中間に浮いているタンパク質を取らないようにした。前記チューブにイソプロパノールを500 μ L加えて混和し、室温で10分間放置した。4℃に冷却し、12000 $\times$ gで10分間遠心し、上清約1 mLを除去した。この沈殿に75%エタノールを1 mL加えて攪拌して沈殿を十分に懸濁した後、4℃に冷却し、12000 $\times$ gで10分間遠心し、上清を除去した。得られた沈殿（total RNA）を乾燥させた後、20 μ Lのnuclease free waterに溶かし、NanoDrop（スクラム製）によりmRNAの濃度を測定した。

10

【0037】

逆転写

抽出し、測定したmRNA溶液を、mRNA濃度が1 μ g/ μ Lになるように調製した。8連チューブ（容量0.2 mL）に、Oligo dTプライマー1 μ Lと前記RNA溶液10 μ Lとを添加した。Thermal Cyclerにおいて、前記混合液を70℃で10分間インキュベートし、RNAの高次構造を破壊して氷上に移し、一分以上放置した後、以下のような試薬を順に加えた。

【0038】

【表2】

20

RNAサンプル／プライマー混合液	11 μ L
5×逆転写緩衝液	5 μ L
RNase inhibitor	1 μ L
2.5mM dNTP Mix	5 μ L
<u>Nuclease Free water</u>	<u>2 μL</u>
合計	24 μ L

【0039】

Thermal Cyclerで、42℃で5分間プレインキュベートした後、逆転写酵素を1 μ L添加し、チューブの内容物をピペティングでよく混合した。Thermal Cyclerで、42℃で50分間、さらに70℃で15分間インキュベートした後、氷上で冷やし、軽く遠心して反応液をチューブの底に集め、-20℃で凍結保存しておいた。なお、Light Cycler^(TM)測定に使用する場合は、その都度10倍希釈して用いた。

30

【0040】

Light Cycler^(TM)測定

以下の操作は全てクリーンベンチ内で行った。発現量を測定する遺伝子の断片が入ったプラスミド溶液5 mLを、0.65 mLのチューブに加え、Light Cycler^(TM) DNA Master SYBR Greenに付属の水45 mLで10倍に希釈した。この作業を繰り返し、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷および10⁸倍の希釈溶液を作製した。Light Cycler^(TM) Centrifuge Adapterに専用キャピラリーを、ピンセットを用いてセットし、前記試薬を18 μ Lずつ分注した。さらに、ネガティブコントロールとして水、スタンダードとして7段階の希釈溶液、ならびに測定用サンプルのcDNAの10倍希釈液をそれぞれ2 μ Lずつ添加した後、ピンセットを用いて蓋をした。5000 rpm、4℃で10秒間遠心した後、キャピラリーをカルーセルに装填してチャンバーにセットし、測定を行った。

40

【0041】

Light Cycler^(TM)の定量結果を用いて、各サンプルについて、36B4のmRNAと、aP2およびアディポネクチンのそれぞれのmRNA発現量との比を算

50

出した。その結果を、下記表 3 および図 2 のグラフに示す。

【0042】

【表 3】

	添加濃度	a P 2	アディポネクチン
無処置対照		100±16.2	100±6.9
ノビレチン	1 μM	155.8±21.7	164.9±18.7
	5 μM	193.7±41.4	265.1±60.4
	10 μM	273.1±13.8	352.3±28.5
(平均値±標準誤差)			

10

【0043】

ノビレチンを添加した分化誘導培地で培養した脂肪細胞と、無処置対照の培地で培養した脂肪細胞とを比較した結果、ノビレチンを添加することにより、脂肪細胞におけるアディポネクチンの分泌が有意に増加した。したがって、ノビレチンは、アディポネクチン分泌促進効果を有するといえる。

【実施例 3】

【0044】

本実施例は、自然発症糖尿病マウス（KKAY）を用いて、ノビレチンの糖尿病改善効果を確認した例である。

20

【0045】

まず、12匹の自然発症糖尿病マウス（6週齢、雌）を、普通食で一週間予備飼育した。ついで、前記マウスを、平均体重が等しくなるように、コントロール群およびNOB群の2群に群分けした（n=6）。そして、コントロール群のマウスには、高脂肪食のみを摂取させ、NOB群のマウスには、ノビレチンを0.02%含有させた高脂肪食を摂取させた。摂取開始27又は28日後、これらのマウスから血清を採取した。なお、ノビレチンは、シイクワシャー抽出由来のものを使用した。

【0046】

（ELISAによるアディポネクチン分泌量の測定）

酵素免疫測定法（ELISA法）によるアディポネクチン分泌量の測定は、マウス／ラット アディポネクチンELISAキット（商品名）（大塚製薬株式会社製）を用いて行った。なお、前記キットの構成は、以下の通りである。

30

洗浄用原液

検体希釈用原液

抗体プレート（抗マウスアディポネクチンポリクローナル抗体（ウサギ）固相プレート）

標準品 8.0 ng/mL（リコンビナントマウスアディポネクチン）

ビオチン標識抗体液（ビオチン標識抗マウスアディポネクチン ポリクローナル抗体（ウサギ））

酵素標識ストレプトアビジン原液（HRP標識ストレプトアビジン）

酵素標識ストレプトアビジン希釈液

40

基質液A（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン）

基質液B（過酸化水素）

反応停止液

【0047】

まず、以下の試薬および検体液を調製した。

洗浄液

前記洗浄用原液 40 mL に対して、精製水を 960 mL の割合で混合し、2.8℃で保存した。

検体希釈液

前記検体希釈用原液 50 mL に対して、精製水を 200 mL の割合で混合し、2.8℃

50

で保存した。

標準液

前記標準品 8.0 ng/mL を、前記検体希釈液で 2 段階希釈し、4.0 ng/mL、2.0 ng/mL、1.0 ng/mL、0.5 ng/mL および 0.25 ng/mL の濃度の標準液を調製した。

酵素標識ストレプトアビジン液

前記酵素標識ストレプトアビジン希釈液 12 mL に対して、前記酵素標識ストレプトアビジン原液を 60 μ L の割合で混和した。

基質液

前記基質液 B 6 mL に対して、前記基質液 A を 6 mL の割合で混和した。

10

検体液

前記コントロール群および前記 NOB 群の血清を、4 万倍に希釈した。

【0048】

検査に必要な前記抗体プレートのストリップだけを取り出した。前記洗浄液を、前記抗体プレートの各ウェルに約 200 μ L ずつ加えた後、プレートウォッシャーで各ウェルの液を完全に吸引除去した。この洗浄および吸引をもう一度繰り返した後、各濃度の標準液および希釈済みの各検体液を各ウェルにそれぞれ 100 μ L ずつ添加し、二連で測定した。なお、標準液は、測定およびプレートごとに必ず測定した。プレートシールで抗体をカバーし、室温で 60 分間静置反応させた後、抗体プレートからプレートシールを取り除き、プレートウォッシャーでウェル中の液を完全に吸引除去した。続いて、洗浄液を各ウェルに約 200 μ L ずつ加え、速やかに吸引除去した。この洗浄と吸引とをさらに 4 回繰り返した。前記ビオチン標識抗体液を前記抗体プレートの各ウェルに 100 μ L ずつ添加した後、プレートシールで抗体をカバーし、室温で 60 分間静置反応させた。前述と同様に、同様にウェルの洗浄と吸引とを 5 回繰り返した。前記酵素標識ストレプトアビジン液を抗体プレートの各ウェルに 100 μ L ずつ添加した後、プレートシールで抗体をカバーし、室温で 60 分間静置反応させた。前述と同様に、同様にウェルの洗浄と吸引とを 5 回繰り返した。基質液を抗体プレートの各ウェルに 100 μ L ずつ添加し、室温で 15 分間静置して反応させた後、反応停止液を抗体プレートの各ウェルに 100 μ L ずつ加え、プレートリーダーにより各ウェルの 450 nm における吸光度を測定した。前記吸光度の測定によりえられたアディポネクチンの分泌量の測定結果（平均値）を、下記の表 4 および図 3 のグラフに示す。

20

【0049】

【表 4】

	ノビレチン含量	アディポネクチン分泌量
コントロール群	0%	4.78 $\pm$ 0.096
NOB 群	0.02%	7.18 $\pm$ 0.50
(平均値 $\pm$ 標準誤差)		

30

【0050】

ノビレチンを摂取した NOB 群の糖尿病マウスと、ノビレチンを摂取しなかったコントロール群の糖尿病マウスとにおいてアディポネクチン分泌量を比較した結果、ノビレチンの摂取により脂肪細胞におけるアディポネクチンの分泌量が有意に増加した。つまり、糖尿病罹患者がノビレチンを摂取することにより、アディポネクチンの分泌が促進されて脂肪細胞の状態が正常な状態となり、糖尿病が改善されることから、ノビレチンは、糖尿病改善効果を有するといえる。

【産業上の利用可能性】

【0051】

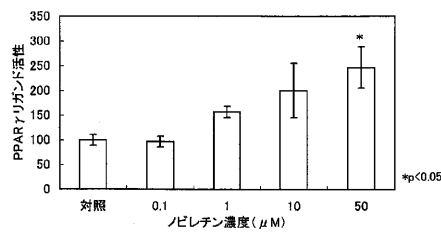
以上のように、本発明の PPAR 活性化剤は、優れた PPAR 活性を有し、副作用の問

40

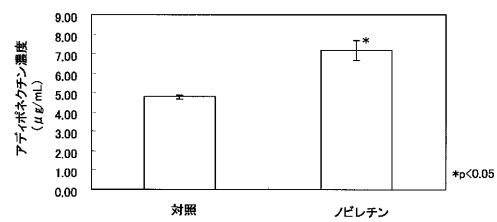
50

題がなく長期間摂取することが可能であり、食品等に好ましく用いることができる。また、ノビレチンは、優れたアディポネクチン分泌促進効果等を有する。したがって、本発明のPPAR活性化剤は、例えば、インスリン抵抗性、高インスリン血症、2型糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化および肥満などの疾病の予防若しくは改善のための医薬、サプリメント、機能性食品および食品添加物として使用できる。なお、これは、人に限られず、その他動物にも有効である。

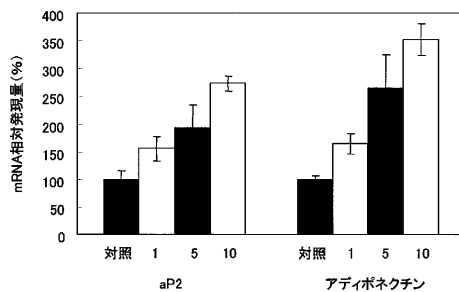
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P 9/12
C 0 7 D	311/30	(2006.01)	C 0 7 D 311/30

(56)参考文献 特開2001-240539 (JP, A)
 特開2002-080362 (JP, A)
 特開2000-247880 (JP, A)
 特開2000-080035 (JP, A)
 国際公開第2003/037316 (WO, A1)
 江口ら, 日本農芸化学会大会講演要旨集, 2004年, p.61
 KUROWSKA, E.M. et al, Modulation of HepG2 cell net apolipoprotein B secretion by the citrus polymethoxyflavone, tangeretin, *Lipids*, 2004年, Vol.39, No.2, p.143-151
 LIANG, Y. et al, Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by flavonoids in mouse macrophages, *FEBS Letters*, 2001年, Vol.496, No.1, p.12-18
 KURODA, M. et al, Phenolics with PPAR- γ ligand-Binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-Ay mice, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2003年, Vol.13, No.24, p.4267-4272
 MAE, T. et al, A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats, *Journal of Nutrition*, 2003年, Vol.133, No.11, p.3369-3377

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 D 3 1 1 /
 A 6 1 K 3 1 /, 3 6 /
 REGISTRY/CAPLUS (STN)
 J Dream III