

(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
2012年3月22日(22.03.2012)

(10) 国際公開番号
WO 2012/036168 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) A61K 31/522 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 31/7034 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01) A61P 21/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/070894
- (22) 国際出願日: 2011年9月13日(13.09.2011)
- (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 2010-205453 2010年9月14日(14.09.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 北海道公立大学法人札幌医科大学(SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南1条西17丁目291番地 Hokkaido (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 堀尾 嘉幸 (HORIO, Yoshiyuki). 久野 篤史 (KUNO, Atsushi). 堀 佑輔 (HORI, Yuusuke).
- (74) 代理人: 特許業務法人原謙三国際特許事務所 (HARAKENZO WORLD PATENT & TRADE-
- MARK); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル Osaka (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))



WO 2012/036168 A1

(54) Title: COMPOSITION FOR TREATING MUSCULAR DYSTROPHY

(54) 発明の名称: 筋ジストロフィーを処置するための組成物

(57) Abstract: A composition that is for treating muscular dystrophy and that contains a SIRT1 activating factor as the active ingredient is provided. The composition may further contain a factor that imports SIRT1 to the nucleus. The present invention is effective in the therapy of muscular dystrophy.

(57) 要約: SIRT1活性化因子を有効成分として含んでいる、筋ジストロフィーを処置するための組成物を提供する。上記組成物は、SIRT1を核内移行させる因子をさらに含んでいてもよい。本発明は筋ジストロフィーの治療に有効である。

明 細 書

発明の名称：筋ジストロフィーを処置するための組成物

技術分野

[0001] 本発明は、筋ジストロフィーを処置するための組成物に関する。

背景技術

[0002] 筋ジストロフィーは、骨格筋の変性および壊死が生じる疾患であり、臨床的には進行性の筋萎縮および筋力低下を呈する遺伝性の疾患である。筋ジストロフィーでは、筋細胞膜タンパク質の欠損および／または変異に起因して細胞膜が破壊され、次いで、筋細胞が崩壊して壊死する。筋ジストロフィーは種々のタイプが知られているが、いずれのタイプにおいても筋細胞の壊死によって特徴付けられる（非特許文献1参照）。

[0003] 筋ジストロフィーを有する患者では、血中のCK、LDH、GOT、GPT、アルドラーゼなどの筋細胞由来の酵素についての測定値が高い。筋ジストロフィーの患者では、筋細胞の細胞膜の安定化に関わるジストロフィンが欠損している。ジストロフィン以外の筋細胞膜タンパク質は、ジストロフィン結合蛋白質と総称され、ジストログリカン複合体（ α 、 β ）、サルコグリカン複合体（ α 、 β 、 γ 、 δ ）、シントロフィン複合体などが知られており、これらのタンパク質における変異もまた筋ジストロフィーにおいて観察される。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：日本国公開特許公報「特開2007-326872号公報（2007年12月20日公開）」

特許文献2：日本国公開特許公報「特開2006-298876号公報（2006年11月2日公開）」

特許文献3：日本国公表特許公報「特表2008-528510号公報（2008年7月31日公表）」

非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Gregory Q. Wallace and Elizabeth M. McNally "Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies" Annu. Rev. Physiol. 71: 37-57 (2009)

非特許文献2 : Masaya Tanno et al. "Induction of Manganese Superoxide Dismutase by Nuclear Translocation and Activation of SIRT1 Promotes Cell Survival in Chronic Heart Failure" The Journal Of Biological Chemistry 285: 8375-8382 (2010)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 筋ジストロフィーは、ジストロフィンやサルコグリカンの原因タンパク質の異常によって生じ得る。近年、筋芽細胞の移植または注入、あるいは原因遺伝子の導入などの遺伝子治療が試みられている。しかしながら、筋ジストロフィーの有効な治療法は見出されていない。

課題を解決するための手段

[0007] 上記の課題を解決するために、本発明に係る組成物は、SIRT1活性化因子を有効成分として含んでいることを特徴としている。SIRT1活性化因子とは、Sir2ファミリータンパク質（すなわち、サーチュインタンパク質）を活性化する能力を有する因子である。NAD依存性ヒストン脱アセチル化酵素であるSir2ファミリータンパク質は、酵母および線虫において寿命延長作用を有しており、Sir2ファミリータンパク質の1つであるSIRT1は、高等動物において、神経幹細胞、心筋細胞などに発現している。

[0008] 本発明に係る組成物において、SIRT1活性化因子は、ポリフェノールであることが好ましく、フラボン、スティルベン、フラバノン、イソフラボン、カテキン、カルコン、タンニンおよびアントシアニンからなる群より選択される化合物、またはその誘導体であることがより好ましく、レスベラトロール（RSV）、プテイン、ピセアタンノール、イソリキリチゲニン、フィセチン、ルテオリン、テトラヒドロキシフラボンおよびケルセチンからな

る群より選択される化合物、またはその誘導体であることがさらに好ましく、R S V、またはその誘導体であることが最も好ましい。

[0009] 上記構成を採用することによって、本発明は、筋ジストロフィーを処置することができる。また、本発明を用いれば、筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化状態を劇的に改善することができる。すなわち、本発明は、筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化を抑制するために用いられることが好ましい。

[0010] 本発明に係る組成物は、S I R T 1を核内移行させる因子をさらに含んでもよい。本発明に係る組成物において、S I R T 1を核内移行させる因子は、細胞内c G M Pを増加させる因子であることが好ましく、c G M Pの非水解性アナログ、またはホスホジエステラーゼ5（P D E - 5）の酵素活性を阻害する因子がより好ましく、C P T - c G M Pまたはタダラフィル（T a d）がさらに好ましい。

[0011] 本発明に係るキットは、S I R T 1活性化因子を備えていることを特徴としている。上記構成を採用することによって、本発明は、筋ジストロフィーを処置することができる。本発明に係るキットは、S I R T 1を核内移行させる因子をさらに備えていてもよい。また、本発明に係るキットは、筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化を抑制するために用いられることが好ましい。

発明の効果

[0012] 本発明を用いれば、筋ジストロフィーを処置ことができ、特に、筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化状態を劇的に改善する。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]マウス骨格筋における線維化を示す免疫染色像、ならびに線維化の程度をフィブロネクチンおよび筋線維の断面積にて示したグラフである。

[図2]マウス骨格筋における線維化の程度を、フィブロネクチンm R N Aの発現量にて示したグラフである。

[図3]骨格筋細胞（C 2 C 1 2細胞）におけるS I R T 1の細胞内局在を示す

免疫染色像、および核画分におけるSIRT1の相対値を示すグラフである。

[図4]骨格筋細胞（C2C12細胞）におけるSIRT1の細胞内局在を示すウエスタンブロット、および核画分または細胞質画分におけるSIRT1の相対値を示すグラフである。

[図5]C2C12細胞に対する、SIRT1についてのRT-PCRおよびイムノブロットングの結果を示す図である。コントロールとしてGAPDHを用いた。

[図6]マウス骨格筋におけるSIRT1の免疫染色像（左）、およびその結果を数値化したグラフである。

[図7]RSV、ならびに、RSV配糖体である3-O-β-D-グリコシド（3G-RSV）および4'-O-β-D-グリコシド（4'G-RSV）の構造を示す図である。

[図8]1, 1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）を用いた、RSV、3G-RSVおよび4'G-RSVのラジカル消去活性を示す図である。

[図9]RSV、3G-RSVおよび4'G-RSVによるヒストンH3脱アセチル化を示す図である。上段に、実験スキームを示し、中段に、ヒストンH3脱アセチル化を示すWestern Blottingの結果を示し、下段に、ヒストンH3脱アセチル化を定量化した結果を示す。

[0014]

発明を実施するための形態

[0015] [1] 筋ジストロフィーを処置するための有効成分としてのSIRT1活性化因子

本発明は、細胞レベルおよび動物レベルでの実験系を用いて、SIRT1の活性化が筋ジストロフィーの処置に有効であることを見出して完成されたものである。すなわち、本発明は、筋ジストロフィーを処置するための、SIRT1活性化因子を用いる技術を提供する。本発明は、本発明者ら独自の

新知見に基づいて完成されたものであり、従来の技術水準からは容易になし得なかった画期的な発明である。

[0016] 本発明者らはこれまでに心不全に関する研究を行っている。酸化ストレスは、慢性心不全における主要な役割を担い、NAD⁺依存性ヒストン／タンパク質デアセチラーゼ（SIRT1）は、核内に発現されている場合に酸化ストレス条件下での細胞の生存（抗アポトーシス作用）を促進する。また、本発明者らは、心臓におけるSIRT1の機能的役割、および心不全に対する治療におけるSIRT1の利用を検討し、SIRT1を活性化することが知られているレスベラトロール（RSV）が、酸化ストレスに起因するアポトーシスを抑制するとともに、心不全モデルであるT0-2ハムスターの心不全を抑制し得ることを見出している（非特許文献2参照）。このように、SIRT1を活性化することによって抗アポトーシス効果が得られることが、よく知られている。

[0017] 特許文献1には、SIRT1のデアセチラーゼ活性を増加させる作用物質を用いて、真核細胞内のp53の活性を阻害し、アポトーシスから細胞を保護する方法、および寿命を延長させる方法が開示されている。特許文献2には、サーチュインの活性化を用いた、眼疾患の治療に関する技術が開示されており、サーチュインの活性化が、細胞死の予防、老化の予防、細胞死の治療、延命、寿命延長、癌発生の予防に利用可能であることも記載されている。特許文献3には、サーチュインの活性化を用いた、紅潮または体重増加を処置する技術が開示されている。

[0018] 上述したように、筋ジストロフィーは、壊死（ネクローシス）によって特徴付けられる疾患である。ネクローシスがアポトーシスと同じ「細胞死」であるとはいえ、その発生機序が大きく異なることは周知である。特許文献1には、サーチュイン活性化化合物を、細胞死に関係する慢性疾患などの治療のために投与することができる旨が示唆されており、細胞死の観点から、筋ジストロフィーを例示されている。しかし、アポトーシスによって特徴付けられる疾患の改善に有効である物質が、壊死（ネクローシス）によって特徴

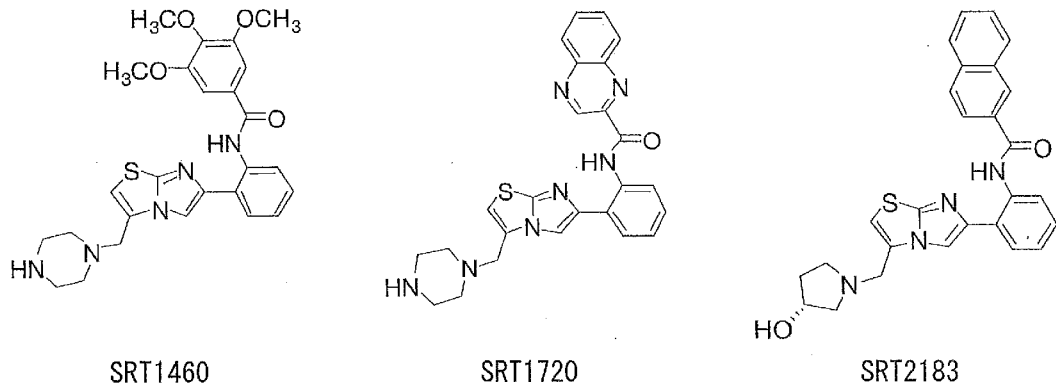
付けられる疾患の状態改善に有効であるなどということは、技術常識でも技術水準でもない。よって、筋ジストロフィーが細胞死に関係する慢性疾患の例として特許文献1に挙げられているに過ぎず、抗アポトーシス技術の適用対象として特許文献1に挙げられているのではないことを、当業者は十分理解している。同様の理由により、当業者は、特許文献2に記載の細胞死がネクローシスではなくアポトーシスであることを、十分理解している。

[0019] 活性化されたSIRT1が筋ジストロフィーの改善に有効であることは、当業者が容易に予測し得ることではない。特に、筋ジストロフィーのモデルマウスにおいて観察される骨格筋の線維化状態が劇的に改善されることは、格別顕著な効果である。

[0020] 本発明者らは、ポリフェノールの1つのRSVが、SIRT1を活性化することによってスーパーオキシドディスムターゼ(MnSOD)を誘導して、細胞の酸化ストレス耐性を向上させ、その結果、遺伝的に心不全を生じるT0-2ハムスターの寿命を優位に延長させることを見出している。すなわち、1つの局面において、「SIRT1活性化因子」は、ポリフェノールであり得、フラボン、ステルベン、フラバノン、イソフラボン、カテキン、カルコン、タンニンおよびアントシアニンからなる群より選択される化合物、またはその誘導体であり得る。好ましくは、「SIRT1活性化因子」は、RSV、ブテイン、ピセアタンノール、イソリキリチゲニン、フィセチン、ルテオリン、テトラヒドロキシフラボンおよびケルセチンからなる群より選択される化合物、またはその誘導体であり、より好ましくは、RSV、またはその誘導体である。RSVの誘導体としては、グリコシド配糖体が好ましく、より好ましくは、RSVの3-O-β-D-グリコシド(3G-RSV)および4'-O-β-D-グリコシド(4'G-RSV)が挙げられ、4'-O-β-D-グリコシド(4'G-RSV)が最も好ましい。

[0021] なお、他の局面において、SIRT1活性化因子は、天然から分離されたものであっても合成されたものであってもよく、以下に示すSRT1460、SRT1720およびSRT2183、

[0022] [化1]



[0023] ならびにSIRT1活性化因子3（2-アミノ-N-シクロペンチル-1-(3-メトキシプロピル)-1H-ピロロ[2,3-b]キノキサリン-3-カルボキサミド）（Nature 450(29): 712-716 (2007)およびJournal of Biomolecular Screening 11(8): 959-967 (2006)参照）、さらには特許文献1においてスクリーニングされたサーチイン活性化剤もまた、SIRT1活性化因子に包含される。

[0024] 当業者は、NADおよびSir2ファミリータンパク質（例えば、SIRT1）を含む酵素反応系を用いたスクリーニング法によって、SIRT1活性化因子を容易に取得し得る。

[0025] 本発明者らは、SIRT1が核と細胞質との間を移動することによってその活性が調節されることなどを見出している。すなわち、さらなる局面において、「SIRT1活性化因子」は、SIRT1を核内移行させる因子であり得る。本明細書中にて使用される場合、SIRT1を核内移行させる因子は、Sir2ファミリータンパク質（すなわち、サーチインタンパク質）を細胞質から核内へ移行させる能力を有する因子が意図される。後述する実施例にて示すように、細胞内cGMPを増加させると骨格筋細胞におけるSIRT1の核内移行が増強されて、SIRT1の活性化が促進される。すなわち、一実施形態において、SIRT1を核内移行させる因子は、細胞内cGMPを増加させる因子であり得る。細胞内cGMPを増加させる因子としては、cGMPの非水解性アナログ（例えば、CPT-cGMP）、ホスホ

ジエステラーゼ5（PDE-5）の酵素活性を阻害する因子（例えば、タダラフィル（Tad））が挙げられるが、これらに限定されない。なお、Tadは、生体内でcGMPを分解するホスホジエステラーゼ5（PDE-5）の酵素活性を阻害し、これにより、NO作動性神経に作用して血管を拡張させて、血流量を増加させる。Tadは、勃起不全の治療薬（Cialis（登録商標））としてもよく知られている。

[0026] また、当業者は、培養細胞におけるSIRT1の核内移行を検出する系を用いたスクリーニング法によって、SIRT1活性化因子を容易に取得し得る。

[0027] 本発明において、SIRT1活性化因子は単独で用いられても複数組み合わせさせて用いられてもよい。複数組み合わせさせて用いられる場合、SIRT1活性化因子の少なくとも1つがSIRT1を核内移行させる因子であってもよい。

[0028] [2] 有効成分の利用

(1) 組成物

本発明は、筋ジストロフィーを処置するための有効成分を含有する組成物を提供する。本明細書中にて使用される場合、用語「処置」は、症状の軽減または排除が意図され、治療的（発症後）に行われ得るものだけでなく、予防的（発症前）に行われ得るものもまた包含される。「筋ジストロフィーを処置するための有効成分」は、上述したSIRT1活性化因子が意図され、本明細書中にて「有効成分」と省略され得る。

[0029] 本発明に係る組成物中に使用されるキャリアおよび賦形剤は、薬学的に受容可能なものであれば特に限定されない。本明細書中にて使用される場合、「薬学的に受容可能なキャリア」は、組成物を受容した個体において有害な抗体の産生をそれ自体は誘導しない任意のキャリアが意図される。このようなキャリアは当業者に周知である。また、薬学的に受容可能な賦形剤については、当該分野において公知であり、例えば、REMINGTON 'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Merck Pub. C

o. , N. J. 1991) に十分に記載されている。さらに、本発明に係る組成物は、水、生理食塩水、グリセロール、またはエタノールのような1つ以上の成分をさらに含み得る。さらに、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質、安定化剤、抗酸化剤などのような補助物質が、本発明に係る組成物中に存在し得る。

[0030] 本発明に係る組成物は、経口投与に好ましい錠剤、カプセルなどの形態として調製され得る。また、本発明に係る組成物は、液体溶液もしくは懸濁液、または注射のための液体ビヒクル中の溶液もしくは懸濁液のために適切な固体形態、あるいは局所的に塗布されるクリームとして調製され得る。そして、本発明に係る組成物の直接送達は、一般に、経口、注射（皮下、皮内、腹腔内、管腔内、胃内、腸内、静脈内または筋肉内）、または塗布により達成される。経口送達の場合、本発明に係る組成物は、タブレット状、顆粒状、カプセル状などの経口的に摂取可能な形状であり得、所望の作用を発現させる量の有効成分が含有されていれば、その形状が特に限定されない。

[0031] 本発明に係る組成物は、製薬分野における公知の方法により製造することができる。本発明に係る組成物における有効成分の含有量は、投与形態、投与方法などを考慮し、当該組成物を用いて後述の投与量範囲で有効成分を投与できるような量であれば特に限定されない。また、本発明に係る組成物の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的、および投与対象である患者の年齢、体重、症状によって適宜設定される。投与は、所望の投与量範囲内において、1日内において単回で、または数回に分けて行われてもよい。

[0032] (2) キット

本発明はまた、筋ジストロフィーを処置するための有効成分を備えているキットを提供する。本明細書中にて使用される場合、用語「キット」は、特定の材料を内包する容器（例えば、ボトル、プレート、チューブ、ディッシュなど）を備えた包装が意図される。好ましくは、上記材料を使用するための指示書を備えている。本明細書中にてキットの局面において使用される場

合、「備えた（備えている）」は、キットを構成する個々の容器のいずれかの中に内包されている状態が意図される。また、本発明に係るキットは、複数の異なる組成物を1つに梱包した包装であってもよく、容器中に内包された溶液形態の組成物を梱包していてもよい。本発明に係るキットは、異なる2つ以上の物質を同一の容器に混合して備えても別々の容器に備えてもよい。「指示書」は、紙またはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、あるいは磁気テープ、コンピューター読み取り可能ディスクまたはテープ、CD-ROMなどのような電子媒体に付されてもよい。本発明に係るキットは、上述した組成物を構成するためにもちいられてもよく、上述した組成物に含まれる物質を別々に備えていても、上述した組成物とさらなる成分とを別々に備えていてもよい。

[0033] (3) 筋ジストロフィーを処置する方法

本発明はさらに、筋ジストロフィーを処置するための方法を提供する。本発明に係る方法は、筋ジストロフィーを処置するための有効成分を被験体に投与する工程を包含する。本発明に係る方法における有効成分の適用は、上述した組成物およびキットの使用形態に準じればよいことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。

[0034] なお、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中にて参考として援用される。

[0035] 本発明は、以下の実施例によってさらに詳細に説明されるが、これに限定されるべきではない。

実施例

[0036] [材料および方法]

C57BL/10マウス (C57BL/10-ScN Jic) およびMdxマウス (C57BL/10-mdx Jic) を、株式会社ホクドーより購入した。マウスから単離した大腿二頭筋を液体窒素で凍結した後に、クリオスタットを用いて切片化した。得られた切片を、4%パラホルムアルデヒドを含む中性リン酸ナトリウム緩衝液で固定し、次いで、定法に従ってヒツ

ジ抗フィブロネクチン抗体 (AHP08, UK-Serotec Ltd)、および Alexa Fluor 488 標識したロバ抗ヒツジ IgG 抗体 (Invitrogen 社) を用いて免疫染色し、さらにアクチンを Alexa Fluor 594 ラベルファロイジンで染色した。染色した切片を、コンフォーカル顕微鏡 (Radiance 2100MP BioRad 社) を用いて観察した (図 1 上)。得られた画像を Adobe Photoshop CS3 で解析した。コントロールマウスのフィブロネクチン染色像の、1 画像あたり蛍光ピクセル数の平均を 100 として、他の画像の蛍光ピクセル数を表した。筋の横断径は、ファロイジンで染色された部分のピクセル数を Adobe Photoshop Cs3 によって解析した。各群に 3 匹のマウスを用い、一匹のマウス標本について 8 つの視野を撮影し、合計 24 視野の平均をグラフに表示した (図 1 下)。上グラフについて、*、未処置 Mdx コントロール群と比較 ($p < 0.05$) ; #, RSV 投与 Mdx 群と比較 ($p < 0.001$) ; +, 未処置コントロールマウス群と比較 (有意差なし)。下グラフについて、*、未処置 Mdx コントロール群と比較 ($p < 0.05$) ; &, 未処置コントロールマウス群と比較 ($p < 0.05$) , #, RSV 投与 Mdx 群と比較 (有意差なし) ; +, 未処置コントロールマウス群と比較 (有意差なし)。

[0037] C57BL10 マウス (C57BL/10-ScN Jic) および Mdx マウス (C57BL/10-mdx Jic) より単離した大腿二頭筋から、RNeasy (Qiagen 社) を用いて RNA を分離した。得られた RNA から逆転写酵素 (Invitrogen 社) を用いて変換した cDNA に対して、定量的 PCR (Applied Biosystems 社) を行うことによって、フィブロネクチン mRNA 量を定量した。コントロールとして用いた β -アクチン mRNA 量に対する割合を、未処置のコントロールマウスのデータを 100 として表示した (図 2)。それぞれの群に用いたマウスの数は、未処置コントロールマウス群、RSV+Tad 投与コントロールマウス群、および未処置 Mdx マウス群は $n=3$ 、Tad 投与 Mdx

マウス群は $n = 5$ 、RSV + Tad 投与 Mdx マウス群は $n = 6$ である。*
、未処置 Mdx コントロール群と比較 ($p < 0.05$)。

[0038] C2C12 細胞 (国立長寿医療研究センター研究所 古山達雄博士 (現香川県立保健医療大学) より供与された。) を、コラーゲン (Koken 社) でコートしたガラス板 (マツナミ社) 上に散布し、次いで培養した。100 nM タダラフィル (Toronto Research Chemicals 社) または 100 μ M CPT (8-CPT-cGMP, ナトリウム塩 (8-(4-クロロフェニルチオ) グアノシン-3', 5'-サイクリックモノホルフェート) Biaffin GmbH & Co KG, 社) を培地に添加し、28 時間後に 4% パラホルムアルデヒドを含む中性リン酸ナトリウム緩衝液を用いて細胞を固定した。コントロールを含め、細胞を、固定 24 時間前に 15 μ M アンチマイシン A (Sigma 社) で処理した。固定した細胞に対して、ウサギ抗マウス SIRT1 抗体 (Sakamoto et al., FEBS Lett., 556, 281-286, 2004) および Alexa Fluor 488 標識したヒツジ抗ウサギ抗体 (Invitrogen 社) を用いた免疫染色と、ヘキスト 33342 (Dojindo 社) による核染色を行った。染色後の細胞を、コンフォーカル顕微鏡 (Radiance 2100MP BioRad 社) を用いて観察した (図 3 上)。得られた画像を Adobe Photoshop CS3 を用いて解析した。核領域に存在する Alexa Fluor 488 蛍光ピクセル数の平均について、コントロール細胞の値を 100% として表示した。各実験について 8 視野からデータを集め、3 回同じ実験を繰り返し、合計 24 視野分からの平均値をそれぞれの棒グラフに表した (図 3 下)。**, コントロール群と比較 ($p < 0.01$)。

[0039] コントロール C2C12 細胞および 100 nM タダラフィル (Tad) を 28 時間作用させた細胞について、核分画と細胞質とを分画するキット (ProteoExtract, Calbiochem 社) を用いて、各画分を得た。コントロール細胞および Tad 処理細胞において、分画 24 時間前

に15 μ MアンチマイシンA (Sigma社) を作用させ、核内に存在するSIRT1量を増加させた。各画分について、抗SIRT1抗体 (Sakamoto et al.)、抗ラミンA/C抗体 (Cell Signaling社)、および抗GAPDH抗体 (Sigma社) を用いたウエスタンブロット法によって、タンパク質をウエスタンブロットによって検討した (図4上)。画像を、NIH Imageを用いて定量化した。3回の別々の実験を行い、定量化したデータをグラフに表した (図4下)。**, コントロール群と比較 ($p < 0.01$)。*, コントロール群と比較 ($p < 0.05$)。

[0040] C2C12細胞に、100 nM タダラフィル (Tad) または100 μ M CPTを24時間作用させた後に、定法に従ってRNAを分離した。得られたRNAからcDNAに変換し、PCR法を用いてSIRT1とGAPDHを増幅させ、1%アガロースゲルにて電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した (図5上)。また、細胞のタンパク質を、抗SIRT1抗体 (Sakamoto et al.) と抗GAPDH抗体 (Sigma社) を用いたウエスタンブロット法で調べた (図5下)。同様の検討を合計3回行い、TadまたはCPTの処理によってSIRT1のmRNA量およびタンパク質量が変化しないことを確認した。

[0041] Tad (70 mg/kg粉末飼料) を7日間経口投与したddYマウス (三協ラボサービス (株))、およびコントロールマウスを、麻酔後に4%パラホルムアルデヒドを含む中性リン酸ナトリウム緩衝液で全身還流固定した。固定したマウスから大腿二頭筋を収集した。分離した骨格筋を、同じパラホルムアルデヒド溶液で再度一晩固定した。組織をシュクロース溶液 (和光純薬) で脱水した後に凍結し、次いでクリオスタットを用いて切片を作製した。SIRT1抗体による免疫染色、およびヘキスト33342による核染色を行った切片を、コンフォーカル顕微鏡で観察した (図6上)。コントロール群およびTad投与群の各3匹についてそれぞれ6視野を撮影し、SIRT1が核に優位に存在している細胞の数の、全体の細胞数に占める割合の

平均を、グラフで表した（図6下）。***, コントロール群と比較（ $p < 0.001$ ）。

[0042] 〔結果〕

〔1：筋ジストロフィーマウスにおける骨格筋の線維化に対するRSVの効果〕

コントロールマウス（C57BL10）、および筋ジストロフィーのモデルマウスであるドゥシャンヌ筋ジストロフィ（Mdx）マウスから収集した骨格筋をフィブロネクチン染色し、骨格筋にて生じている線維化を観察した（図1）。未処置のMdxマウスでは、線維化された、白くスカスカの、特徴的な筋肉が観察された。RSV（4g/kg粉末飼料）を32週間にわたって経口投与したMdxマウス（Mdx+RSV）では、骨格筋の線維化が抑制されていた。RSV（4g/kg飼料）とTad（70mg/kg飼料）とを併用して32週間にわたって経口投与したMdxマウス（Mdx+RSV+Tad）では、骨格筋の線維化がさらに抑制されており、筋線維の横断径も正常化していた。ただし、筋量においては、RSVによる効果をTadが増強させることはなかった。なお、コントロールマウスでは、未処置のものも、RSVおよびTadを投与したものも、骨格筋の線維化が生じていなかった。上段には、アクチンとフィブロネクチンとの二重染色像を示し、下段には、コントロールに対する、フィブロネクチン染色の割合および骨格筋の断面積の割合を示した。グラフにおいて、1は未処置のコントロールマウス、2はRSVおよびTadで処置したコントロールマウス、3は未処置のMdxマウス、4はRSV投与したMdxマウス、5はRSVとTadとを投与したMdxマウスを示す。

[0043] このように、RSVはMdxマウス骨格筋の線維化を抑制し、筋量を増加させる。そして、TadのRSVとの併用は、RSVによる線維化抑制効果をさらに増強するが、RSVによる筋量増加効果には影響しないといえる。

[0044] さらに、未処置のMdxマウス、RSV投与したMdxマウス、およびRSVとTadとを投与したMdxマウスから収集した骨格筋におけるフィブ

ロネクチンmRNAの発現量を調べた。RSVを、単独もしくはTadと併用によって、粉末状にした食餌に混合してMdxマウスに32週間投与し、続いて、大腿二頭筋のフィブロネクチンmRNAの発現量を定量PCR法で検討した(図2)。図は、 β アクチンmRNAに対する割合を示すグラフであり、グラフにおいて、1は未処置のコントロールマウス、2はRSVおよびTadで処置したコントロールマウス、3は未処置のMdxマウス、4はRSV投与したMdxマウス、5はRSVとTadとを投与したMdxマウスを示す。示されるように、RSV単独およびRSVとTadとの併用はいずれもフィブロネクチンmRNAレベルを減少させた。1、2、4および5におけるmRNAレベルは、3におけるmRNAレベルと有意に差があった($p < 0.05$)。

[0045] このように、RSVは、タンパク質レベルだけではなくmRNAレベルにおいても、Mdxマウス骨格筋の線維化を抑制する。上述したように、RSVはSIRT1を活性化することが知られている。すなわち、SIRT1が活性化されることによって、Mdxマウス骨格筋の線維化が抑制されたといえる。また、TadのRSVとの併用は、RSVによる線維化抑制効果をさらに増強する。

[0046] [2:骨格筋細胞におけるSIRT1の活性化]

上述したように、SIRT1は、心筋細胞において細胞質から核内へ移行した後にその活性を示すことが知られている。骨格筋細胞においてもまた、SIRT1が細胞質から核内へ移行して活性化している可能性がある。そこで、骨格筋細胞におけるSIRT1の局在およびその変化を調べた。

[0047] 図3に示すように、骨格筋細胞(C2C12細胞)においても、SIRT1は細胞質にて発現していることがわかった。そして、Tadを用いて細胞を前処理することによって核内でのSIRT1の発現が増加した。上述したように、Tadは、生体内でcGMPを分解するホスホジエステラーゼ5(PDE-5)の酵素活性を阻害する。そこで、cGMPキナーゼを活性化させるcGMPアナログであるCPT-cGMP(CPT)を用いて、同様に

細胞を前処理したところ、T a dの場合と同様に、核内でのS I R T 1の発現が増加した。図には、S I R T 1抗体を用いた免疫染色像（上）、および核内のS I R T 1の相対値（下）を示した。

[0048] さらに、イムノブロッティング法を用いて、図3に示した免疫染色の結果を検証した（図4）。図には、細胞分画法で分画した細胞質画分と核画分とに対するウエスタンブロットの結果（上）、および核画分または細胞質画分におけるS I R T 1の相対値（下）を示した。核画分については、ラミニンを核タンパク質のコントロールとして、細胞質画分については、G A P D Hを細胞質タンパク質のコントロールとして用いた。示されるように、C 2 C 1 2細胞に対してT a dを前処理しておくことによって細胞質でのS I R T 1の発現は有意に減少し、逆に、核でのS I R T 1の発現が有意に増加したことがわかる。

[0049] これらのことから、細胞内c G M Pを増加させると、骨格筋細胞におけるS I R T 1の核での発現が増強されるといえる。ただし、T a dまたはC P Tを前処理しても、細胞全体におけるS I R T 1の総発現量（m R N Aおよびタンパク質の両方）には変化がない（図5）。これにより、細胞内c G M Pを増加させると骨格筋細胞におけるS I R T 1の核内移行が増強されており、S I R T 1の活性化が促進されているということがわかった。

[0050] [3：マウス骨格筋におけるS I R T 1の活性化]

培養細胞において観察された、T a dによるS I R T 1の核内移行が、マウス生体内にて生じるか否かを確認した。T a d（70mg/kg粉末飼料）を1週間d d yマウスに経口投与した後に、マウスから骨格筋を収集し、S I R T 1による免疫染色を行った（図6）。Aには、骨格筋におけるS I R T 1の免疫染色像（左）およびその結果を数値化したグラフを示す。示されるように、マウス骨格筋においても、S I R T 1の核での発現量が、コントロールマウスと比較してT a d投与マウスにおいて優位に増加していた。これにより、細胞内c G M Pを増加させると骨格筋細胞におけるS I R T 1の核内移行が増強されており、S I R T 1の活性化が促進されているという

ことがわかった。

[0051] [4 : R S V配糖体の抗酸化活性]

R S V、ならびにR S V配糖体である3-O-β-D-グリコシド(3 G-R S V)および4'-O-β-D-グリコシド(4' G-R S V)の構造を図7に示す。R S VおよびR S V配糖体のラジカル消去活性(抗酸化活性)を調べた。

[0052] R S V配糖体を以下のように調製した。Murashige-Skoog(MS)基本培地に、3%スクロース、2,4-dichlorophenoxyacetic acidを最終濃度1 ppmで添加した液体培地(100 mL)に、新鮮重量20 gの植物培養細胞を移し、120 rpmにて25°Cで4日間振盪培養した。その後、DMSO(100 μL)に溶解した40 μmol R S V(東京化成)を液体培地に添加し、同一条件下にて2日間培養した。

[0053] 培養後、ナイロンメッシュで培地と培養細胞とを濾別し、濾液を水飽和n-ブタノールで分配抽出し、細胞をホモジナイズした後にメタノールで静置抽出した。それぞれの有機相を減圧下にて濃縮し、メタノールで5.0 mLに調製したものをサンプルとした。

[0054] 得られたサンプルを逆相HPLCにて分析し、変換物を確認した。この変換物を分取HPLCで単離・精製し、LC/MSおよびNMRを用いて構造解析を行って、3 G-R S Vおよび4' G-R S Vであることを確認した。

[0055] 図8に、1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル(DPPH)を用いた、R S V、3 G-R S Vおよび4' G-R S Vのラジカル消去活性を示す。DPPHは、517 nmに特異的な吸収波長を有している。抗酸化物質によってラジカルが奪われると、517 nmの吸収が減少する。この反応を用いて、ラジカルの消去率を測定し、測定値に基づいて50%阻害濃度(IC₅₀)を算出し、抗酸化活性を比較した。DPPHをメタノールに溶解し、0.15 mMに調整した。R S VおよびR S V配糖体の二倍段階希釈(1/2~1/512)の希釈系列サンプルを作製し、これらのサンプルとDPPH

H溶液とを500 μ Lずつ混合／攪拌し、暗所にて室温で30分間反応させた後に、517 nmにおける吸収を測定した。

[0056] 図8に示すように、RSV、3G-RSVおよび4'G-RSVのIC₅₀は、それぞれ79 μ M、110 μ Mおよび250 μ Mであった。このように、3G-RSVはRSVに匹敵する高いラジカル消去活性を示すが、4'G-RSVのラジカル消去活性はこれらよりもかなり低いことがわかった。

[0057] [5: RSV配糖体のヒストンH3脱アセチル化活性]

RSV配糖体がRSVと同様にヒストンH3脱アセチル化活性を有しているか否かを調べた。

[0058] マウス由来の筋肉芽細胞であるC2C12細胞を、10% FBS (MP Biomedicals Inc) および1% antibiotic-antimycotic mixed stock solution (Nacalai Tesque) を含む高グルコースのDMEM培地 (Wako) を用いて、37°C、5%CO₂の環境下にて培養した。

[0059] Western Blottingのために、培養したC2C12細胞を、最終濃度100 μ MのRSVおよびRSV配糖体の存在下にて18時間培養し、100 μ Mアンチマイシン (AA) を添加して6時間培養することによって、酸化ストレスを細胞に与えた。引き続く手順は定法に従った。用いた抗体は以下のとおりである: Monoclonal Anti-GAPDH Clone GAPDH-71.1 (SIGMA)、Anti-Histone H3 Acetylated (1-20) Rabbit pAb (Calbiochem)、Histone H3 antibody-ChIP Grade (ab1791) (Abcam)。

[0060] 図9に示されるように、コントロール群 (図中AA) に対して、3G-RSV処置群においてはヒストンH3脱アセチル化の促進作用が確認できなかったが、RSV処置群において、アセチル化ヒストンH3の有意な減少が観察され、4'G-RSV処置群では、RSV処置群よりも優れたヒストンH3脱アセチル化活性が観察された。このように、4'G-RSVが3G-RSVと比較してヒストンH3脱アセチル化を有意に促進することがわかった。

[0061] 上述したように、SIRT1活性化因子は、NAD依存性ヒストン脱アセチル化酵素であるSir2ファミリータンパク質（すなわち、サーチュインタンパク質）を活性化する能力を有する因子であり、生体内においてサーチュインタンパク質が活性化されると、ヒストンH3の脱アセチル化が引き起こされる。RSVは、抗酸化物質としても知られているが、RSVと同程度の抗酸化活性を有する3G-RSVによって、ヒストンH3の脱アセチル化は引き起こされない。これらのことは、本実施例にて実証した筋ジストロフィーの治療効果があくまでもRSVのSIRT1活性化因子としての機能に基づくものであり、抗酸化物質としての機能に基づくものではないことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。そして、本実施例にてSIRT1活性化因子としてRSVを用いて本発明を説明しているが、本発明に利用可能なSIRT1活性化因子はRSVに限定されないことを、本明細書を読んだ当業者は容易に理解する。

[0062] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

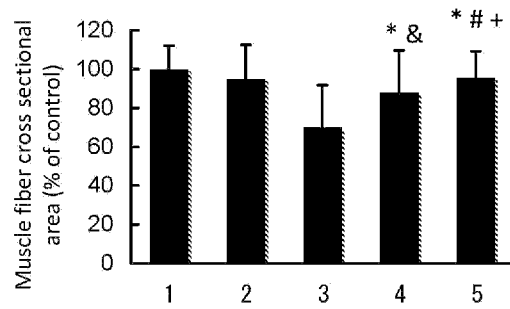
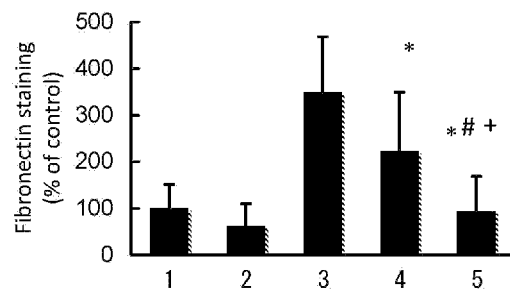
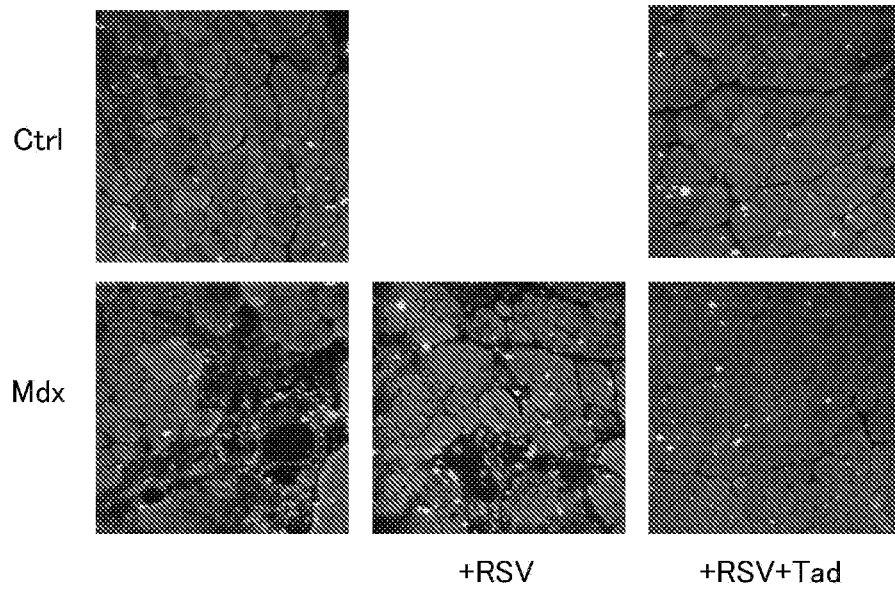
産業上の利用可能性

[0063] 本発明を用いれば、筋ジストロフィーを処置することができ、特に、筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化状態を劇的に改善することができる。このように優れたツールを提供する本発明は、医学、薬学の分野において利用可能であり、医薬品、生化学試薬の開発に大いに寄与することができる。

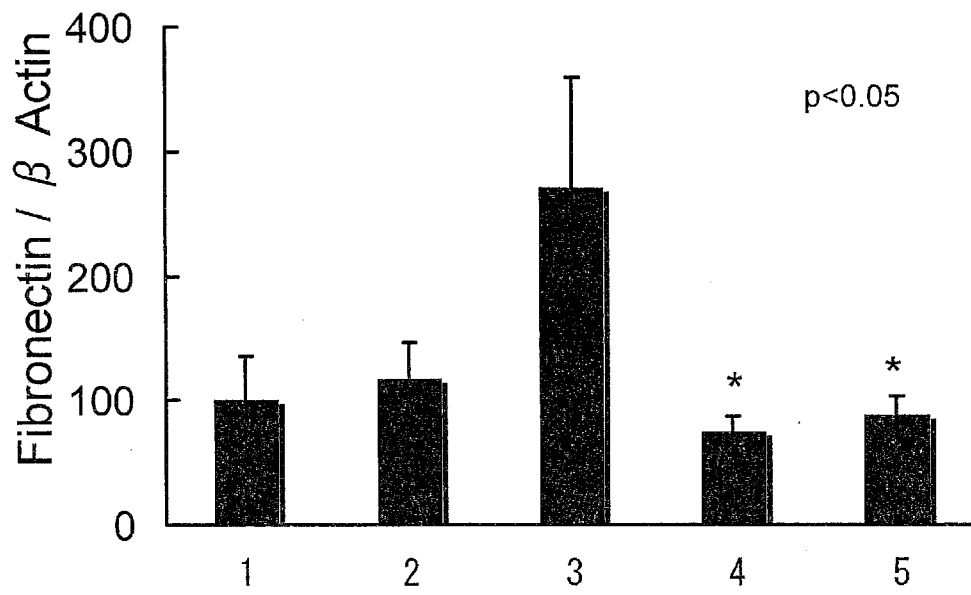
請求の範囲

- [請求項1] S I R T 1 活性化因子を有効成分として含んでいる、筋ジストロフィーを処置するための組成物。
- [請求項2] S I R T 1 を核内移行させる因子をさらに含んでいる、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化を抑制するために用いられる、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項4] S I R T 1 活性化因子を備えている、筋ジストロフィーを処置するためのキット。
- [請求項5] S I R T 1 を核内移行させる因子をさらに備えている、請求項4に記載のキット。
- [請求項6] 筋ジストロフィーにおける骨格筋の線維化を抑制するために用いられる、請求項4または5に記載のキット。

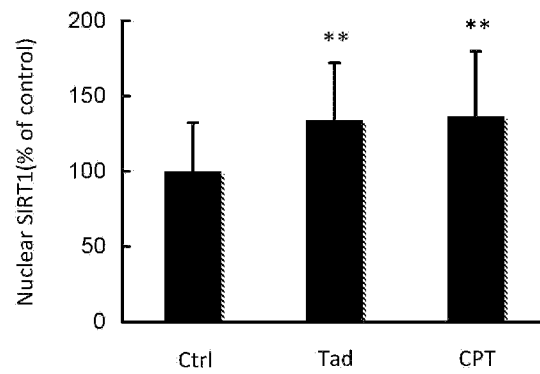
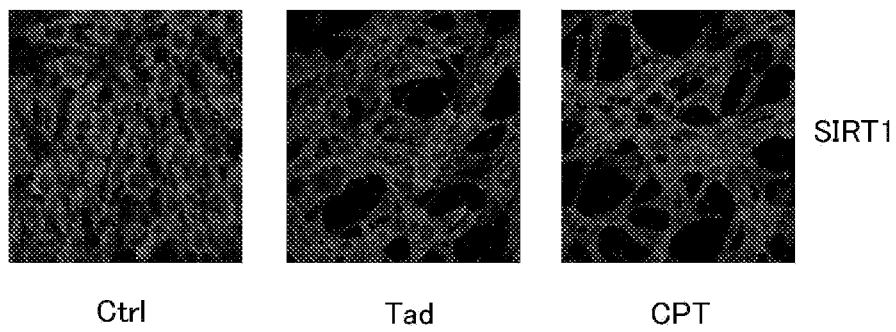
[図1]



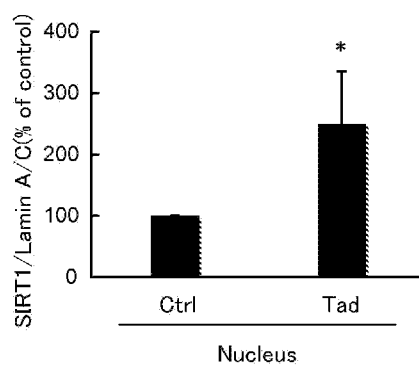
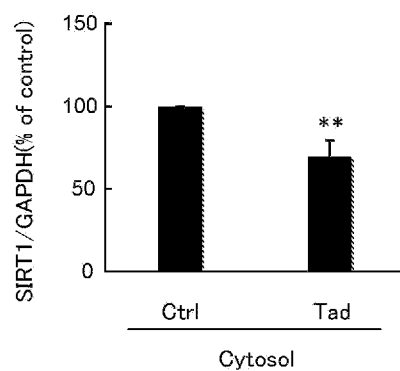
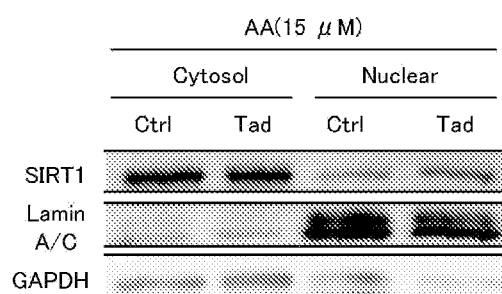
[図2]



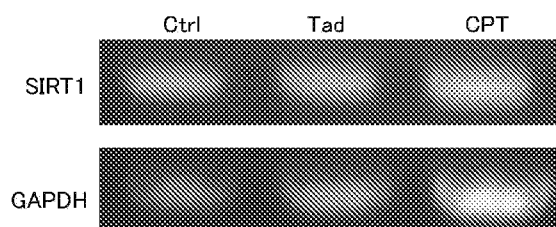
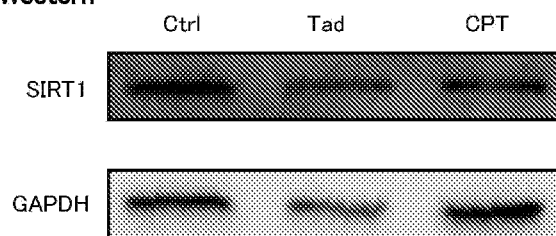
[図3]



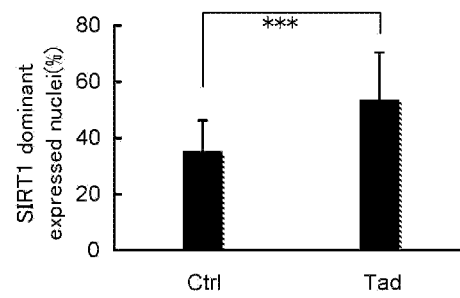
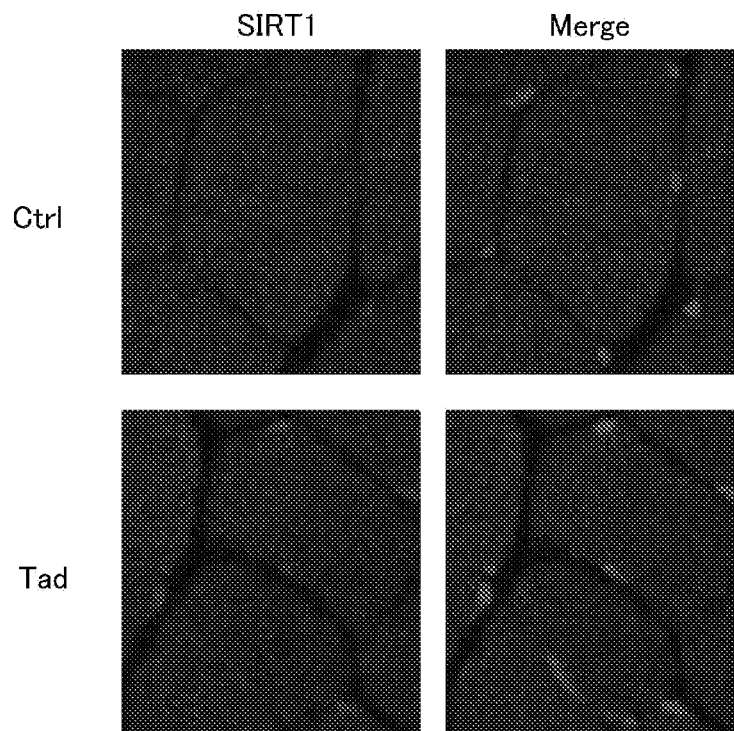
[圖4]



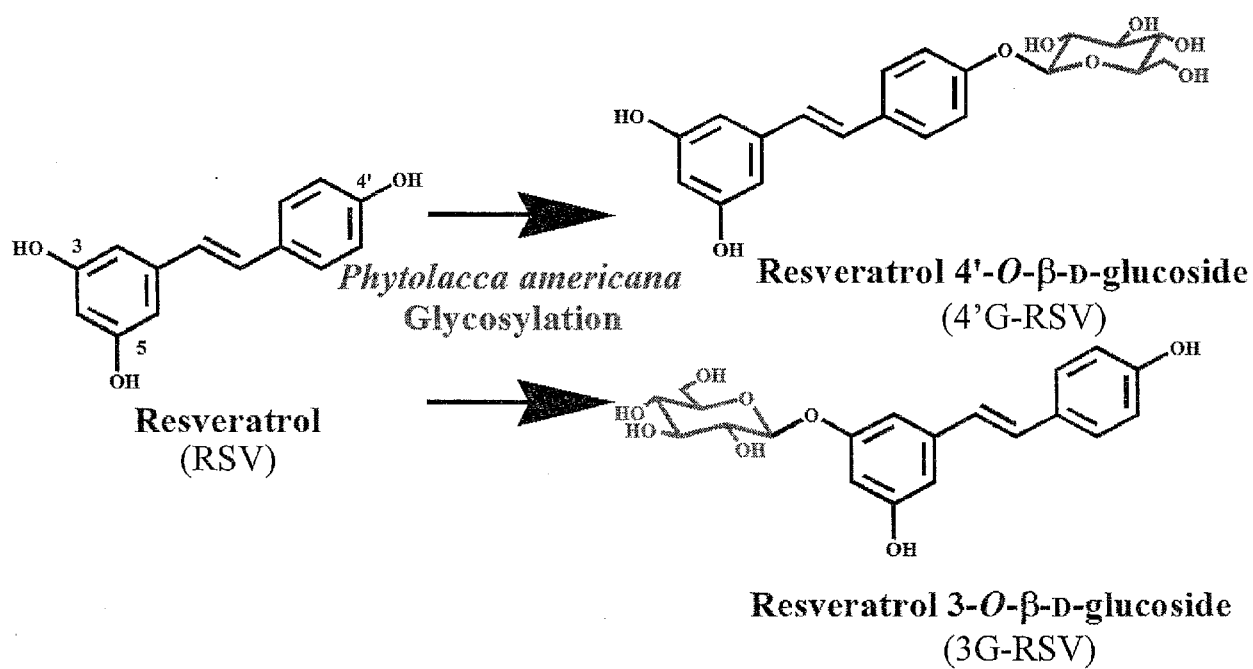
[圖5]

RT-PCR**Western**

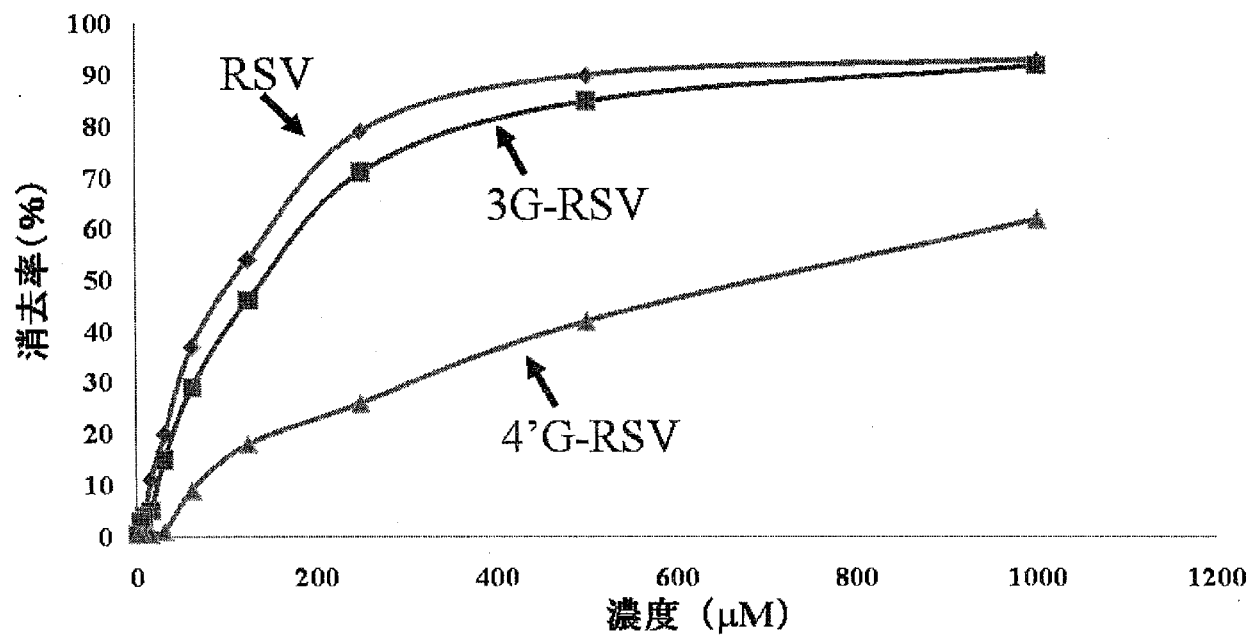
[図6]



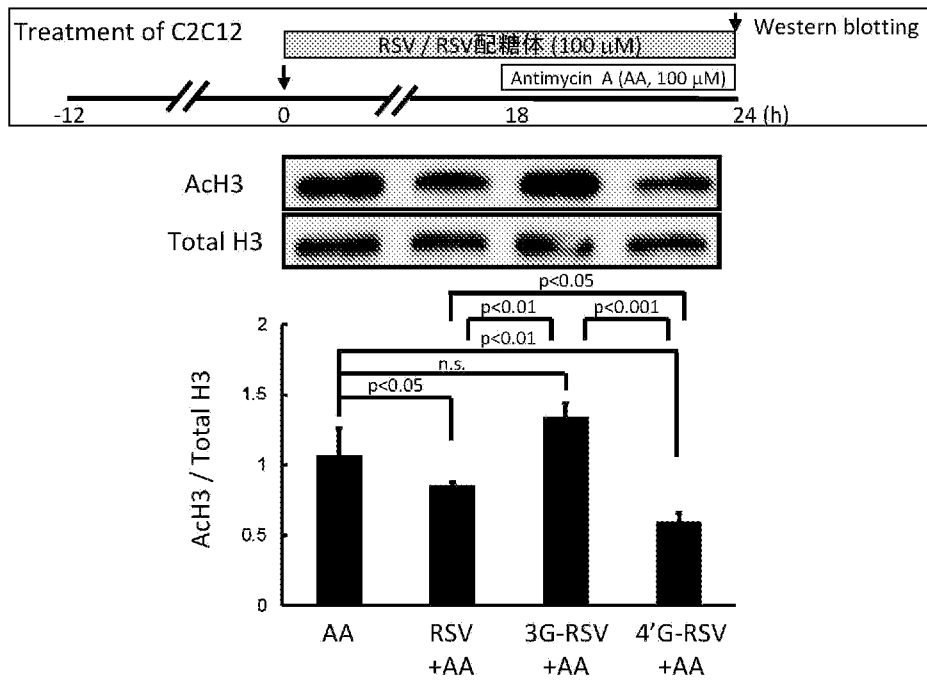
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070894

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K45/00(2006.01)i, A61K31/05(2006.01)i, A61K31/4985(2006.01)i,
A61K31/522(2006.01)i, A61K31/7034(2006.01)i, A61P21/04(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)

A61K45/00, A61K31/05, A61K31/4985, A61K31/522, A61K31/7034, A61P21/04

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2009-500357 A (Sirtris Pharmaceuticals, Inc.), 08 January 2009 (08.01.2009), claims 93, 94; paragraph [0879] & JP 2008-527002 A & US 2007/0149466 A1 & EP 1898897 A & WO 2007/008548 A2 & CA 2613141 A & CN 101257897 A & AU 2006204699 A & AU 2006204699 A1	1, 3, 4, 6 2, 5
X Y	JP 2009-511522 A (DSM IP Assets B.V.), 19 March 2009 (19.03.2009), claim 1; paragraph [0011]; example 1 & US 2009/0163579 A1 & EP 1937232 A & WO 2007/042271 A2 & CN 101312718 A & KR 10-2008-0105023 A & CN 101978958 A	1, 3, 4, 6 2, 5

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“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)

“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

“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

“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

“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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 October, 2011 (12.10.11)

Date of mailing of the international search report
25 October, 2011 (25.10.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/070894

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Asai Akihiro et al, Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy., PloS one, 2007, Vol. 2, No. 8, p. e806	2, 5
P, X	Yusuke S. Hori et al, Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy., The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, Vol.338, No. 3, 2011.06.07, p.784-94	1, 3, 4, 6
P, X	Yusuke Hori et al, Resveratrol, a SIRT1 activator inhibits muscle fibrosis in mdx mouse, J Pharmacol Sci, 2011.02, Vol.115, Supplement 1, Page.65P	1, 3, 4, 6
P, X	Yusuke HORI et al., "Resveratrol ni yoru Muscular Dystrophy no Chiryō", Japanese Association of Cardiovascular Pharmacology Koen Yoshishu, 2010.11, vol.20th, pages 46 to 47	1, 3, 4, 6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61K31/05(2006.01)i, A61K31/4985(2006.01)i, A61K31/522(2006.01)i, A61K31/7034(2006.01)i, A61P21/04(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. A61K45/00, A61K31/05, A61K31/4985, A61K31/522, A61K31/7034, A61P21/04

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	1971-2011年
日本国実用新案登録公報	1996-2011年
日本国登録実用新案公報	1994-2011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)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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 Y	JP 2009-500357 A (サートリス ファーマシューティカルズ、インコーポレイテッド) 2009.01.08, 請求項93及び94、【0879】 & JP 2008-527002 A & US 2007/0149466 A1 & EP 1898897 A & WO 2007/008548 A2 & CA 2613141 A & CN 101257897 A & AU 2006204699 A & AU 2006204699 A1	1, 3, 4, 6 2, 5

C欄の続きにも文献が列挙されている。

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

の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

12.10.2011

国際調査報告の発送日

25.10.2011

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)

菊池 美香

4C

3954

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

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 Y	JP 2009-511522 A (ディーエスエム アイビー アセツ ビー. ブイ.) 2009.03.19, 請求項1、【0011】、実施例1 & US 2009/0163579 A1 & EP 1937232 A & WO 2007/042271 A2 & CN 101312718 A & KR 10-2008-0105023 A & CN 101978958 A	1, 3, 4, 6 2, 5
Y	Asai Akihiro et al, Primary role of functional ischemia, quantitative evidence for the two-hit mechanism, and phosphodiesterase-5 inhibitor therapy in mouse muscular dystrophy., PloS one, 2007, Vol. 2, No. 8, p. e806	2, 5
P, X	Yusuke S. Hori et al, Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy., The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, Vol.338, No. 3, 2011.06.07, p.784-94	1, 3, 4, 6
P, X	Yusuke Hori et al, Resveratrol, a SIRT1 activator inhibits muscle fibrosis in mdx mouse, J Pharmacol Sci, 2011.02, Vol.115, Supplement 1, Page.65P	1, 3, 4, 6
P, X	堀佑輔他, レスベラトロールによる筋ジストロフィーの治療, 日本循 環薬理学会口演要旨集, 2010.11, Vol.20th, Page.46-47	1, 3, 4, 6