

(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2020-100601

(P2020-100601A)

(43) 公開日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/351 (2006.01)	A 6 1 K 31/351	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/12 (2006.01)	A 6 1 P 9/12	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 1 0 1	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-241295 (P2018-241295)	(71) 出願人	504258527
(22) 出願日	平成30年12月25日 (2018.12.25)		国立大学法人 鹿児島大学
			鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
		(74) 代理人	110002572
			特許業務法人平木国際特許事務所
		(72) 発明者	丸山 征郎
			鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号
			国立大学法人鹿児島大学内
		Fターム(参考)	4C086 AA01 AA02 BA07 MA01 MA04
			MA17 MA37 MA43 NA14 ZA36
			ZA42 ZA45 ZA81 ZC19

(54) 【発明の名称】 一酸化窒素合成酵素活性化剤

(57) 【要約】

【課題】血管保護や様々な疾患の治療又は予防に有効な一酸化窒素合成酵素活性化剤を提供することを目的とする。

【解決手段】1,5-アンヒドログルシトール及び/又は1,5-アンヒドロフルクトースを有効成分として含有する一酸化窒素合成酵素活性化剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

1,5-アンヒドログルシトール及び/又は1,5-アンヒドロフルクトースを有効成分として含有する、一酸化窒素合成酵素活性化剤。

【請求項 2】

一酸化窒素合成酵素が、血管内皮細胞、神経細胞、血小板、赤血球及び白血球から成る群より選択される細胞に存在するものである、請求項 1 記載の一酸化窒素合成酵素活性化剤。

【請求項 3】

1,5-アンヒドログルシトール及び/又は1,5-アンヒドロフルクトースを有効成分として含有する、虚血性疾患治療又は予防剤。

10

【請求項 4】

虚血性疾患が、血管閉塞性疾患、陰萎及び高血圧から成る群より選択されるものである、請求項 3 記載の治療又は予防剤。

【請求項 5】

血管閉塞性疾患が、動脈硬化、脳梗塞、虚血性心疾患、腎障害及び末梢血管閉塞症から成る群より選択されるものである、請求項 4 記載の治療又は予防剤。

【請求項 6】

粉末剤、カプセル剤及び水溶液から成る群より選択される剤形である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の一酸化窒素合成酵素活性化剤又は治療若しくは予防剤。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば糖尿病、高脂血症、加齢性変化などによる血管の基質的あるいは機能的血流低下、あるいは器質的血管障害や血管閉塞、血管収縮など様々の血管病、虚血性臓器障害の予防と治療に関する。

【背景技術】

【0002】

一酸化窒素(Nitric Oxide; 以下、「NO」と称する)は、生体内では血管内皮細胞、神経細胞、血小板、赤血球、白血球等の細胞に存在するNO合成酵素(NO synthase; 以下、「NOS」と称する)によりアルギニンより合成されて、ガスメディエーターとして周辺の細胞内に拡散してゆき、cGMPを介して種々の生理活性(血管拡張作用、血小板活性化抑制作用、炎症抑制、神経伝達作用等)を発揮し、円滑な血液循環、血栓防止、血管保護、神経活動等に極めて重要な役割を果たしている。

30

【0003】

しかしながら、NOはガスであるため、半減期が10数秒と極めて短いうえに、糖尿病、高脂血症、加齢などではNOS活性が失活する他、産生も低下し、このことが脳や心臓、腎臓、生殖器を初めとする生体諸臓器の虚血病態の発生に深く関係していることが知られている。

【0004】

そのため、NO産生の増加は上記疾患や病態の治療や予防に極めて重要である。従来において、NO産生を増加させる薬剤として、NO発生源となる亜硝酸誘導体(ニトログリセリン等)やNOの標的分子であるcGMP分解阻害剤(パイアグラ等)が知られている。また、内皮細胞性NOS(endothelial NOS; eNOS)は、血液にズリ応力を掛けると発現が増すことからエクササイズや、一過性に血管を加圧緊迫/開放(加圧療法、トレーニング)でもNOを増やすことができる。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、上述の実情に鑑み、血管保護や様々な疾患下での虚血性病態の治療又は予防

50

に有効なNOS活性化剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、デンプン由来の単糖：1,5-アンヒドロフルクトース(1,5-anhydrofructose；以下、「1,5-AF」と称する)の代謝産物である1,5-アンヒドログルシトール(1,5-anhydroglucitol；以下、「1,5-AG」と称する)がNOSを活性化して、NO産生を増加させ、諸生理活性を発揮することを見出し、本発明を完成するに至った。生体内では1,5-AFは速やかに(1-3時間以内)代謝されて、最終産物：1,5-AGに変換され、腎臓より排泄されるが、一部は腎尿細管より再吸収される。本発明はこの1,5-AGの生理活性とその応用展開にかかわるものである。

10

【0007】

以上より、本発明は、以下を包含する。

- (1) 1,5-AG及び/又は1,5-AFを有効成分として含有するNOS活性化剤。
- (2) NOSが血管内皮細胞、神経細胞、血小板、赤血球及び白血球から成る群より選択される細胞に存在するものである、(1)記載のNOS活性化剤。
- (3) 1,5-AG及び/又は1,5-AFを有効成分として含有する、虚血性疾患治療又は予防剤。
- (4) 虚血性疾患が、血管閉塞性疾患、陰萎及び高血圧から成る群より選択されるものである、(3)記載の治療又は予防剤。
- (5) 血管閉塞性疾患が、動脈硬化、脳梗塞、虚血性心疾患、腎障害及び末梢血管閉塞症から成る群より選択されるものである、(4)記載の治療又は予防剤。
- (6) 粉末剤、カプセル剤及び水溶液から成る群より選択される剤形である、(1)～(5)のいずれか1記載のNOS活性化剤又は治療若しくは予防剤。

20

【発明の効果】

【0008】

本発明に係るNOS活性化剤によれば、体内においてNOSを活性化し、NO産生を増加させることで、血管を保護し、また様々な疾患を治療又は予防することができる。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】1,5-AG添加による血管内皮細胞由来NO産生の増加を示すグラフである。

【図2】1,5-AG添加による血小板のコラーゲン凝集抑制を示すグラフである。

30

【図3】1,5-AGによる血管内皮細胞保護作用(高血糖刺激)を示すグラフである。

【図4】1,5-AGによる血管内皮細胞保護作用(無血清下培養による内皮障害の抑制)を示すグラフである。

【図5】酸化LDLの細胞傷害効果に対する1,5-AGの血管内皮細胞保護作用を示すグラフである。

【図6】1,5-AGによるp44/42 MAPKリン酸化(血管内皮細胞)を示す。写真における矢印箇所は、1,5-AGによりAktではなく、p44/42 MAPKがリン酸化されることを示す。

【図7】1,5-AF(5g)を1回摂取した後の尿中1,5-AFとその代謝産物1,5-AGの濃度を示すグラフである。

【図8】1,5-AGの活性(NOの産生とその機能)のまとめを示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本発明に係るNOS活性化剤は、1,5-AG及び/又は1,5-AFを有効成分として含有するものである。

【0012】

NOSは、L-アルギニンを基質としてNOを合成する酵素である。本発明に係るNOS活性化剤によれば、例えば血管内皮細胞、神経細胞、血小板、赤血球、白血球等の細胞に存在するNOSを活性化させ、NO産生を増加させることができる。

50

【 0 0 1 3 】

また、本発明に係るNOS活性化剤によれば、NO産生を増加させることで、血管を保護することができる。ここで、血管保護とは、血管系の疾患から血管を保護することを意味する。本発明に係るNOS活性化剤によるNO産生の増加により、血管平滑筋細胞を弛緩させ、また血小板の凝集を抑制することで、血液を円滑に循環させ、血栓を防止することができる。従って、本発明に係るNOS活性化剤は、血管保護剤として使用することができる。

【 0 0 1 4 】

さらに、本発明に係るNOS活性化剤によれば、NO産生を増加させることで、NO産生の低下に起因する疾患を治療又は予防することができる。従って、本発明に係るNOS活性化剤は、NO産生の低下に起因する疾患の治療若しくは予防剤として使用することができる。このような疾患としては、例えば血管閉塞性疾患（動脈硬化、脳梗塞、虚血性心疾患、腎障害、末梢血管閉塞症）、陰萎、高血圧等の虚血性疾患が挙げられる。

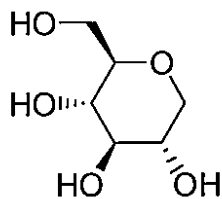
10

【 0 0 1 5 】

本発明に係るNOS活性化剤における有効成分である1,5-AGは、以下の式で示される構造式を有するものである。

【 0 0 1 6 】

【化1】



20

【 0 0 1 7 】

1,5-AGは、食品にも豆類、コメ、牛肉等にも含まれており、ヒトは食品から平均4.38mg/日の1,5-AGを摂取し、4.78mg/日で尿から排泄しているという報告がある(差は1,5-AFから体内で産生されたもの)(Yamanouchi, et al., Am. J. Physiol. 1992 Aug. ; 263(2 Pt1) E.268-73)。

【 0 0 1 8 】

1,5-AGは、正常ヒトでは血清中に20 µg/ml前後含まれているが、それが低下している人や上記の種々の病態下の人に対して、本発明に係るNOS活性化剤を投与することにより、NOS活性化作用のある1,5-AGを補充して各臓器の血流を改善して、当該臓器の機能を改善するほか、血栓防止に好適な生体環境をもたらすことができる。

30

【 0 0 1 9 】

また、本発明に係るNOS活性化剤における有効成分として1,5-AGの前駆体である1,5-AFを含有してもよい。本発明者は、生体内において1,5-AFが速やかに(1~3時間以内)、1,5-AGに代謝されることを明らかにした。従って、1,5-AFを投与することにより、生体内において1,5-AGに代謝されることから、1,5-AGを間接的に投与することになる。

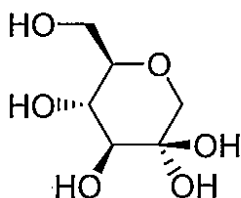
【 0 0 2 0 】

1,5-AFは、以下の式で示される構造式を有するものである。

40

【 0 0 2 1 】

【化2】



【 0 0 2 2 】

1,5-AGは、例えば特許第5075376号公報(「1,5-D-アンヒドログルシトールの製造法」)

50

に記載の方法等の公知の方法に準じて調製することができる。また、1,5-AFは、例えば特表平9-505988号公報(「1,5-D-アンヒドロフルクトース調製のための1,4-グルカンリアーゼの使用」)に記載の方法等の公知の方法に準じて調製することができる。

【0023】

本発明に係るNOS活性化剤は、安定でそれ以上の変化を受けないため、有効成分である1,5-AG及び/又は1,5-AF以外に、例えば製剤担体、賦形剤、水溶化剤、安定剤等、その他の製剤や製品を添加することも可能である。

【0024】

また、本発明に係るNOS活性化剤は、医薬品又は医薬部外品として使用することができる、あるいは飲食品等に配合することもできる。

10

【0025】

本発明に係るNOS活性化剤は、その剤形に応じてそれ自体公知の種々の方法で投与することが可能であり、その投与量、投与部位、投与する間隔、期間等は、患者の年齢や体重、病状あるいは他の薬剤や治療法と併用した場合等を考慮して適宜決定することができる。投与方法としては、特に制限されないが、例えば、経口投与、注射や点滴静注、あるいは噴霧、軟膏等の形での局所投与等が挙げられる。

【0026】

本発明に係るNOS活性化剤の投与量は、その剤形、投与方法、又は治療しようとする症状により異なるが、例えば、患者の体重1kg当たりの投与量として有効成分(1,5-AG及び/又は1,5-AF)換算で100~300mg、必要に応じては1~5gとすることができ、1日1回又は数回、あるいは数日毎に1回というような、適当な投与頻度によって投与することが可能である。

20

【0027】

本発明に係るNOS活性化剤の剤形としては、例えば粉末剤、カプセル剤(例えば、粉末入りカプセル剤)、水溶液、錠剤、散剤、顆粒剤、注射剤、点滴、噴霧剤、軟膏等が挙げられるが、特に制限されない。

【0028】

また、本発明は、1,5-AG及び/又は1,5-AFをヒトや動物等の被験体(患者)に投与することを含む、NOS活性化方法、血管保護方法、又はNO産生の低下に起因する疾患の治療若しくは予防方法に関する。1,5-AG及び/又は1,5-AFの剤形、投与様式、投与量等は、上述の本発明に係るNOS活性化剤に準じて決定することができる。

30

【実施例】

【0029】

以下、実施例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はこれら実施例に限定されるものではない。

【0030】

1. 本実施例で使用した1,5-AG及び1,5-AF

(株)日本澱粉(名称変更で現サナス株式会社)より供与された1,5-AGを使用した。本1,5-AGは、既に(株)日本澱粉がサツマイモ澱粉から生成して発売されている1,5-AF(商品名:アンヒドロース)から生成されたものである(1,5-D-アンヒドログルシトールの製造法(特許第5075376号公報))。

40

【0031】

また、1,5-AFとして、上述の(株)日本澱粉がサツマイモ澱粉から生成して発売しているもの(商品名:アンヒドロース)を使用した。

【0032】

2. 1,5-AG添加による血管内皮細胞由来NO産生の増加

ヒト血管内皮細胞(株式会社Lonza COより購入)を、培養液(EBM-2, Lonza)で型のごとく培養して実験に供した。使用直前に血清(-)、増殖因子(-)の基本培地に変えて、6時間後、1,5-AGを添加して所定の時間に培養上清を採取し、産生されたNOをNox(亜硝酸、二酸化窒素の混合体)として測定した(フナコシNO測定キット使用)。

50

【 0 0 3 3 】

結果を図 1 に示す。図 1 に示すように、ヒト血管内皮細胞に1,5-AG(0,10,50 µg/ml)を添加して、6時間後に上清中のNox(亜硝酸、二酸化窒素の混合体)として測定したところ50 µg/ml添加で、NOxの産生が観られた。これは繰り返し行った実験でも再現された。

【 0 0 3 4 】

3 . 1,5-AG添加による血小板のコラーゲン凝集抑制

正常ヒトPRP(多血小板血漿,PRP)に終濃度1,5-AF(0または10 µg/ml)+1,5-AG(10 µg/mlまたは20 µg/ml)添加して、0~4時間後にコラーゲン(馬腱由来、コラーゲン、エル・エム・エス社)を型のごとく添加して、血小板凝集能(ボーン法)を測定した。

【 0 0 3 5 】

結果を図 2 に示す。図 2 に示すように、多血小板血漿に20 µg/mlの1,5-AGを添加すると、インキュベーション時間(0~4時間)依存性に血小板のコラーゲン凝集が抑制された。1,5-AGの10 µg/mlの添加でも、血小板コラーゲン凝集は抑制されたが、この抑制度は20 µg/mlに比べ軽度であった。

10

【 0 0 3 6 】

4 . 1,5-AGによる血管内皮細胞保護作用(高血糖刺激,10% 血清存在下)

高血糖は内皮細胞を障害する(糖毒性という)。正常人の空腹時血糖は110~125mg/dlであるが、糖尿病患者では、正常範囲を超して、管理が悪いと200~400mg/dlに達する患者もしばしば見受けられる。

【 0 0 3 7 】

培養血管内皮細胞に糖が5mg/dlの条件下で24時間培養すると細胞は障害されて細胞数は減少したが、1,5-AG添加(0~200 µg/ml)の添加で、この糖毒性は1,5-AG濃度依存性に軽減された(図 3)。

20

【 0 0 3 8 】

結果を図 3 に示したように、高血糖培養24時間刺激(無血清培地)で細胞数は25%減少したが、1,5-AG添加(0~200 µg/ml)で、濃度依存性に細胞数減少は防止され、1,5-AGの200 µg/ml添加では、ほぼ完全に糖毒性を阻止し得た。

【 0 0 3 9 】

5 . 1,5-AGによる血管内皮細胞保護作用(無血清下培養による内皮障害の抑制)

無血清培地で培養すると細胞は死滅して減少するが、1,5-AG添加は濃度依存性にそれを防御した(24時間培養;「血清0%,24時間培養」を100%として表示;mann:マンノースで、1,5-AGのコントロール)。

30

【 0 0 4 0 】

結果を図 4 に示す。無血清条件では内皮細胞は培養し得ず、次第に細胞は死滅減少するが、1,5-AGはその無血清条件での細胞死を濃度依存性に阻止し得て、200 µg/mlの1,5-AG添加では1,5-AG:0、無血清培養条件の細胞数を100%とする(図 4 左端)と、200 µg/mlの1,5-AG添加(図 4 右端)では約30%細胞数減少を阻止し得た。

【 0 0 4 1 】

6 . 酸化LDLの細胞傷害効果に対する1,5-AGの血管内皮細胞保護作用

酸化LDLは内皮細胞を障害して、生体内では動脈硬化の引き金-血栓症の原因になることが証明されている。

40

【 0 0 4 2 】

図 5 に示すように、培養血管内皮細胞に酸化LDL(フナコシ社)を添加すると濃度依存性(0-100 µg/ml)に内皮細胞数が減少し、酸化LDLの内皮細胞障害性が示されたが、1,5-AG(0,10,50 µg/ml)添加は濃度依存性に内皮細胞数の減少を阻止(酸化LDL 50 µg/ml添加24時間培養の細胞数を100として、1,5-AG:10 µg/mlで+11%、50 µg/mlで+32%の細胞数)し、1,5-AGの酸化LDLの内皮細胞障害緩和活性が示された。

【 0 0 4 3 】

7 . 1,5-AGによるNO産生とERKのリン酸化

図 6 に示すように、培養血管内皮細胞に1,5-AG(0, 50, 100 µg/ml)を添加し、6時間後

50

に細胞を回収して、ERK,AKtのリン酸化を免疫プロット法で解析したところ、p44/42 MAPKがリン酸化されているのが確認された(図中、写真における矢印箇所)。

【0044】

8. 1,5-AF摂取後の尿中1,5-AFとその代謝産物1,5-AGの濃度(図7)

図7に示すように、健康男性2名(A, B)が5gの1,5-AFを摂取し、その後0, 2, 4, 6, 8, 10時間後に尿を採取して、1,5-AG(実線、ELISA法)と1,5-AF(破線、HPLC法)を測定した。被験者Aは2時間後、Bは4時間後にそれぞれ尿中1,5-AGがピークに達している。1,5-AF値はA, Bとも2時間後にピークとなっている(破線)。この結果より、経口摂取した5gの1,5-AFはそれぞれ速やかに1,5-AGに代謝され、尿中に排泄されること、一方、1,5-AFの尿中への排泄は、1,5-AGに比して極わずかであることが示された。1,5-AFの排泄量が少ない理由は、
10
もともと腎からの1,5-AFの排泄が1,5-AGに比べると少ないからであると考えられる。一方、他からのデータで、1,5-AGは腎系球体で濾過されたあと、大部分は尿細管のSGLT(Sodium Glucose Co-Transporter, SGLT-2 or/and 4)から、再吸収されることが判明しているため、1,5-AGは腎を中心として体内各臓器に分布しているものと予想される。

【0045】

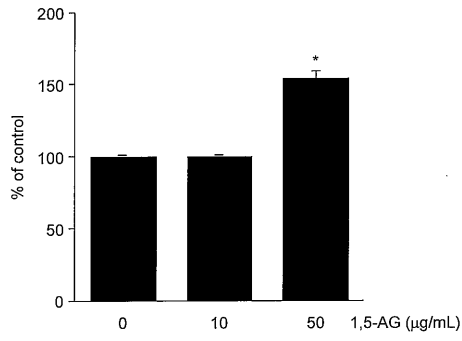
9. 考察

1,5-AGの活性(NOの産生とその機能)のまとめを図8に示す。

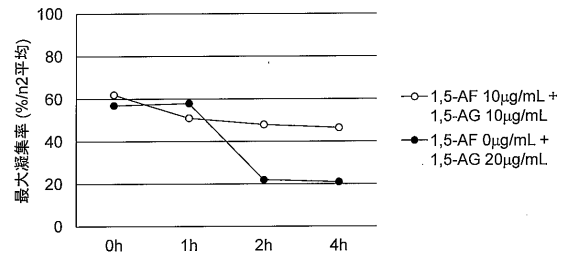
【0046】

図8に示すように、経口摂取された澱粉からは速やかに1,5-AFが体内(恐らく肝臓のリアーゼで)合成されるものと考えられる。一方、澱粉から体外で製造された1,5-AFも体内では速やかに1,5-AGに代謝されるものと考えられる(図7)。1,5-AFは小腸に働き、GLP-1(Glucagon-Like Peptide-1)を放出して、膵臓からのインスリン分泌、消化管運動促進、
20
脳の食欲中枢に働き食欲の制御、海馬に働き、記憶増強など、多彩な生理活性を発揮することが判明している。一方、体内では1,5-AGに代謝された1,5-AGはNO合成酵素を活性化して、NOを産生することが本発明者らの上記の一連の研究で示されたことになる。産生されたNOは各細胞内のcyclic GMPを介して、循環改善、血小板活性化抑制、内皮細胞保護-神経細胞活性化などの細胞生理活性を発揮するものと考えられる。これらのことから、1,5-AGの補助的摂取は、脳-心を含む循環器系の機能維持~改善に広く裨益することが期待される。

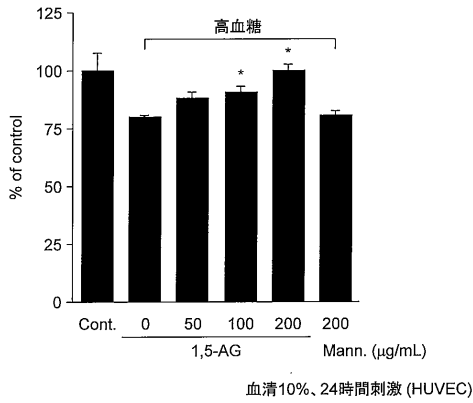
【 図 1 】



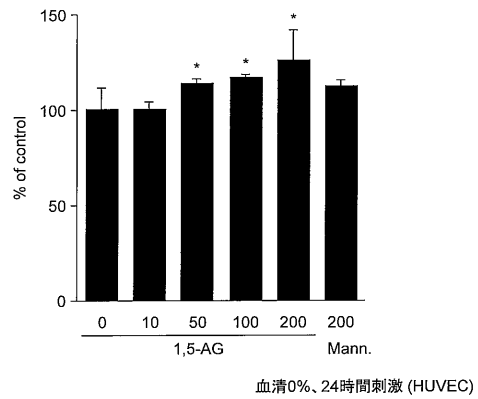
【 図 2 】



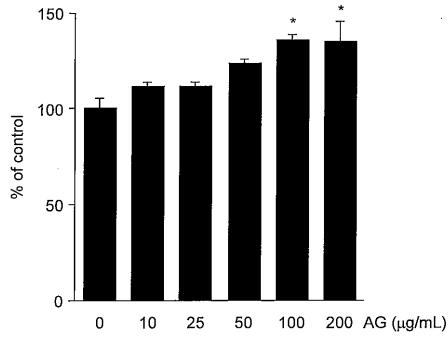
【 図 3 】



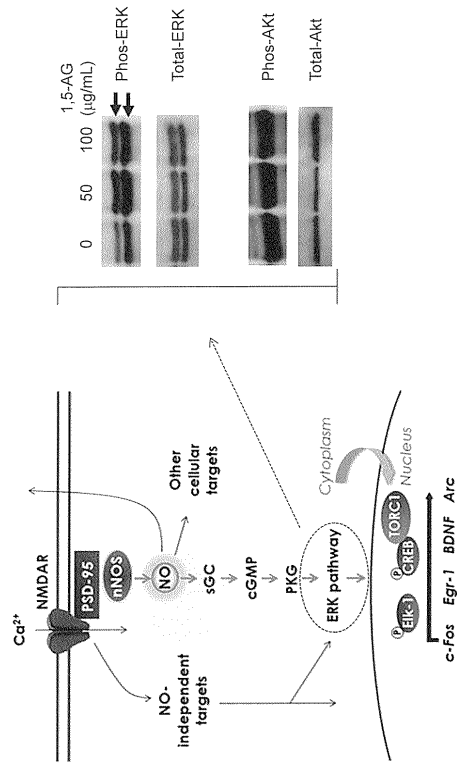
【 図 4 】



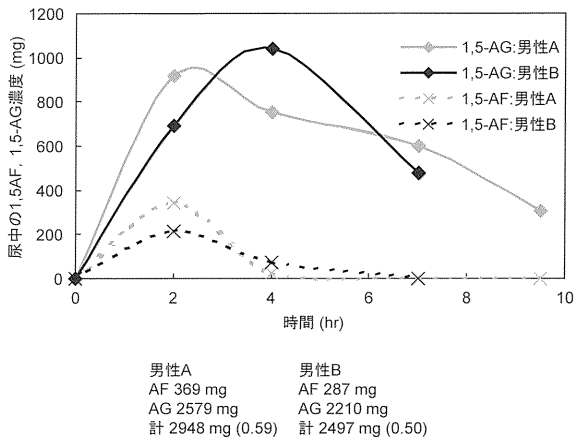
【 図 5 】



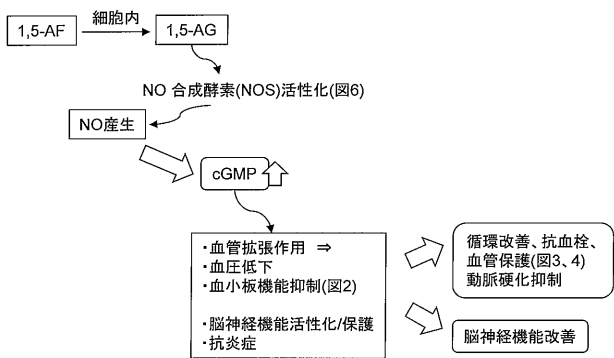
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 15/10 (2006.01)

F I

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 15/10

テーマコード(参考)