

明 細 書

発明の名称： T G R 5 活性化用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、T G R 5 活性化用組成物に関する。また、本発明は、T G R 5 を活性化する方法などに関する。

背景技術

[0002] T G R 5 (T r a n s m e m b r a n e G p r o t e i n - c o u p l e d R e c e p t o r 5) は、Gタンパク質共役胆汁酸受容体であり、骨格筋、褐色脂肪組織などの多くの組織に発現している。T G R 5 の生体内リガンドとして胆汁酸が知られている。血液中の胆汁酸は、T G R 5 との結合を介して細胞内シグナルを活性化し、抗肥満、血糖降下作用等を発揮する。特許文献1には、ダイズサポニン等がT G R 5 活性化作用を有することが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2016-27012号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 受容体のアゴニスト化合物は、標的とする受容体に対する選択性が高いことが望まれる。選択性が低いと、標的以外の受容体に結合しやすいため、所望の効果が十分に得にくい、副作用が生じるなどの問題が生じやすいためである。T G R 5 についても、T G R 5 活性化作用を有し、かつT G R 5 に対する選択性が高い物質が求められている。特許文献1では、T G R 5 活性化剤のT G R 5 への選択性は検討されていない。

[0005] 本発明は、T G R 5 活性化作用を有し、かつT G R 5 に対する選択性が高い物質を有効成分として含むT G R 5 活性化用組成物を提供することを目的とする。また、本発明は、T G R 5 に対する選択性が高い物質を用いてT G R

5を活性化する方法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] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意研究した結果、ソヤサポゲノール類が、TGR5活性化作用を有し、しかもTGR5に対する選択性が高いことを見出した。

[0007] すなわち、これに限定されるものではないが、本発明は以下のTGR5活性化用組成物などに関する。

〔1〕ソヤサポゲノール類の1種以上を有効成分として含むTGR5活性化用組成物。

〔2〕ソヤサポゲノール類の1種以上が、ソヤサポゲノールA及び／又はソヤサポゲノールBである上記〔1〕に記載のTGR5活性化用組成物。

〔3〕飲食品、化粧品又は医薬部外品である上記〔1〕又は〔2〕に記載のTGR5活性化用組成物。

〔4〕TGR5を活性化するための、ソヤサポゲノール類の1種以上の使用。

〔5〕ソヤサポゲノール類の1種以上を投与する、TGR5を活性化する方法。

発明の効果

[0008] 本発明により、TGR5活性化作用を有し、かつTGR5に対する選択性が高い物質を有効成分として含むTGR5活性化用組成物等が提供される。本発明のTGR5活性化用組成物は、ソヤサポゲノール類の1種以上を有効成分として含むことにより、TGR5活性化作用を有し、かつTGR5に対する選択性が高いものである。本発明で使用されるソヤサポゲノール類は、古くから飲食品として摂取されてきた成分であり、安全性が高く継続的に摂取できる点でも有利である。また、本発明によれば、TGR5に対する選択性が高い物質を用いてTGR5を活性化する方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明のTGR5活性化用組成物は、ソヤサポゲノール類の1種以上を有効

成分として含む。

本発明において、TGR5 (Transmembrane G protein-coupled Receptor 5) は、好ましくはヒトTGR5 (hTGR5) である。

ソヤサポゲノール類 (ソヤサポゲノール化合物ともいうことができる) は、TGR5 を活性化する作用 (アゴニスト作用) を有する。ソヤサポゲノール類は、TGR5 を活性化させ、細胞内cAMP濃度を上昇させる作用を有する。ソヤサポゲノール類は、TGR5 に対する選択性が高いという特徴を有する。

[0010] ソヤサポゲノール類は、ダイズ (学名: Glycine max) 等のマメ科植物等に含まれる化合物である。ソヤサポゲノール類は、トリテルペノイドの一種である。本発明においては、ソヤサポゲノールの1種以上として、化合物1種のみを用いてもよく、2種以上の化合物を用いてもよい。一態様において、本発明のTGR5 活性化用組成物は、ソヤサポゲノール類の1種以上のみを有効成分として含むものであってよい。

[0011] ソヤサポゲノール類として、ソヤサポゲノールA、ソヤサポゲノールB、ソヤサポゲノールC等が挙げられる。ソヤサポゲノール類の1種以上として、ソヤサポゲノールA及び／又はソヤサポゲノールBが好ましい。中でも、TGR5 に対する選択性が高い観点からは、ソヤサポゲノールBが好ましい。一態様において、ソヤサポゲノール類としてソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBを用いる場合、これらの比率は特に限定されない。ソヤサポゲノールA：ソヤサポゲノールB (重量比) は、例えば、1：99～99：1、10：90～90：10又は10：90～30：70であってよい。

[0012] ソヤサポゲノール類を得るための由来、製法については特に制限はない。ソヤサポゲノール類を多く含む植物又はその部位として、ダイズ (特にダイズ種子 (大豆))、アズキ (学名: Vigna angularis) (特にアズキ種子 (小豆))、葛根などが知られている。これらの植物から、公知の方法でソヤサポゲノール類を抽出及び精製して調製することができる。ソ

ヤサボゲノール類は、ソヤサポニン類を公知の方法で加水分解することによって得ることもできる。ソヤサボゲノール類は、市販品を使用することもできる。

[0013] 本発明においては、本発明の効果を奏することになる限り、ソヤサボゲノール類の1種以上を豊富に含む植物由来原料を本発明の組成物に含有させてもよい。ソヤサボゲノール類の1種以上を豊富に含む植物由来原料としては、例えば、ダイズ種子を生のまま又は凍結乾燥などによって乾燥させたもの、ダイズ種子を熱水又は有機溶剤により抽出した液（抽出液）を濃縮又は凍結乾燥したもの、又は、抽出液の乾燥物をカラム等で精製し、ソヤサボゲノール類を高純度化したもの等を使用することができる。このようなソヤサボゲノール類の1種以上を含む植物由来原料は、市販のものを使用してもよく、ダイズ等の植物から公知の方法で調製してもよい。

[0014] TGR5に活性化（アゴニスト）作用を有する物質が結合すると、細胞内のサイクリックAMP（cAMP）濃度が上昇する。このcAMP濃度の上昇を介して、標的遺伝子の転写が活性化されて種々の作用が発揮される。TGR5の活性化は、レポーターアッセイによる活性の評価や、TGR5シグナル下流の遺伝子発現の解析によって確認することができる。

一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物は、細胞内cAMP濃度を上昇させるために使用することができる。

[0015] TGR5を活性化すると、筋肉細胞の分化が促進されたことや、骨格筋特異的にTGR5を高発現させたマウスでは、筋肉量が増加したことが報告されている（Sasaki et al., J. Biol. Chem. (2018) 293(26), 10322-10332）。従ってTGR5の活性化は、筋肉量の増加をもたらす。筋肉量増加により、筋力の低下抑制、筋力の維持、筋力の回復、筋力の向上などの効果が得られる。

また、TGR5の活性化は、例えば骨格筋や褐色脂肪細胞においては、細胞内cAMP濃度の上昇を介してミトコンドリア活性を上昇させ、熱産生促進、エネルギー代謝改善、脂肪酸酸化の増加をもたらす。従って、TGR5の

活性化を介して、熱産生促進、肥満の予防又は改善などの効果が得られる。

また、筋肉量増加、ミトコンドリア活性の上昇により、運動機能向上、持久力向上、疲労抑制などの効果が期待できる。

[0016] 腸管内分泌細胞のL細胞におけるTGR5の活性化は、糖代謝を促進する。

従ってTGR5の活性化を介して、血糖降下効果が得られる。また、胆汁酸がTGR5の活性化を介して消化管運動の亢進とそれに基づく便秘の改善作用を発揮することが報告されている(Alemi et al., Gastroenterology, 2013 Jan; 144(1): 145-154.)。上記以外にも、TGR5活性化がアルコール性脂肪肝を抑制したこと(Iracheta-Velive A et al., Hepatol Commun, 2018 Oct 15; 2(11): 1379-1391)が報告されている。本発明のTGR5活性化用組成物は、TGR5を活性化することにより、上記のような作用を発揮することが期待できる。

[0017] ソヤサポゲノール類は、TGR5の活性化を介して、筋肉量の減少抑制、維持、回復又は増加、筋力の低下抑制、維持、回復又は向上、運動機能向上、持久力向上、疲労抑制、ロコモティブシンドロームやサルコペニアの予防又は改善、肥満の予防又は改善、血糖降下、熱産生促進、エネルギー代謝改善、消化管運動の亢進、アルコール性脂肪肝の予防又は改善、メタボリックシンドロームの予防又は改善等の効果を発揮することが期待される。

本発明のTGR5活性化用組成物は、TGR5を活性化することにより、例えば上記の効果をを得るために使用することができる。一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物は、例えば、筋肉量の減少抑制、維持、回復又は増加のため；筋力の低下抑制、維持、回復又は向上のため；運動機能向上又は持久力向上等のために使用することができる。一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物は、例えば、疲労抑制、ロコモティブシンドローム若しくはサルコペニアの予防又は改善、肥満の予防又は改善、血糖降下、熱産生促進、エネルギー代謝改善、消化管運動の亢進、アルコール性脂肪肝

の予防又は改善、メタボリックシンドロームの予防又は改善等のために使用することができる。

本発明において、予防は、発症を防止すること、発症を遅延させること、発症率を低下させること、発症のリスクを軽減すること等を包含する。状態又は疾患の改善は、対象を状態又は疾患から回復させること、状態又は疾患の症状を軽減すること、状態又は疾患の症状を好転させること、状態又は疾患の進行を遅延させること、防止すること等を包含する。

[0018] 本発明のTGR5活性化用組成物は、治療用途（医療用途）又は非治療用途（非医療用途）のいずれにも適用することができる。

本発明のTGR5活性化用組成物は、例えば、飲食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、飼料等の形態で提供することができるが、これらに限定されるものではない。本発明のTGR5活性化用組成物は、それ自体が飲食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、飼料等であってもよく、これらに使用される添加剤等の製剤、素材であってもよい。本発明のTGR5活性化用組成物は、一例として、剤の形態で提供することができるが、本形態に限定されるものではない。当該剤をそのまま組成物として、又は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。

一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物は、経口用組成物であってよく、非経口用組成物であってもよいが、好ましくは経口用組成物である。経口用組成物として、飲食品、経口用医薬品、経口用医薬部外品、飼料が挙げられ、好ましくは飲食品である。非経口用組成物として、非経口用医薬品、非経口用医薬部外品、化粧品が挙げられる。

[0019] 本発明のTGR5活性化用組成物は、本発明の効果を損なわない限り、上述したソヤサボゲノール類以外に、任意の添加剤、任意の成分を含有することができる。これらの添加剤及び成分は、組成物の形態等に応じて選択することができ、一般的に飲食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、飼料等に使用可能なものが使用できる。任意の添加剤又は成分は、1種用いてもよく、2種以上を組み合わせて用いてもよい。

任意の添加剤又は成分の一例として、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン等）等の各種アミノ酸及びその塩；アミノ酸の代謝産物（例えばβ-ヒドロキシーβ-メチル酪酸（HMB等））及びその塩（HMB Ca等）；乳由来タンパク質（カゼインタンパク質、ホエイタンパク質等）、ダイズ由来タンパク質、コメ由来タンパク質、魚肉由来タンパク質、コムギ由来タンパク質、エンドウ豆由来タンパク質、コラーゲン等のタンパク質；イミダゾールペプチド、乳ペプチド、ダイズペプチド、コラーゲンペプチド等のペプチド；コンドロイチン硫酸及びその塩、プロテオグリカン及びその塩等のムコ多糖又はこれらを含むサメ軟骨抽出物；ビタミンD、ビタミンB1、ビタミンB6、ビタミンB12、ビタミンE、ビタミンC等のビタミン類；カルシウム、マグネシウム等のミネラル類；ケルセチン及びその配糖体、プロシアニジン、天草由来ポリフェノール、クルミポリフェノール、ブドウ種子ポリフェノール、グルコサミン及びその塩、クレアチン、葉酸、クエン酸、γ-オリザノール等が挙げられる。

また、任意の添加剤又は成分の一例として、製剤化において配合される賦形剤、結合剤、乳化剤、緊張化剤（等張化剤）、緩衝剤、溶解補助剤、防腐剤、安定化剤、抗酸化剤、着色剤、凝固剤、コーティング剤、香料等が挙げられる。

[0020] 本発明のTGR5活性化用組成物を飲食品とする場合、ソヤサポゲノール類の1種以上に、飲食品に使用可能な成分（例えば、上記の任意成分等の飲食品素材、必要に応じて使用される添加剤等）を配合して、種々の飲食品とすることができる。飲食品は特に限定されず、例えば、一般的な飲食品、健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品、病者用飲食品、食品添加剤、健康補助食品、これらの原料等が挙げられる。飲食品の形態も特に限定されず、固形状、半流動状、流動状などを挙げることができる。飲食品は、錠剤、被覆錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、丸薬、カプセル剤、ドライシロップ剤、チュアブル剤等の経口用固形製剤；内服液剤、シロップ剤等の経口用液体製剤の各種製剤形態とすることもできる。

- [0021] 本発明のTGR5活性化用組成物を化粧料とする場合、ソヤサボゲノール類の1種以上に、化粧料に許容される担体、添加剤等を配合することができる。化粧料の製品形態は特に限定されない。
- [0022] 本発明のTGR5活性化用組成物を医薬品又は医薬部外品とする場合、ソヤサボゲノール類の1種以上に、薬理的に許容される賦形剤等を配合して、各種剤形の医薬品又は医薬部外品とすることができる。医薬品又は医薬部外品の投与形態は、経口投与でもよく、非経口投与でもよい。本発明の効果をより充分に得る観点から、投与形態は、経口投与が好ましい。剤形は、投与に適した剤形とすればよい。経口用医薬品又は経口用医薬部外品の剤形として、例えば、錠剤、被覆錠剤、細粒剤、顆粒剤、散剤、丸薬、カプセル剤、ドライシロップ剤、チュアブル剤等の経口用固形製剤；内服液剤、シロップ剤等の経口用液体製剤が挙げられる。非経口用医薬品又は非経口用医薬部外品の剤形として、注射剤、点滴剤、軟膏剤、ローション剤、貼付剤、坐剤、経鼻剤、経肺剤（吸入剤）等が挙げられる。医薬品は、非ヒト動物用医薬であってもよい。
- [0023] 本発明のTGR5活性化用組成物を飼料とする場合、ソヤサボゲノール類の1種以上に、飼料に使用可能な成分を配合して飼料とすることができる。飼料としては、例えば、ウシ、ブタ、ニワトリ、ヒツジ、ウマ等に用いる家畜用飼料；ウサギ、モルモット、ラット、マウス等に用いる小動物用飼料；イヌ、ネコ、小鳥等に用いるペットフードなどが挙げられる。
- [0024] 本発明のTGR5活性化用組成物を、飲食品、化粧料、医薬品、医薬部外品、飼料等とする場合、その製造方法は特に限定されず、ソヤサボゲノール類の1種以上を用いて、一般的な方法により製造することができる。
本発明のTGR5活性化用組成物の製造においては、ソヤサボゲノール類として、精製された化合物を使用してもよく、上述したソヤサボゲノール類の1種以上を豊富に含む植物由来原料を使用してもよい。ソヤサボゲノール類は、当該化合物を含む植物由来原料の形態で組成物に含有させてもよい。
- [0025] 本発明のTGR5活性化用組成物には、包装、容器又は説明書等に用途、有

効成分の種類、上述した効果、使用方法（例えば、摂取方法、投与方法）等の1又は2以上を表示してもよい。本発明のTGR5活性化用組成物には、TGR5活性化作用、又は、この作用に基づく作用を有する旨の表示が付されていてもよい。一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物には、例えば、「筋肉減少抑制」、「筋肉維持」、「筋肉増加」、「筋肉改善」、「筋力低下抑制」、「筋力維持」、「筋力増加」、「筋力改善」、「筋肉をつくる力をサポート」、「歩行機能の改善」、「歩行機能の維持」、「運動機能改善」、「運動機能維持」、「加齢によって衰える筋肉の維持」及び「加齢によって衰える筋力の維持」等の1又は2以上の表示が付されていてもよい。

[0026] 一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物には、例えば、「抗肥満」、「肥満の予防」、「肥満の改善」、「ウエスト周囲径の低減」、「ウエスト周囲径の維持」、「スリムな身体の維持」、「体脂肪の蓄積を抑える」、「体脂肪の低減」、「内臓脂肪の蓄積を抑える」、「内臓脂肪の低減」、「肝臓中の脂肪の蓄積を抑える」、「肝臓中の脂肪の低減」、「体重減少」、「減量」、「ダイエット」、「脂肪燃焼」、「脂肪消費」、「脂質代謝」、「ミトコンドリア機能」、「熱産生」、「基礎代謝」、「代謝機能」、「代謝力」、「メタボリックシンドロームの予防」、「メタボリックシンドロームの改善」等の1又は2以上の機能の表示が付されていてもよい。

また別の態様において、本発明のTGR5活性化用組成物には、例えば、「食後の血糖値の上昇を抑える」、「食後の血糖値の上昇をおだやかにする」、「血糖値を下げる」、「血糖値が気になる方へ」、「食後の血糖値が気になる方へ」、「血糖値が上がりやすい体質を改善する」等の1又は2以上の表示が付されていてもよい。

[0027] 本発明のTGR5活性化用組成物中のソヤサポゲノール類の含有量は、該組成物の形態等に応じて適宜設定することができる。例えば、ソヤサポゲノール類の総含有量は、組成物中に0.0001～95重量%、0.001～90重量%又は0.01～90重量%であってよい。一態様において、本発明

のTGR5活性化用組成物を、飲食品、医薬品、医薬部外品等の経口用組成物とする場合、ソヤサポゲノール類の総含有量は、組成物中に0.01重量%以上が好ましく、0.2重量%以上がより好ましく、また、20重量%以下が好ましく、10重量%以下がより好ましい。一態様において、ソヤサポゲノール類の総含有量は、本発明のTGR5活性化用組成物中に0.01～20重量%が好ましく、0.2～10重量%がより好ましい。上記総含有量は、ソヤサポゲノール類の化合物が2種以上含まれる場合、それらの合計量である。ソヤサポゲノール類の含有量は、公知の方法に従って測定することができ、例えば、HPLC法等を用いることができる。

[0028] 本発明のTGR5活性化用組成物は、その形態に応じた適当な方法で摂取又は投与することができる。本発明のTGR5活性化用組成物は、好ましくは、経口投与又は経口摂取される。

本発明のTGR5活性化用組成物の摂取量（投与量ということもできる）は特に限定されず、TGR5活性化効果が得られるような量（有効量）であればよく、投与形態、投与方法、体重等に応じて適宜設定すればよい。例えば、ヒト（成人）を対象に経口で投与する又は摂取させる場合、ソヤサポゲノール類の総摂取量として、1日あたり、5mg以上が好ましく、10mg以上がより好ましく、20mg以上がさらに好ましく、また、500mg以下が好ましく、200mg以下がより好ましく、100mg以下がさらに好ましい。一態様として、ヒト（成人）を対象に経口で投与する又は摂取させる場合、ソヤサポゲノール類の総摂取量として、1日あたり、5～500mgが好ましく、10～200mgがより好ましく、20～100mgがさらに好ましい。上記量を、例えば1日1回で又は2～3回に分けて経口投与又は摂取させることが好ましい。ヒト（成人）を対象にTGR5活性化効果を得ることを目的として本発明のTGR5活性化用組成物を摂取させる場合は、1日あたり体重60kgあたり、ソヤサポゲノール類の総摂取量が上記範囲となるように、本発明の組成物を対象に経口で摂取させる又は投与することが好ましい。

- [0029] 一態様において、本発明のTGR5活性化用組成物は、その形態、投与方法等を考慮して、本発明の所望の効果が得られるような量、すなわち有効量の上記ソヤサポゲノール類を含有することが好ましい。一態様として例えば、本発明のTGR5活性化用組成物が飲食品、経口用医薬品等の経口用組成物である場合、該組成物の成人1人1日あたり体重60kgあたりの摂取量中に、ソヤサポゲノール類の総含有量が、5～500mgが好ましく、10～200mgがより好ましく、20～100mgがさらに好ましい。
- [0030] 本発明のTGR5活性化用組成物を投与又は摂取させる対象（以下、単に投与対象ともいう）は、哺乳動物（ヒト又は非ヒト哺乳動物）が好ましく、ヒトがより好ましい。本発明における投与対象として、TGR5活性化を必要とする又は希望する対象が好ましい。また一態様において、本発明における投与対象として、筋肉量の増加、減少抑制、維持又は回復を必要とする又は希望する対象；筋力の増加、低下抑制、維持又は向上を必要とする又は希望する対象；運動機能向上又は持久力向上を必要とする又は希望する対象等も挙げられる。
- [0031] 本発明は、以下のTGR5を活性化する方法、TGR5を活性化するための使用も包含する。
- ソヤサポゲノール類の1種以上を投与する、TGR5を活性化する方法。
- TGR5を活性化するための、ソヤサポゲノール類の1種以上の使用。
- 上記の方法は、治療的な方法であってもよく、非治療的な方法であってもよい。上記の使用は、治療的使用であってもよく、非治療的使用であってもよい。
- ソヤサポゲノール類の1種以上を対象に投与すると、対象においてTGR5を活性化することができる。ソヤサポゲノール類は、対象においてTGR5を活性化するために使用することができる。
- 上記方法及び使用においては、所望の作用が得られる量（有効量ということもできる）のソヤサポゲノール類を使用すればよい。ソヤサポゲノール類、対象、投与方法、投与量、それらの好ましい態様等は、上述したTGR5活

性化用組成物と同じである。ソヤサポゲノール類は、そのまま投与してもよく、これを含む組成物として投与してもよい。例えば、上述した本発明の T G R 5 活性化用組成物を投与してもよい。

[0032] 本発明は、T G R 5 活性化用組成物を製造するための、ソヤサポゲノール類の 1 種以上の使用、も包含する。T G R 5 活性化用組成物及びその好ましい態様は、上記と同じである。

本明細書中に記載された学術文献及び特許文献の全ては、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0033] 以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、これにより本発明の範囲を限定するものではない。

[0034] <実施例 1>

被験物質の T G R 5 活性化作用は、ルシフェラーゼアッセイにより評価した。

この評価系は、ヒト T G R 5 (h T G R 5) の活性化を、T G R 5 下流のシグナルである c A M P r e s p o n s e e l e m e n t b i n d i n g p r o t e i n (C R E B) の転写活性化にて判定するものである。細胞内 c A M P 濃度の増加に伴い C R E B の C R E (c A M P - r e s p o n s i v e e l e m e n t) への結合が活性化され、ルシフェラーゼ遺伝子の転写が誘導されるため、C R E B の活性化をルシフェラーゼ活性の定量により評価することができる。

[0035] また、被験物質の T G R 5 への選択性を評価するため、h T G R 5 を強制発現させた細胞 (h T G R 5 強制発現細胞ともいう) に加えて、h T G R 5 と同様に G タンパク質共役型受容体であるグルカゴン様ペプチド-1 (G L P - 1) 受容体 (G L P 1 R) を h T G R 5 の代わりに強制発現させた細胞 (h G L P 1 R 強制発現細胞ともいう) についてルシフェラーゼアッセイを行った。h G L P 1 R 強制発現細胞は、h T G R 5 を発現していない。

G L P 1 R 及び T G R 5 はいずれも G タンパク質共役型受容体であり、G L

P 1 R が活性化されると細胞内 c A M P が上昇する。被験物質添加により h T G R 5 強制発現細胞においてルシフェラーゼ活性が上昇すれば、該物質は T G R 5 活性化作用を有すると判断される。また、被験物質を h T G R 5 強制発現細胞及び h G L P 1 R 強制発現細胞に添加し、h T G R 5 強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性の上昇が、h G L P 1 R 強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性の上昇に対して大きいほど、被験物質は T G R 5 への選択性が高いといえる。

[0036] (発現ベクターの作製)

h T G R 発現ベクター (p T G R 5) は以下の手順にて作製した。

ヒト由来 T G R 5 遺伝子の塩基配列として、NM__001077191を参照し、ヒト T G R 5 をコードする人工遺伝子を設計し、DNAを合成した。真核生物用発現ベクター p c D N A 3. 1 (+) (Invitrogen (登録商標)、Thermo Fisher Scientific社)に、該ベクターのクローニングサイト B a m H I、E c o R I を用いて、合成した DNA を挿入して h T G R 発現ベクター (プラスミド) を作製した。形質転換の宿主には E. c o l i K 1 2 (d a m + d c m + t o n A) を用い、プラスミドを調製した。構築した h T G R 発現ベクターを p T G R 5 と名付けた。

[0037] C R E 反応性ルシフェラーゼ発現ベクター (p C R E / L u c) には、プロメガ社製の p G L 4. 2 9 [l u c 2 P / C R E / H y g r o] を使用した。このプラスミドは、c A M P r e s p o n s e e l e m e n t (C R E) と連結したルシフェラーゼ遺伝子を保持するベクターである。

[0038] p T G R 5 及び p C R E / L u c の 2 つのプラスミドを大腸菌 J M 1 0 9 に導入し、形質転換した大腸菌を培養し、実験に十分な量のプラスミドを精製した。精製したプラスミドを形質転換に用いたプラスミドと共に、複数の制限酵素で処理し、電気泳動することによりその酵素処理断片を比較し、同一のパターンを確認することで、精製したプラスミドが元のベクターと同一構造を維持していることを確認した (結果は示さず)。以下の実験では、上記

で精製したプラスミドを使用した。

[0039] (hTGR強制発現細胞の作製)

以下の試験において、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) には、DMEM (High-glucose) (富士フイルム和光純薬株式会社) を使用した。PBS (Phosphate Buffered Salts) は、タカラバイオ株式会社製のものを使用した。

HEK293細胞 (ヒト胎児腎細胞株、ATCC:CRL-2828) をDMEM-10%FBS (DMEMにウシ胎仔血清 (FBS) (フナコシ株式会社) を10%添加) の培地で、T75フラスコを用いて継代培養した。培地を除去し、PBS (-) 溶液10mLで細胞を洗浄した。細胞に1mLのトリプシン液 (0.25%トリプシン-EDTA (ナカライテスク株式会社) をPBS溶液で10倍希釈したもの) を添加し、30秒ほど置き、細胞をはがしてから10mLの培地を加えて細胞を回収した。回収した細胞を50mL遠沈管に移して、室温1000rpmで3分間遠心した。得られたペレットを2mLの培地でほぐし、その一部を0.2%トリパンプルで10倍希釈し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。新しいT75フラスコに、細胞数が 6×10^6 個/25mLになるように培地及び細胞懸濁液を分注し、インキュベーター内 (37℃、5%CO₂) で22時間前後培養し、本細胞をプラスミド導入に用いた。

[0040] HEK293細胞へのプラスミド導入は、以下の手順で行った。

1. 5mLチューブにX-tremeGENE (登録商標) (Roche社) を45μL取り、室温のOptiMEM (登録商標) I Reduced Serum Medium (Thermo Fisher Scientific社) 705μLを添加、速やかに2回転倒混和後、液をスピンドウンしてX-tremeGENE希釈液を得た。室温で5分間静置後、プラスミド (hTGR5発現ベクター (pTGR) (5μg) 及びCRE反応性ルシフェラーゼ発現ベクター (pCRE/Luc) (5μg)) を上記X-

tremeGENE希釈液（750 μ L）に添加、すみやかに2回転倒混合後、スピンドウンし、室温で25分間静置した。この25分の間に、上記でHEK293細胞を播種したF75フラスコの培地を、15 mLのDMEM + 5% FBS（抗生剤無し）に置換した。室温で25分間静置した後、上記のプラスミドを添加したX-tremeGENE希釈液765 μ Lを、フラスコ中のHEK293細胞に静かに添加（滴下）し、静かに混合し、37℃、5%CO₂条件下で5時間培養した。培地を除去し、PBS（-）溶液10 mLで細胞を洗浄した。細胞に、1 mLのトリプシン液（0.25%トリプシン-EDTAをPBS溶液で10倍希釈したもの）を添加し、30秒ほど置き、細胞をはがしてから10 mLの培地を加えて細胞を回収した。回収した細胞を50 mL遠沈管に移して、室温1000 rpmで3分間遠心した。得られたペレットを2 mLの培地でほぐし、その一部を0.2%トリパンブルーで10倍希釈し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。シード培地（DMEM（FBS不含、ペニシリン／ストレプトマイシン（富士フイルム和光純薬株式会社）を含む））に細胞を懸濁し、75 μ L／ウェルで96ウェル白色クリアプレート（Corning社、Corning 96ウェル 白 透明ボトム 平底 細胞培養表面処理 ポリスチレン マイクロプレート）に播種し、インキュベーター内（37℃、5%CO₂）で培養し、hTGR強制発現細胞とした。

[0041]（hGLP1強制発現細胞の作製）

ヒトGLP1受容体（hGLP1R）遺伝子を発現するベクターをHEK293細胞に導入し、hGLP1Rを強制発現させた細胞を作製した。

hGLP1R発現ベクターには、GLP1R（NM_002062） Human Untagged Clone（ORIGENE社）を使用した。この発現ベクターは、ベクターpCMV6-XL5にhGLP1Rの遺伝子が挿入されており、hGLP1Rを発現する構造を有する。

hTGR5発現ベクター（pSTW01）の代わりに上記のhGLP1R発現ベクターを使用した以外は、上記と同じ方法でHEK293細胞にhGL

P 1 R 発現ベクターを導入し、h G L P 1 R 強制発現細胞を得た。

[0042] (被験物質)

被験物質には、ソヤサポゲノールA、ソヤサポゲノールBを使用した。また、比較のために、ダイズサポニン（株式会社Jーオイルミルズ製のサポニンBー50）を使用した。

ソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBは、次の方法で調製した。サポニンBー50（株式会社Jーオイルミルズ製）を20倍量、2規定の塩酸水溶液にて100℃で2時間反応させ、サポニンの糖鎖を切断した。反応終了後、反応液を室温まで冷却し、水酸化ナトリウム水溶液にて中和した。その反応液を吸引濾過し、残渣について大量の蒸留水で洗浄、吸引濾過を繰り返し、水酸化ナトリウムの残存がないことを確認し、乾燥し、ソヤサポゲノール粗画分（純度50%：ソヤサポゲノールA及びBの合計）を得た。このソヤサポゲノール粗画分を、シリカゲル、ヘキサンと酢酸エチルの混液を用いたカラムクロマトグラフィーによりさらに精製して、ソヤサポゲノールA（純度99%以上）及びソヤサポゲノールB（純度99%以上）をそれぞれ得た。得られたソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBを使用した。

[0043] (ルシフェラーゼ活性の測定)

h T G R 強制発現細胞を播種して24時間培養後に、被験物質を添加し（終濃度：20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）、更に5時間培養した。被験物質（ソヤサポゲノールA、ソヤサポゲノールB又はダイズサポニン）はジメチルスルホキシド（DMSO）に溶解させて添加した。また、被験物質の代わりに、DMSOを添加して（終濃度を0.1%）陰性対照とした。培養後にDual-Glo（登録商標）Luciferase Assay System（Promega社）に付属するDual-Glo Luciferase Assay Reagentを75 $\mu\text{L}/\text{well}$ で添加し、室温で10分保温した後、マルチモードマイクロプレートリーダー FlexStation 3（MOLECULAR DEVICES社）を用いて発光強度を測定した。発光強度をルシフェラーゼ活性とした。この評価系では、ウミシイタケル

シフェラーゼを内部標準として用いている。

[0044] h T G R 5 に対する選択性を評価するために、h T G R 5 強制発現細胞の代わりに、h G L P 1 R 強制発現細胞を用いて、上記と同様にルシフェラーゼの発光測定を行った。

[0045] 被験物質の代わりに、陽性対照として L i t h o c h o l i c a c i d (東京化成工業株式会社) を D M S O に溶解させて h T G R 5 強制発現細胞及び h G L P 1 R 強制発現細胞に添加し (終濃度 3 . 3 μ M) 、上記の方法で発光強度を測定した。別の陽性対照として、T a u r o l i t h o c h o l i c A c i d S o d i u m S a l t (富士フイルム和光純薬株式会社) を D M S O に溶解させて、h T G R 5 強制発現細胞及び h G L P 1 R 強制発現細胞に添加し (終濃度 3 . 3 μ M) 、上記の方法で発光強度を測定した。h T G R 5 強制発現細胞及び h G L P 1 R 強制発現細胞において、どちらの陽性対照を添加した場合も陰性対照 (D M S O) と比較して発光強度が強いことを確認した。

[0046] (結果)

(T G R 5 活性化作用)

ソヤサポゲノール A 、ソヤサポゲノール B 又はダイズサポニンを添加した h T G R 5 強制発現細胞は、いずれも陰性対照より有意に発光強度が強く、ソヤサポゲノール A 、ソヤサポゲノール B 及びダイズサポニンが h T G R 5 活性化作用を有することが示された。

[0047] (h T G R 5 への選択性)

h T G R 5 強制発現細胞に D M S O を添加した陰性対照の発光強度を 1 とした場合の、被験物質を添加した h T G R 5 強制発現細胞の発光強度の比 (被験物質を添加した細胞の発光強度 / 陰性対照の発光強度) を、被験物質を添加した h T G R 5 強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性 (L u c - h T G R 5) とした。

h G L P 1 R 強制発現細胞に D M S O を添加した陰性対照の発光強度を 1 とした場合の、被験物質を添加した h G L P 1 R 強制発現細胞の発光強度の比

(被験物質を添加した細胞の発光強度／陰性対照の発光強度)を、被験物質を添加したhGLP1R強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性(Luc-hGLP1R)とした。

被験物質のTGR5への選択性の評価は、被験物質を添加したhGLP1R強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性(Luc-hGLP1R)に対する、hTGR5強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性(Luc-hTGR5)の比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)で評価した。

[0048] 被験物質を添加したhGLP1R強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性(Luc-hGLP1R)に対する、hTGR5強制発現細胞におけるルシフェラーゼ活性(Luc-hhTGR5)の比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)を、表1に示す。このルシフェラーゼ活性の比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)が大きいほど、hTGR5に対する選択性が高いことを意味する。

[0049] [表1]

	ルシフェラーゼ活性の比 (Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)
ソヤサポゲノールA	1.60
ソヤサポゲノールB	2.88
ダイズサポニン	0.13

[0050] 以上より、ソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBは、TGR5活性化作用を有することが示された。また、ソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBでは、上記のルシフェラーゼ活性の比(Luc-hTGR5/Luc-hGLP1R)がダイズサポニンよりも顕著に高かった。従ってソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBは、ダイズサポニンと比較してhTGR5に対する選択性が高いことが示された。

[0051] 本発明のTGR5活性化用組成物を調製する際の処方例の一例を示すが、本発明はこれらに限定されるわけではない。処方例において、ソヤサポゲノールには、例えば、ソヤサポゲノールA及びソヤサポゲノールBの混合物、ソヤサポゲノールA又はソヤサポゲノールB等を使用することができる。ソヤ

サポゲノール A 及びソヤサポゲノール B の混合物として、例えば、ソヤサポゲノール A : ソヤサポゲノール B の重量比が 1 : 99 ~ 99 : 1 の混合物を使用することができる。下記の処方例は一例であり、例えば下記のタンパク質に代えて、他のタンパク質を使用することも可能である。下記のペプチド、アミノ酸等についても同様に、他のペプチド、アミノ酸等を使用することが可能である。

[0052] <処方例 1>錠剤

ソヤサポゲノール 67 g

グルコサミン 500 g

サメ軟骨抽出物 167 g

シヨ糖脂肪酸エステル 90 g

酸化ケイ素 90 g

でんぷん 87 g

これらを混合し、単発式打錠機にて打錠して径 9 mm、重量 300 mg の錠剤を製造する。

[0053] <処方例 2>錠剤

ソヤサポゲノール 67 g

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 333 g

β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸 (HMB) カルシウム 133 g

シヨ糖脂肪酸エステル 90 g

酸化ケイ素 90 g

でんぷん 253 g

ビタミン D 0.03 g

プロテオグリカン 33 g

これらを混合し、単発式打錠機にて打錠して径 9 mm、重量 300 mg の錠剤を製造する。

[0054] <処方例 3>顆粒剤

ソヤサポゲノール 5 g

大豆タンパク質 350 g

乳タンパク質 350 g

大豆ペプチド 50 g

乳ペプチド 50 g

ケルセチン配糖体 5 g

ブドウ種子ポリフェノール 5 g

デキストリン 154 g

増粘剤 30 g

スクラロース 0.5 g

香料 0.5 g

以上の粉体を均一に混合した後に10%のヒドロキシプロピルセルロース・エタノール溶液800 mLを加え、常法通り練和し、押し出し、乾燥して顆粒剤を得る。

[0055] <処方例4>ドリンク剤

D-酒石酸ナトリウム 0.10 g

コハク酸 0.01 g

液糖 800.00 g

クエン酸 12.00 g

ビタミンC 10.00 g

ソヤサポゲノール 0.50 g

コラーゲン 40.00 g

シクロデキストリン 5.00 g

乳化剤 5.00 g

香料 15.00 g

塩化カリウム 1.00 g

硫酸マグネシウム 0.50 g

以上の成分を配合し、水を加えて一リットルとする。このドリンク剤は1回あたり100 mL以上を飲用する。