明　細　書

発明の名称 ： ケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、ケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤に関する。

背景技術

[0002] 日本は超高齢社会を迎え、中高年者の社会参加や余暇の過ごし方などについて多くの提案がなされている。一方で、人口の高齢化に伴い顕在化する運動器障害の問題は、その対象数が極めて多く、また重症例や複数の疾患が合併する例がある等、これまでの考え方の単なる延長では対応が難しい新しい課題である。特に、筋萎縮による運動器機能の低下は、転倒リスク上昇、骨折、長期臥床、さらなる筋萎縮と運動器機能低下という悪循環を招き、運動器不安定症やロコモティブシンドローム等の主要な原因の一つとなっている。さらに、筋萎縮性の運動器機能障害は、代謝障害や感染症の合併頻度を高めるなど、生活の質（クオリティーオブライフ（ＱＯＬ））のみならず原疾患の予後をも悪化させることから、超高齢化社会を迎えるに際して、解決すべき喫緊の課題である。現在、上記運動器機能の低下予防の手段として、リハビリなどの運動療法に加えて、栄養学的アプローチが研究されており、筋肉量を増強し得る成分が見出されつつある（特許文献１および２参照）。

[0003] 筋萎縮は、様々な要因によって起こることが知られており、特に、グルココルチコイドのレベルの上昇が筋萎縮に関係していると考えられている。合成グルココルチコイドの一種であるデキサメタゾンは、筋組織内において、筋肉分解に関与するＡｔｒｏｇｉｎ－１およびＭｕＲＦ－１の発現を上昇させることから、グルココルチコイド処理した培養筋管細胞は筋萎縮モデルとして汎用されている。筋組織においてデキサメタゾンは、グルココルチコイド受容体に結合後、グルココルチコイド受容体結合領域を有する遺伝子の発現を亢進し、さらに当該遺伝子発現は筋タンパクの分解亢進や筋前駆細胞であるサテライト細胞の分化抑制に関与することが知られている（非特許文献

１参照）。このデキサメタゾンに起因する代謝的な変化は、動物やヒトの筋萎縮において見られる変化と類似しており、デキサメタゾン誘発性筋萎縮モデルは筋萎縮のメカニズム解析に汎用されている。

[0004] ここでミオスタチン（以下、Ｍｓｔｎと省略する）は、形質転換成長因子－β（ＴＧＦ－β）ファミリーに属し、筋肉の成長を負に制御する役割を担っていることが知られている（非特許文献２参照）。このＭｓｔｎは、サテライト細胞の分化を抑制すること、Ａｋｔ経路およびＦｏｘｏ１の抑制を介して筋肉分解を亢進すること、さらにｍＴＯＲ経路を介して筋肉合成を抑制することが報告されている（非特許文献３参照）。また、Ｍｓｔｎ欠損マウスでは、デキサメタゾン誘発性の筋萎縮が惹起されないことも知られている（非特許文献４参照）。Ｍｓｔｎは筋量増加以外にも、脂肪組織の肥大化や心機能の悪化にも関与しており、Ｍｓｔｎ欠損マウスでは、野生型マウスと比較して脂肪組織が小さく、またストレス負荷による心機能への負担が軽減されることが報告されている（非特許文献５参照）。現在までに、Ｍｓｔｎを阻害する組成物として、紅茶抽出物が報告されている（特許文献３参照）。

[0005] 植物に豊富に含まれるポリフェノールの一つであるケルセチンは、そのままで、または配糖体（ルチン、クエルシトリン等）の形で、柑橘類、タマネギ、ソバ、エンジュ等の種々の植物に含まれている。ケルセチンやその配糖体は、血小板の凝集抑制および接着抑制作用、血管拡張作用、抗ガン作用等、多彩な生理機能をもつことが知られている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２００９－６２３４６

特許文献2：ＷＯ２０１１／１０８４８７Ａ１

特許文献3：特開２０１３－９１６０８

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Yanjun,et al,PLos One,2013,8(13),e58554

非特許文献2：David,et al,Med Sci Sports Exerc,2011,43(10),1828-1835

非特許文献3：Elkina,et al,J Cachexia Sarcopenia Muscle,2011,2,143-151

非特許文献4：H.Gilson,et al,Endocrinology,2007,148(1),452-460

非特許文献5：Mellisa,et al,Journal of Endocrinology,2012,213,263-275

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 筋萎縮抑制剤の開発には、筋肉分解促進および筋肉合成抑制に関与するＭｓｔｎに対する阻害成分を見出すことが必要である。しかしながら、現在のところ、紅茶抽出物にＭｓｔｎ阻害作用が報告されているのみで（特許文献３参照）、天然物由来の単一成分にＭｓｔｎ阻害作用が見出された例はない。本発明では、安全に長期間摂取可能な成分を含有する新たな筋萎縮抑制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

[0009] 本発明者らは、上記目的を達成するために、合成グルココルチコイドであるデキサメタゾン誘発性の筋萎縮モデルを用いて鋭意検討を行い、植物等に含まれるポリフェノールの一種であるケルセチン配糖体が筋萎縮抑制効果を有することを見出した。遺伝子発現評価の結果、ケルセチン配糖体は筋肉分解促進および筋肉合成抑制に関与するＭｓｔｎの発現を抑制することを見出した。さらに、ケルセチン配糖体が、Ｍｓｔｎの発現抑制を起点に、筋肉分解経路および筋肉合成経路等の各因子に作用することで、筋萎縮を抑制し得ることも見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] 即ち、本発明は、以下のものに関する。

１）．ケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤。

２）．筋萎縮抑制が、Ｍｔｓｎの発現抑制に起因するものである、１）に記載の剤。

３）．筋萎縮抑制が、Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１、Ｆｏｘｏ１およびＲｅｄｄ１からなる群から選択される一以上の遺伝子の発現抑制に起因するものである、１）または２）のいずれかに記載の剤。

４）．筋肉分解抑制作用を有する、１）～３）のいずれかに記載の剤。

５）．筋肉分解抑制作用が、Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１およびＦｏｘｏ１からなる群から選択される一以上の遺伝子の発現抑制に起因するものである、４）に記載の剤。

６）．筋肉合成促進作用を有する、１）～３）のいずれかに記載の剤。

７）．筋肉合成促進作用が、Ｒｅｄｄ１の発現抑制に起因するものである、６）に記載の剤。

８）．運動器機能低下または運動器障害の予防または処置のために使用される、１）～７）のいずれかに記載の剤。

９）．薬剤誘発性筋萎縮の予防または処置のために使用される、１）～７）のいずれかに記載の剤。

１０）．１）～９）のいずれかに記載の剤を含む組成物 。

発明の効果

[0011] 本発明により、ケルセチン配糖体を、筋萎縮抑制を目的とした剤に利用することが可能になる。本発明による筋萎縮抑制の達成は、有病者や高齢者のＱＯＬ改善に資する新たな手段を提供することにつながる。

[0012] また、ケルセチン配糖体はポリフェノール化合物の一種であり、血流改善作用や抗ガン作用等の様々な生理活性を有している。その上、植物由来であるため極めて安全性が高い。したがって、本発明は、ケルセチン配糖体の筋萎縮抑制作用以外の有用な生理作用も期待でき、かつ安全で継続摂取可能な剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図１は、ケルセチン配糖体（ＱＧ）によるデキサメタゾン（ＤＥＸ）誘発性筋萎縮の抑制効果を示す。

[図2]図２は、ケルセチン配糖体（ＱＧ）によるＭｓｔｎおよびその下流遺伝子発現の抑制効果を示す。

[図3]図３は、ケルセチン配糖体（ＱＧ）とケルセチン（Ｑ）のデキサメタゾン（ＤＥＸ）誘発性筋萎縮抑制効果の比較を示す。

[図4]図４は、ケルセチン配糖体（ＱＧ）とケルセチン（Ｑ）のＭｓｔｎの下流遺伝子発現の抑制効果の比較を示す。

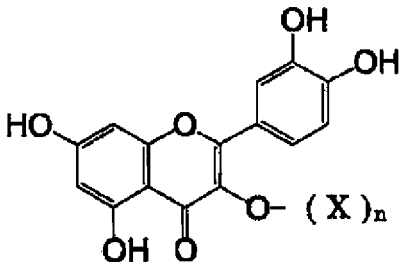
発明を実施するための形態

[0014] 本発明は、ケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤に関する。

本発明のケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤は、ケルセチン配糖体を有効成分とするものである。

[0015] 本発明において、「ケルセチン配糖体」は、ポリフェノールの一種であるケルセチンの配糖体を意味し、これは下式で表される。

[0016] [化1]



（式中、（Ｘ）ｎは、糖鎖を表し、ｎは、１以上の整数である。）

[0017] ここで、ケルセチンにグリコシド結合するＸで表される糖鎖を構成する糖は、例えば、グルコース、ラムノース、ガラクトース、グルクロン酸等であり、好ましくはグルコース、ラムノースである。また、ｎは１以上であれば、特に制限されないが、好ましくは１～１６、さらに好ましくは１～８である。ｎが２以上であるとき、Ｘ部分は１種類の糖鎖からなっていてもよく、複数の糖鎖からなっていてもよい。

[0018] 本発明のケルセチン配糖体は、既存のケルセチン配糖体を、酵素などで処理して糖転移させたものも含む。本発明でいうケルセチン配糖体は、具体的には、ルチン、酵素処理ルチン、クエルシトリン、イソクエルシトリンを含む。

[0019] 本発明においては、ケルセチン配糖体に包含される一の化合物を、単独で用いてもよいし、複数の化合物を混合して用いてもよい。本発明で使用する

ケルセチン配糖体は、その由来、製法については特に制限はない。例えば、ケルセチンまたはケルセチン配糖体を多く含む植物として、ソバ、　エンジュ、ケッパー、リンゴ、茶、タマネギ、ブドウ、ブロッコリー、モロヘイヤ、ラズベリー、コケモモ、クランベリー、オプンティア、葉菜類、柑橘類等が知られており、これらの植物からケルセチン配糖体を得ることができる。本発明に用いられるケルセチン配糖体は、天然物由来の抽出物を、濃縮、精製等の操作によってケルセチン配糖体を高めたもの、例えば、ケルセチン配糖体含有抽出物の、濃縮物または精製物を用いることができる。濃縮方法または精製方法は、既存のものを用いることができる。

[0020]　本発明の特に好ましい態様においては、ケルセチン配糖体として、ルチンの酵素処理物を使用する。酵素処理ルチンの特に好ましい例は、ケルセチン配糖体を酵素処理してラムノース糖鎖部分を除去したイソクエルシトリン、イソクエルシトリンを糖転移酵素で処理してグルコース１～７個からなる糖鎖が結合したもの、およびその混合物を主成分とするものである。

[0021]　ケルセチン配糖体は、ケルセチンに糖鎖がグリコシド結合した化合物、具体的には３位のヒドロキシ基に１以上の糖鎖がグリコシド結合した一連の化合物の総称である。ケルセチンとケルセチン配糖体では、化学構造的にも化学特性的にも大きく異なる。

[0022]　本明細書において、「グルココルチコイド」とは、筋肉分解における重要な因子であり、骨格筋においてユビキチン－プロテアソーム経路依存性のタンパク分解を誘発する副腎皮質ホルモンの一つをいう。合成グルココルチコイドの一種であるデキサメタゾンは、骨格筋において筋肉分解に関与するＡｔｒｏｇｉｎ－１およびＭｕＲＦ１の発現を上昇させることが明らかになっている（非特許文献１参照）。デキサメタゾンによってもたらされる代謝的な変化は、動物や患者の筋萎縮において見られる変化と類似しており、デキサメタゾン誘発性筋萎縮モデルは筋萎縮のメカニズム解析に汎用されている。

[0023]　以下、本明細書に記載されている遺伝子／タンパク質について説明する。

[0024] 本明細書において、「Ａｋｔ経路」とは、様々な細胞機能の制御に関連するキナーゼであるＡｋｔを介したシグナル経路の総称である。Ａｋｔ活性は、栄養や成長因子、運動などの様々な刺激に起因して調節される。活性化されたＡｋｔは、ｍＴＯＲ（ｍａｍｍａｌｉａｎ ｔａｒｇｅｔ ｏｆ ｒａｐａｍｙｃｉｎ）を介して、筋肉合成に関与するＳ６Ｋ（ｒｉｂｏｓｏｍａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓ６ ｋｉｎａｓｅ）を活性化する。また、活性化されたＡｋｔは、筋肉分解を促進するＦｏｘｏ１を阻害することで、筋肉分解を間接的に抑制することが知られている。

[0025] 本明細書において、「Ｍｓｔｎ（Ｍｙｏｓｔａｔｉｎ）」とは、ＴＧＦ－βスーパーファミリーに属するタンパク質であり、筋抑制因子として、骨格筋や心筋、脂肪組織において特異的に発現している。Ｍｓｔｎは細胞内で活性体に変換され、Ｓｍａｄ（ｓｍａｌｌ ｍｏｔｈｅｒｓ ａｇａｉｎｓｔ ｄｅｃａｐｅｎｔａｐｌｅｇｉｃ）のリン酸化／活性化を介してＡｋｔを抑制することで、筋肉分解を促進し、かつ筋肉合成を抑制する。Ｍｓｔｎは、サテライト細胞の分化を抑制すること、Ａｋｔ経路の抑制を介して筋肉分解を促進すること、およびｍＴＯＲ経路を介して筋肉合成を抑制することが報告されている（非特許文献３参照）。また、Ｍｓｔｎ欠損マウスでは、デキサメタゾン誘発性の筋萎縮が惹起されないことが知られている（非特許文献４参照）。

[0026] 本明細書において、「Ａｔｒｏｇｉｎ－１」および「ＭｕＲＦ１（ｍｕｓｃｌｅ ＲＩＮＧ－ｆｉｎｇｅｒ ｐｒｏｔｅｉｎ－１）」とは、共に筋肉分解経路の一つであるユビキチン－プロテアソーム系に関与するユビキチンリガーゼであり、骨格筋や心筋に発現していることが知られている。

[0027] 本明細書において、「Ｆｏｘｏ１」とは、フォークヘッド型転写因子（Ｆｏｒｋｈｅａｄ ｂｏｘ ｐｒｏｔｅｉｎ Ｏ１）をいう。Ｆｏｘｏ１は、通常リン酸化された状態で細胞質に局在するが、脱リン酸化に伴って核内に移行し、転写因子として機能する。Ｆｏｘｏ１の発現増加は筋萎縮に共通して認められ、ユビキチン－プロテアソーム系によるタンパク分解、オートフ

ァジーの亢進、さらにタンパク合成の抑制等の様々な機序に関与することが知られている。

[0028] 本明細書において、「Ｒｅｄｄ１」とは、ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｉｎ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ ＤＮＡ ｄａｍａｇｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅ １をいう。Ｒｅｄｄ１は、低酸素条件下等で発現が誘導され、ｍＴＯＲ経路を抑制することで、筋肉合成を抑制することが知られている。

[0029] 本明細書において、「筋萎縮」とは、筋肉合成と筋肉分解の代謝回転が分解に傾くことによって、筋細胞が減少または縮小し、筋量が低下することをいう。筋萎縮は、長期間の安静臥床や骨折等によるギプス固定、疾病、加齢等によるものに大別される。したがって、「筋萎縮抑制」とは、上記原因による運動器の機能低下や筋量の低下を抑制することをいう。

[0030] 本明細書において、「筋肉分解」とは、Ａｋｔ経路、カテプシン系やユビキチン－プロテアソーム系、オートファジー系等に関連する遺伝子の発現が誘導されることにより、筋線維タンパク質の分解／異化が亢進することをいう。より具体的には、Ｍｓｔｎ遺伝子や筋タンパク分解経路の一つであるユビキチン－プロテアソーム系に関連する遺伝子（Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ１およびＦｏｘｏ１等）の発現誘導による筋線維タンパク質分解の亢進をいう。

[0031] 本明細書において、「筋肉合成」とは、筋線維タンパク質の合成／同化が亢進することをいう。より具体的には、Ｍｓｔｎ遺伝子やＲｅｄｄ１遺伝子の発現抑制により骨格筋における翻訳制御因子であるキナーゼ複合体ｍＴＯＲの活性化を誘導して、筋タンパク質合成を促進することをいう。

[0032] 本発明のケルセチン配糖体は、筋肉合成ならびに筋肉分解等の筋肉代謝に関連する因子（Ｍｓｔｎ、Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１、Ｆｏｘｏ１およびＲｅｄｄ１）の発現を抑制する。具体的には、後述の実施例２に示すとおり、本発明のケルセチン配糖体は、骨格筋形成抑制因子であるＭｓｔｎの発現抑制作用を示す（実施例２）。また、本発明のケルセチン配糖体は、Ｍｓｔｎ発現抑制に伴うＡｋｔ経路の抑制を介して、筋肉分解に関わる因子

Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１およびＦｏｘｏ１の発現を抑制し、筋肉分解を抑制する（実施例２）。さらに、本発明のケルセチン配糖体によるＭｓｔｎ発現抑制に伴い、筋肉合成に関与するｍＴＯＲ経路を抑制するＲｅｄｄ１の発現が抑制され、筋肉合成が促進される（実施例１および２）。すなわち、本発明は、筋肉合成および筋肉分解という筋肉代謝の一連の過程に関与するシグナル経路の起点となるＭｓｔｎの発現を抑制することで、筋肉の肥大・再生を促し、筋力の向上、筋量の調節・増加、筋萎縮の予防又は抑制等を可能にするものである。

[0033] また、筋萎縮モデルにおいて、ケルセチン配糖体で認められた筋萎縮抑制効果および筋萎縮関連遺伝子の発現抑制効果は、ケルセチンでは認められなかった（実施例３）。したがって、ケルセチン配糖体では、ケルセチンでは達成し得なかった優れた効果が得られる。

[0034] 本発明の筋萎縮抑制剤は、運動器機能低下または運動器障害の予防または処置のために使用されるものである。例えば、長期間の安静臥床や骨折等によるギプス固定、疾病、加齢等に起因する運動器障害やロコモティブシンドローム等の予防または処置が含まれるが、これらに限定されない。当該使用は、ヒトまたは非ヒト動物における使用であり、また治療的使用であっても非治療的使用であってもよい。ここで、「非治療的」とは、医療行為、すなわち治療による人体への処理行為を含まない概念である。

[0035] 本発明の筋萎縮抑制剤は、薬剤誘発性筋萎縮の予防または処置のために使用されるものである。例えば、ステロイドホルモンの長期摂取による筋萎縮の予防または処置が含まれるが、これらに限定されない。当該使用は、ヒトまたは非ヒト動物における使用であり、また治療的使用であっても非治療的使用であってもよい。

[0036] 本発明は、一例として、医薬品等の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。

[0037] 本発明のケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。一例として、医薬組成物等の形態で提供す

ることができるが、本形態に限定されるものではない。

[0038] また、本発明は、ペットの餌として加工したペットフードや動物飼料等、並びに動物用医薬でもよい。

[0039] 本発明の筋萎縮抑制剤（医薬組成物等）には、剤の全重量にもよるが、ケルセチン配糖体をケルセチン換算値として、０．１ｍｇ～８０００ｍｇ、好ましくは０．３ｍｇ～４０００ｍｇ程度の量を配合することができる。剤中におけるケルセチン配糖体の総配合割合は、剤全重量に対し、好ましくは０．００１～９５重量％であり、より好ましくは０．０１～８０重量％程度であるのがよい。

[0040] 動物を対象に投与する場合（マウス１個体当たり約２０ｇに対して）、ケルセチン配糖体の総配合量としては、ケルセチン換算値として０．１ｍｇ～１６ｍｇ、好ましくは０．３ｍｇ～４ｍｇ程度を摂取できるような量にするとよい。特にヒト（成人）を対象に投与する場合、ケルセチン配糖体の総配合量としては、ケルセチン換算値として０．１ｍｇ～８０００ｍｇ、好ましくは０．３ｍｇ～４０００ｍｇ程度を摂取できるような量にするとよい。

[0041] 本発明の組成物へのケルセチン配糖体の配合量は、酵素処理ルチンの摂取量が一個体あたり、１日０．１～２０ｇ、好ましくは０．３～１０ｇとなることを目安として、決定することができる。また、体重１ｋｇあたりの摂取量は、例えば０．００２～４００ｍｇ／ｋｇ、より好ましくは０．００６～２００ｍｇ／ｋｇとすることができる。あるいは、組成物全体に対して、０．００１～９５重量％、好ましくは０．０１～８０重量％とすることができる。

[0042] 本発明の筋萎縮抑制剤を医薬等として用いる場合、その投与形態は経口投与でもよいし、注射剤等の形態で投与してもよく、各々の投与に適した製剤として公知のものを適宜用いればよい。例えば、経口投与に適した製剤には、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、溶液剤、懸濁液剤、シロップ剤などが含まれるが、これらに限定されない。

[0043] 本発明の剤は、その形態に応じて、ケルセチン配糖体の他に、任意の添加

剤、通常の剤に用いられる任意の成分を含有することができる。これらの添加剤および／または成分の例としては、ビタミンＥ、ビタミンＣ等のビタミン類、ミネラル類、栄養成分、香料などの生理活性成分の他、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、コーティング剤等が挙げられる。

実施例

[0044] 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。当業者は、本発明の方法を種々変更、修飾して使用することが可能であり、これらも本発明の範囲に含まれる。

[0045] 実施例１：ケルセチン配糖体によるデキサメタゾン誘発性筋萎縮の抑制効果

ＢＡＬＢ／ｃ系雄性マウス（７週齢）を清水実験材料株式会社より購入し、１週間試験環境下で馴化させた後、馴化期間終了日に体重を測定し、試験にはこの期間を満了して順調な発育を示した動物を供した。飼料は、日本クレア社製のＣＥ－２（固形）を用い、試験期間を通じて自由摂餌とした。飲料水は、馴化期間中は水道水を自由に摂取させた。なお、マウスは１ケージあたり４～５匹とし、ケージは１週間に２回交換した。

[0046] 馴化期間終了後７日間にわたり、４．５ｇ／Ｌケルセチン配糖体ならびに水道水（コントロール）の飲水投与後、７日間のデキサメタゾンとケルセチン配糖体併用飲水投与試験を行った。デキサメタゾンは、水道水に１０ｍｇ／Ｌで溶解し、一方、ケルセチン配糖体は水道水に１．５ｇ／Ｌと４．５ｇ／Ｌの異なる濃度で溶解した。試験はコントロール（水道水投与）群、デキサメタゾン投与群、デキサメタゾンと１．５ｇ／Ｌケルセチン配糖体併用投与群、ならびにデキサメタゾンと４．５ｇ／Ｌケルセチン配糖体併用投与群の４つの群に分けて行った。投与試験終了後、マウスを頚椎脱臼により安楽死させた後、腓腹筋の組織を摘出して重量を測定し、腓腹筋重量を体重で除した値を用いて筋萎縮の評価を行った。なお、得られた数値は平均値±標準誤差で示した。腓腹筋重量比のコントロール群とデキサメタゾン投与群との

平均値の差はＳｔｕｄｅｎｔのｔ－検定（Ｓｔｕｄｅｎｔ’ｓｔ－ｔｅｓｔ）、デキサメタゾン投与群とデキサメタゾンと１．５ｇ／Ｌケルセチン配糖体併用投与群ならびに４．５ｇ／Ｌケルセチン配糖体併用投与群との平均値の差はＤｕｎｎｅｔｔ法による多重比較検定（Ｄｕｎｎｅｔｔ’ｓｔｅｓｔ）を用いて検定した。

[0047] 結果を図１に示す。本試験において、腓腹筋重量比は、コントロール群と比較して、デキサメタゾン飲水投与により有意に低下した（図１）。一方で、デキサメタゾン飲水投与群に対して、デキサメタゾンとケルセチン配糖体を併用飲水投与することで、ケルセチン配糖体の濃度依存的に腓腹筋重量比が有意に増加した（図１）。本結果は、ケルセチン配糖体がデキサメタゾン誘発性筋萎縮に対して筋萎縮抑制効果を発揮することを示す。

[0048] 実施例２：ケルセチン配糖体によるＭｓｔｎおよびその下流遺伝子発現の抑制効果

７週齢のＢＡＬＢ／ｃ系雄性マウスを１週間馴化させた後、４．５ｇ／Ｌケルセチン配糖体ならびに水道水（コントロール）を１週間自由摂水させた。１週間後、１０ｍｇ／Ｌのデキサメタゾンを４．５ｇ／Ｌのケルセチン配糖体と混合して自由摂水させ、摂水後１、３、７日後に解剖し、左右の腓腹筋を採取した。腓腹筋は液体窒素で瞬間冷却した後、分析時まで－８０度の冷凍庫に保存した。

[0049] その後、詳細な分子メカニズムを解析するために、腓腹筋組織内において筋萎縮に関わる遺伝子発現の解析を行った。凍結保存した腓腹筋から、ＩＳＯＧＥＮ（株式会社ニッポンジーン）ならびにＲＮｅａｚｙ Ｍｉｎｉ Ｋｉｔ（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてＲＮＡを抽出した。Ｈｉｇｈ－Ｃａｐａｃｉｔｙ ｃＤＮＡ Ｒｅｖｅｒｓｅ Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ Ｋｉｔｓ（Ａｐｐｌｉｅｄ ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いてｃＤＮＡ合成を行った。作成したｃＤＮＡからＴａｑＭａｎ Ｆａｓｔ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＰＣＲ ｍａｓｔｅｒ ｍｉｘ（Ａｐｐｌｉｅｄ ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いた定量的逆転写ＰＣＲ法で、筋萎縮に関わる遺伝子（Ａｔｒｏｇｉ

ｎ－１、ＭｕＲＦ－１、Ｆｏｘｏ１、Ｒｅｄｄ１、Ｍｓｔｎ）および補正遺伝子（１８ＳｒＲＮＡ）のメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）量を測定した。なお、得られた数値は平均値±標準誤差で示した。遺伝子発現量のデキサメタゾン投与群とデキサメタゾンとケルセチン配糖体併用投与群との平均値の差はＳｔｕｄｅｎｔのｔ－検定を用いて検定し、５％以下を有意とした。

[0050] 結果を図２に示す。遺伝子発現評価の結果、デキサメタゾンとケルセチン配糖体の併用飲水投与期間を１日間に設定した試験において、デキサメタゾン飲水投与群と比較してデキサメタゾンとケルセチン配糖体併用飲水投与群において、Ｆｏｘｏ１のｍＲＮＡ量の減少傾向、ならびにＡｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１およびＲｅｄｄ１のｍＲＮＡ量の有意な減少が認められた（図２）。さらにＭｓｔｎのｍＲＮＡ量は、デキサメタゾンとケルセチン配糖体の併用飲水投与によりコントロールレベルまで完全に低下した（図２）。

[0051] 本試験では、ケルセチン配糖体がＭｓｔｎ遺伝子の発現を抑制すること、さらにその下流に存在する筋肉の分化、合成、分解に関与する因子に作用し、その結果として筋萎縮が抑制されることが示された。

[0052] 実施例３：ケルセチン配糖体とケルセチンのデキサメタゾン誘発性筋萎縮抑制効果の比較

７週齢のＢＡＬＢ／ｃ系雄性マウスを１週間馴化させた後、１０ｍｇ／Ｌのデキサメタゾンを自由摂水させて飲水投与した。一方、２００ｍｇ／ｋｇのケルセチン配糖体ならびにルチン換算したケルセチン配糖体と等量のケルセチンを０．５％のｃａｒｂｏｘｙｍｅｔｈｙｌ ｃｅｌｌｕｌｏｓｅ ｓｏｄｉｕｍ ｓａｌｔを含むｍｉｌｌｉＱ水に懸濁し、５日間（月曜日から金曜日）まで強制経口投与した。また、金曜日から１０ｍｇ／Ｌのデキサメタゾンの飲水投与を開始した。その翌週より、再びケルセチン配糖体ならびにケルセチンの強制経口投与（月曜日から木曜日）をデキサメタゾンの飲水投与と並行して行い、金曜日に解剖を行った。投与試験終了後の試料回収、腓腹筋重量比による筋萎縮の評価ならびに腓腹筋組織での遺伝子発現量の測

定は実施例１および２に準じて行った。遺伝子発現量のデキサメタゾン投与群とデキサメタゾンとケルセチン配糖体併用投与群ならびにケルセチン併用投与群との平均値の差はＤｕｎｎｅｔｔ’ｓｔｅｓｔを用いて検定し、５％以下を有意とした。

[0053] 結果を図３および図４に示す。強制経口投与試験の結果、デキサメタゾン投与によりコントロール群と比較して有意に低下した腓腹筋重量比が、ケルセチン配糖体の強制経口投与により有意に増加した（図３）。一方で、ケルセチンの強制経口投与では、デキサメタゾン投与により低下した腓腹筋重量比の改善効果は認められなかった（図３）。遺伝子発現評価の結果、デキサメタゾン飲水投与により増大した筋萎縮関連遺伝子ＭｕＲＦ－１、Ｆｏｘｏ１およびＲｅｄｄ１が、ケルセチン配糖体の強制経口投与により有意に低下した（図４）。一方で、ケルセチンの強制経口投与では、デキサメタゾン投与により増大した筋萎縮関連遺伝子の発現抑制効果は認められなかった（図４）。本結果は、ケルセチン配糖体では、ケルセチンにおいて認められない筋萎縮抑制効果が得られることを示す。

産業上の利用可能性

[0054] 本発明の筋萎縮抑制剤は、体内吸収性に優れたケルセチン配糖体を含有することで、低服用量／低摂取量で期待する生理活性を発揮できる。また、ケルセチン配糖体は植物由来成分であるため、極めて安全性が高く、服用／摂取に伴う予期せぬ有害事象の発現可能性が低い。したがって、本発明のケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤は、優れた筋萎縮抑制効果を低用量でかつ安全に達成できるため、筋萎縮等に起因する運動器障害の予防および処置のための新たな手段として、産業上の利用可能性は高い。

請求の範囲

[請求項1] ケルセチン配糖体を含有する筋萎縮抑制剤。

[請求項2] 筋萎縮抑制が、Ｍｓｔｎの発現抑制に起因するものである、請求項１に記載の剤。

[請求項3] 筋萎縮抑制が、Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１、Ｆｏｘｏ１およびＲｅｄｄ１からなる群から選択される一以上の遺伝子の発現抑制に起因するものである、請求項１または２のいずれか一項に記載の剤。

[請求項4] 筋肉分解抑制作用を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の剤。

[請求項5] 筋肉分解抑制作用が、Ａｔｒｏｇｉｎ－１、ＭｕＲＦ－１およびＦｏｘｏ１からなる群から選択される一以上の遺伝子の発現抑制に起因するものである、請求項４に記載の剤。

[請求項6] 筋肉合成促進作用を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の剤。

[請求項7] 筋肉合成促進作用が、Ｒｅｄｄ１の発現抑制に起因するものである、請求項６に記載の剤。

[請求項8] 運動器機能低下または運動器障害の予防または処置のために使用される、請求項１～７のいずれか一項に記載の剤。

[請求項9] 薬剤誘発性筋萎縮の予防または処置のために使用される、請求項１～７のいずれか一項に記載の剤。

[請求項10] 請求項１～９のいずれか一項に記載の剤を含む組成物。