

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02008/032450

発行日 平成22年1月21日 (2010. 1. 21)

(43) 国際公開日 **平成20年3月20日 (2008. 3. 20)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 3/06 (2006. 01)	A 6 1 P 3/06	
A 6 1 P 3/04 (2006. 01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 1/16 (2006. 01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)	A 6 1 P 9/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2008-534244 (P2008-534244)	(71) 出願人	504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2007/000996	(71) 出願人	307010166 第一三共株式会社 東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号
(22) 国際出願日	平成19年9月13日 (2007. 9. 13)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(31) 優先権主張番号	特願2006-250529 (P2006-250529)	(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成18年9月15日 (2006. 9. 15)	(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脂肪肝の予防剤および／または治療剤

(57) 【要約】

本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストを含有する脂肪肝予防剤および／または治療剤に関する。本発明の医薬は、脂肪肝を予防・治療できるだけでなく、肥満や糖尿病などに代表されるメタボリックシンドロームも予防できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを投与することによる脂肪肝の予防方法および / または治療方法。

【請求項 2】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 1 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 3】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (B N P) である、請求項 2 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 4】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) である、請求項 2 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 5】

c G M P 依存性プロテインキナーゼ I (c G K I) の活性化剤を投与することによる脂肪肝の予防方法および / または治療方法。

【請求項 6】

脂肪肝がメタボリックシンドロームにより誘発される脂肪肝である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 7】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを投与することによるメタボリックシンドロームの予防方法および / または治療方法。

【請求項 8】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 7 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 9】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (B N P) である、請求項 8 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 10】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) である、請求項 9 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 11】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを投与することによる肥満の予防方法および / または治療方法。

【請求項 12】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 11 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 13】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (B N P) である、請求項 12 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 14】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド (A N P) である、請求項 12 に記載の予防方法および / または治療方法。

【請求項 15】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有する脂肪肝の予防剤および / または治療剤。

【請求項 16】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 15 に記載の予防剤および / または治療剤。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）である、請求項 16 に記載の予防剤および／または治療剤。

【請求項 18】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストが心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）である、請求項 16 に記載の予防剤および／または治療剤。

【請求項 19】

ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子を含有する脂肪肝の予防剤および／または治療剤。

【請求項 20】

cGMP 依存性プロテインキナーゼ I（cGKI）の活性化剤を含有する脂肪肝の予防剤および／または治療剤。

10

【請求項 21】

cGMP 依存性プロテインキナーゼ I（cGKI）の遺伝子を含有する脂肪肝の予防剤および／または治療剤。

【請求項 22】

cGMP を含有する脂肪肝の予防剤および／または治療剤。

【請求項 23】

脂肪肝がメタボリックシンドロームにより誘発される脂肪肝である、請求項 15 から 22 のいずれか 1 項に記載の予防および／または治療剤。

【請求項 24】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストを含む脂肪肝の予防用および／または治療用のキット。

20

【請求項 25】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）である、請求項 25 に記載のキット。

【請求項 27】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）である、請求項 25 に記載のキット。

30

【請求項 28】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストを含有するメタボリックシンドロームの予防剤および／または治療剤。

【請求項 29】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 28 記載の予防剤および／または治療剤。

【請求項 30】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）である、請求項 29 に記載の予防剤および／または治療剤。

【請求項 31】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）である請求項 29 に記載の予防剤および／または治療剤。

40

【請求項 32】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストを含有する肥満の予防剤および／または治療剤。

【請求項 33】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 32 記載の予防剤および／または治療剤。

【請求項 34】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）である、請求項 33

50

に記載の予防剤および/または治療剤。

【請求項 35】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) である請求項 33 に記載の予防剤および/または治療剤。

【請求項 36】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストの、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 37】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 36 に記載の使用。

【請求項 38】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) である、請求項 37 に記載の使用。

【請求項 39】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストが心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) である、請求項 37 に記載の使用。

【請求項 40】

ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 41】

cGMP 依存性プロテインキナーゼ I (cGKI) の活性化剤の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 42】

cGMP 依存性プロテインキナーゼ I (cGKI) の遺伝子の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 43】

cGMP の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 44】

脂肪肝がメタボリックシンドロームにより誘発される脂肪肝である、請求項 36 から 43 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 45】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストの、メタボリックシンドロームの予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 46】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 45 記載の使用。

【請求項 47】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) である、請求項 46 に記載の使用。

【請求項 48】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) である請求項 46 に記載の使用。

【請求項 49】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストの、肥満の予防剤および/または治療剤製造のための使用。

【請求項 50】

ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストがナトリウム利尿ペプチドである、請求項 49 記載の使用。

【請求項 51】

ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) である、請求項 50

10

20

30

40

50

に記載の使用。

【請求項 5 2】

ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) である請求項 5 0
に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、脂肪肝の予防剤および/または治療剤に関する。

【背景技術】

【0002】

10

健康診断で異常検査所見とされる項目の中で、肝機能障害は高脂血症に次いで多く、その肝機能障害の大部分は脂肪肝となっている。脂肪肝とは、肝細胞内に中性脂肪を主とした脂質が貯留して重量比で5%以上となった状態である。なお、中性脂肪とは、グリセリンの脂肪酸エステル(トリアシルグリセロール)である。脂質が5%以上となると、肝小葉の肝細胞(肝実質細胞)の3分の1以上に脂肪滴が現れる。脂肪肝の原因としては、飲酒、肥満、糖尿病、薬物など様々なものがあるが、その成因によりアルコール性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝に大別されている。非アルコール性脂肪肝は、糖尿病、高脂血症、肥満等の生活習慣病の増加に伴い増加している。

【0003】

20

アルコール性脂肪肝は、肝炎、肝硬変、肝臓癌へと進行する可能性が高く、その治療法としては禁酒を中心としたものとなる。一方、非アルコール性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)は、従来、食事療法や運動療法で改善され特に重篤な疾患へ移行することのない可逆的なものが多いとされてきたが、近年、治療せず放置すると肝機能が低下し、肝硬変などへ進展する危険性もあることが指摘されている。とりわけ、NAFLDのうち、炎症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis: NASH)は、肝組織学的にアルコール性肝炎に類似した炎症を認め、肝硬変から肝細胞癌へ進行する危険性が高い疾患であることがわかってきている。したがって、これまでに増して、NAFLD、特に、NASHを適切に治療することは医療上非常に重要な課題であると考えられている。

【0004】

30

一方、メタボリックシンドロームは、内臓脂肪(腹腔内脂肪)の蓄積に加え、インスリン抵抗性、脂質異常、高血圧等の心血管病に対する複数のリスクが合併した症候群であり、過栄養を基礎とした内臓脂肪の蓄積がもたらす種々の生活習慣病につながる病態であると理解されている。メタボリックシンドロームの患者においては、非メタボリックシンドローム患者と比較して高頻度でNASHを含むNAFLDが観察され、多くの患者がNASHを含むNAFLDを併発していることが知られている。

【0005】

40

すなわち、非アルコール性脂肪肝の患者は、肥満、高血圧、糖尿病や高脂血症などの基礎疾患を併発したメタボリックシンドロームを伴う場合があり、このような患者においては、脂肪肝の治療のみではなく、それらの基礎疾患の治療も必要となる場合がある。したがって、脂肪肝の治療には、このような基礎疾患に悪影響を及ぼすことがない薬物、さらにはこれらの基礎疾患を同時に治療し得る薬物を使用することが望ましい。

【0006】

脂肪肝の食事療法としては、飲酒制限、カロリー制限および低脂肪・高蛋白食の摂取が中心であり、運動療法としては、有酸素運動などにより脂肪をエネルギーとして消費する方策が取られる。その際、脂肪肝は拒食症などの栄養障害でも引き起こされることが知られているように、極端な食事制限を行うと筋肉を落として逆に脂肪を増やすことから急激な体重減少は好ましくなく、1~2kg/月程度の減量が望ましい。このように、脂肪肝の治療はコントロールされた食事とかなりの長時間の有酸素運動による根気の必要なものとなる。

50

【 0 0 0 7 】

現代人の生活は、ストレスと飽食に満ちたものとなっており、脂肪肝を引き起こしやすい状況となっていることから、上記のような根気の要る脂肪肝の治療法に代わって、あるいはそれと併用することのできる新たな治療法が望まれる。

【 0 0 0 8 】

ところで、肥満や高血圧の患者においては、心臓や腎臓などの循環器系器官に過度な負担がかかっている。そのような状況においては、ナトリウム利尿ペプチドと称されるペプチドの産生・分泌が亢進し、循環器系器官への負担を和らげる代償作用が働いていることはよく知られている。ナトリウム利尿ペプチドと称されるペプチドには、心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（BNP）およびC型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）が知られている。ANPは、心房細胞で産生され分泌されるアミノ酸28個から成る環状構造を有するペプチドであり、腎臓では利尿作用を示し、血管では血管平滑筋を弛緩・拡張する。ANPは、さらにレニン・バソプレシン・アルドステロン系に対して拮抗的に作用する。これらの作用は、総合的に血圧の低下や体液量の低減などを通じて心臓の負担を軽減する方向に働く。BNPは、アミノ酸32個から成る環状構造を有するペプチドであり、主に心室細胞で産生され分泌されてANPと同様な作用を有する。ANPとBNPは、ともにグアニレートシクラーゼドメインを有する受容体NP_R-A（別名、GC-A）に結合して、cGMPの産生を促進して上記の作用を発現する。実際、ANPはうっ血性心不全などにおいて心房膨満圧の上昇に伴い分泌が促進され、上記の作用によりうっ血性心不全などの症状を軽減する働きをしている。BNPも心筋梗塞などの際に、分泌が促進され、上記の作用により心筋梗塞などに伴う諸症状を和らげる働きをしている（非特許文献1）。

10

20

【 0 0 0 9 】

最近になって、脂肪組織においてもナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aの発現が確認されて、ANPやBNPは心血管系に作用するばかりではなく、脂肪分解の促進にも関与しているという報告がある（非特許文献2）。ANPやBNPの脂肪分解促進作用は、ナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aの細胞内部分に存在するグアニレートシクラーゼにより産生されたcGMPがcGMP依存性のプロテインカイネースI（cGKI）に作用し、ホルモン感受性リパーゼのリン酸化を促進して活性化することによると考えられている。活性化されたホルモン感受性リパーゼは、トリグリセリドを遊離脂肪酸に加水分解する。しかしながら、上記のような脂肪組織に対するナトリウム利尿ペプチドの作用は若年男子における肥満には関与していないことが報告されている（非特許文献3）。また、ANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドによる脂肪組織における脂肪分解の促進作用が肝細胞にどのような影響を及ぼすかについては知られていない。すなわち、脂肪組織とは本質的に異なる肝細胞においてANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドが脂肪の蓄積や代謝に直接的にまたは間接的に及ぼす作用については何ら明らかにされていない。実際、最近のナトリウム利尿ペプチドに関する総説においても、心血管系疾患への治療上の応用に関しては詳細に記載されているが、脂肪肝の予防および/または治療への応用については何ら示唆されていない（非特許文献4）。

30

【非特許文献1】European J. Endocrinology, 135巻, 265頁, 1996年

40

【非特許文献2】FASEB, 14巻, 1345頁, 2000年

【非特許文献3】J. Lipid Res., 42巻, 536頁, 2001年

【非特許文献4】Endocrine Review, 27巻, 47頁, 2006年

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

本発明においては、脂肪肝の予防および/または治療に有用な薬剤を見出すことが課題である。さらには、心筋梗塞などの心血管系の疾患を引き起こす可能性が高いメタボリックシンドロームの患者において、脂肪肝の予防および/または治療に有用な薬剤を見出す

50

ことが課題である。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者等は、脂肪肝を予防および/または治療することができる薬剤について、さらには心筋梗塞などの心血管系の疾患を引き起こす可能性が高いメタボリックシンドロームに伴う脂肪肝（または、メタボリックシンドロームを伴う脂肪肝）を予防および/または治療することができる薬剤について鋭意検討した結果、ナトリウム利尿ペプチドが体重減少、内臓脂肪の減少、耐糖能の改善、および脂肪肝の抑制作用を有することを見出した。さらには、cGMP依存性のプロテインカイネースI（cGKI）の活性化により、ナトリウム利尿ペプチドと同様に、体重減少、内臓脂肪の減少、耐糖能の改善、および脂肪肝の抑制作用を有することを見出して、本発明を完成した。

10

【0012】

具体的には、BNPを連続投与した状況に擬して、肝臓特異的にBNPを過剰発現させたマウス（以下、BNP-Tgマウス）を作製し、高脂肪食を与えてBNPの効果を検討した結果、野生型のマウスに比してBNP-Tgマウスでは体重増加、内臓脂肪の増加、肝重量増加、および肝の中性脂肪増加が有意に抑制されることを見出した。また、高脂肪食を与えたBNP-Tgマウスにおいて、糖負荷やインスリン投与時に野生型のマウスに比して血糖値の上昇が有意に軽減されることから、ナトリウム利尿ペプチドが耐糖能やインスリン感受性も改善させることを見出した。

20

【0013】

さらには、ナトリウム利尿ペプチドがナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aに作用して産生されるcGMPにより活性化されるcGMP依存性プロテインカイネースI（cGKI）を全身性に過剰発現させたマウス（以下、cGK-Tgマウス）に高脂肪食を与えた結果、BNP-Tgマウスにおける同様に、野生型のマウスに比して体重増加、内臓脂肪の増加、肝重量増加、および肝の中性脂肪増加が有意に抑制されることを見出した。また、高脂肪食を与えたcGK-Tgマウスにおいて、糖負荷やインスリン投与時に野生型のマウスに比して血糖値の上昇が有意に軽減されることから、cGKIの活性化が耐糖能やインスリン感受性も改善させることを見出した。また、GC-Aヘテロノックアウトマウスに高脂肪食を与えた結果、野生型のマウスに比して肥満、脂肪肝形成が大きく、耐糖能障害の程度も大きいことを見出した。

30

【0014】

これらの結果は、BNP等のナトリウム利尿ペプチドを投与することにより、脂肪肝を予防および/または治療できることを示すばかりではなく、肥満や糖尿病などに代表されるメタボリックシンドロームに伴う脂肪肝（または、肥満や糖尿病などに代表されるメタボリックシンドロームを伴う脂肪肝）を予防および/または治療できることを示す。さらに、メタボリックシンドロームや肥満を予防および/または治療できることを示す。さらに、たとえばANPのようにBNP同様GC-Aのアゴニストとして機能することが知られている化合物に、BNPと同様の効果があることを示していると考えられる。同様に、cGKIが活性化されることにより脂肪肝を予防および/または治療できることを示すばかりではなく、肥満や糖尿病などに代表されるメタボリックシンドロームに伴う脂肪肝（または、肥満や糖尿病などに代表されるメタボリックシンドロームを伴う脂肪肝）を予防および/または治療できることを示す。さらに、メタボリックシンドロームや肥満を予防できることを示す。

40

【0015】

したがって、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aのアゴニストを投与することによる脂肪肝の予防および/または治療方法を提供する。

また、本発明は、cGMP依存性プロテインカイネースI（cGKI）の活性化剤を投与することによる脂肪肝の予防および/または治療方法を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子を含む脂肪肝の予防剤および/または治療剤を提供する。

50

また、本発明は、c G M P 依存性プロテインカイネース I (c G K I) の遺伝子を含有する脂肪肝の予防剤および/または治療剤を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有する脂肪肝の予防剤および/または治療剤を提供する。

また、本発明は、c G M P 依存性プロテインカイネース I (c G K I) の活性化剤を含有する脂肪肝の予防剤および/または治療剤を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有するメタボリックシンドローム患者の脂肪肝の予防剤および/または治療剤を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有する脂肪肝の治療用キットを提供する。

10

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有するメタボリックシンドロームの予防剤および/または治療剤を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有する肥満の予防剤および/または治療剤を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチドの遺伝子の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

また、本発明は、c G M P 依存性プロテインカイネース I (c G K I) の遺伝子の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストの、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

20

また、本発明は、c G M P 依存性プロテインカイネース I (c G K I) の活性化剤の、脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストの、メタボリックシンドローム患者の脂肪肝の予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストの、メタボリックシンドロームの予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストの、肥満の予防剤および/または治療剤製造のための使用を提供する。

30

【発明の効果】

【0016】

本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有する医薬を用いて脂肪肝の予防および/または治療を可能とする。また、本発明は、ナトリウム利尿ペプチド受容体 G C - A のアゴニストを含有する医薬を用いて、メタボリックシンドロームに伴う脂肪肝（または、メタボリックシンドロームを伴う脂肪肝）の予防および/または治療を可能とする。さらに、メタボリックシンドロームや肥満の予防および/または治療を可能とする。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】高脂肪食を投与した時の B N P - T g マウスと野生型 (W t) マウスの体重推移を示すグラフである。

40

【図2】高脂肪食を投与した時の B N P - T g マウスと野生型 (W t) マウスの肝重量を示すグラフである。

【図3】標準食と高脂肪食を投与した時の B N P - T g マウスと野生型 (W t) マウスの肝臓の中性脂肪含量を示すグラフである。

【図4】標準食と高脂肪食を投与したときの B N P - T g マウスと野生型 (W t) マウスの、皮下脂肪組織重量 (A)、腸間膜脂肪組織重量 (B)、総脂肪組織重量 (C) ならびに高脂肪食を投与したときの B N P - T g マウスと野生型 (W t) マウスの皮下脂肪組織を構成する脂肪細胞の平均面積 (D) を示すグラフである。

【図5】高脂肪食を投与した時の B N P - T g マウスと野生型 (W t) マウスの耐糖能を

50

示すグラフである。

【図6】高脂肪食を投与した時のBNP-Tgマウスと野生型(Wt)マウスのインスリン感受性を示すグラフである。

【図7】標準食と高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスの体重推移を示すグラフである。

【図8】高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスの肝重量を示すグラフである。

【図9】標準食と高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスの肝臓の中性脂肪含量を示すグラフである。

【図10】標準食と高脂肪食を投与したときのcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスの、皮下脂肪組織重量(A)、腸間膜脂肪組織重量(B)、総脂肪組織重量(C)ならびに高脂肪食を投与したときのcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスの皮下脂肪組織を構成する脂肪細胞の平均面積(D)を示すグラフである。

【図11】高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスの耐糖能を示すグラフである。

【図12】高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型(Wt)マウスのインスリン感受性を示すグラフである。

【図13】高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型マウスの肩甲骨間褐色脂肪組織における遺伝子(PGC-1 およびUCP-1)発現を示すグラフである(夫々の遺伝子発現レベルの - a c t i n 遺伝子発現レベルに対する比を、野生型を100%として表示している。* * p < 0.01 vs. 野生型。)

【図14】高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型マウスの大腿四頭筋における遺伝子(PGC-1、UCP-2、UCP-3、PPAR およびPPAR)発現を示すグラフである(夫々の遺伝子発現レベルの - a c t i n 遺伝子発現レベルに対する比を、野生型を100%として表示している。* p < 0.05, * * p < 0.01 vs. 野生型。)

【図15】高脂肪食を投与した時のcGK-Tgマウスと野生型マウスの肝臓における遺伝子(PPAR およびPPAR)発現を示すグラフである(夫々の遺伝子発現レベルの - a c t i n 遺伝子発現レベルに対する比を、野生型を100%として表示している。* p < 0.05, * * p < 0.01 vs. 野生型。)

【図16】高脂肪食を投与した時のGC-A^{+/+}マウスと野生型マウスの体重推移を示すグラフである。

【図17】高脂肪食を投与した時のGC-A^{+/+}マウスと野生型マウスの20週齢時の体重、肝臓重量体重比および肝臓中性脂肪含量を示すグラフである。

【図18】高脂肪食を投与した時のGC-A^{+/+}マウスと野生型マウスの総脂肪重量を示すグラフである。

【図19】高脂肪食を投与したときのGC-A^{+/+}マウスと野生型マウスの18週齢時の摂餌量を示すグラフである。

【図20】高脂肪食を投与した時のGC-A^{+/+}マウスと野生型マウスの18週齢時の腹腔内投与糖負荷試験結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】

【0018】

本発明は、脂肪肝の予防および/または治療を目的とするものであるが、その対象患者は、他の基礎疾患のない脂肪肝の患者であってもよく、また、例えばメタボリックシンドロームに伴う脂肪肝(または、メタボリックシンドロームを伴う脂肪肝)の患者であってもよい。また、本発明は、メタボリックシンドロームの患者や肥満の患者を治療対象としてもよい。

【0019】

本発明で使用するナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aのアゴニストについては、GC-Aに結合し、そのグアニレートシクラーゼを活性化する作用を有する化合物であれば

10

20

30

40

50

、特に限定はなく用いることができるが、代表的なものとしてナトリウム利尿ペプチドが挙げられる。ナトリウム利尿ペプチドとしては、ANPやBNPが代表的なものであるが、これらのナトリウム利尿ペプチドに限定されるものではなく、それらのアミノ酸配列の1ないし複数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものでもよく、また、それらのアミノ酸配列の1ないし複数のアミノ酸が欠失したものでもよく、また、アミノ酸配列の1ないし複数のアミノ酸が欠失するとともにアミノ酸配列の1ないし複数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されたものでもよく、さらには、化学合成的に1ないし複数のアミノ酸が人工的なアミノ酸類似のものに置換されたものでもよい。また、化学合成や天然物由来の低分子の化合物であってもよい。

【0020】

ANPとしては、例えばBiochem. Biophys. Res. Commun., 118巻, 131頁, 1984年に記載のヒト由来-hANPを用いることができ、このANPは、一般名カルペリチド(carperitide)として販売(商品名:ハンブ、HANP)されている。-hANPは、一般的にはHuman pro-ANP[99-126]としても知られている。また、BNPとしては、例えばBiochem. Biophys. Res. Commun., 159巻, 1420頁, 1989年に記載のヒトBNPを用いることができ、このBNPは一般名ネシリチド(nesiritide)として販売(商品名:ナトレコール、Natreacor)されている。

10

【0021】

ナトリウム利尿ペプチドの1ないし複数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された例としては、例えば、ヒトANPの12位のMetがIleに置換されたラット-rANP(Biochem. Biophys. Res. Commun., 121巻, 585頁, 1984年)が挙げられる。また、1ないし複数のアミノ酸が欠失した例としては、例えば、N末のSer-Leu-Arg-Arg-Ser-Serが欠失したANPが挙げられる。この様なANPまたはBNP誘導体に関しては、例えば、Medicinal Research Review, 10巻, 115頁, 1990年に記載されている一連の誘導体が挙げられ、それらは引用されている文献に記載の方法により入手または製造可能である。

20

また、アミノ酸配列の1ないし複数のアミノ酸が欠失するとともにアミノ酸配列の1ないし複数のアミノ酸が他のアミノ酸に置換された例としては、例えば、15アミノ酸残基から成るmini-ANP(Science, 270巻, 1657頁, 1995年)が挙げられる。

30

【0022】

上記のANP、BNP、およびそれらの誘導体は、遺伝子工学的・細胞工学的な手法を用いて生産したものであってもよく、化学合成したものであってもよく、さらにはそれらを酵素処理や化学処理してアミノ酸残基を修飾またはアミノ酸配列の一部を除去したものであってもよい。

【0023】

ナトリウム利尿ペプチド受容体GC-AのアゴニストとしてのANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドは、薬学的に許容される塩としてもよく、例えば塩酸、硫酸、リン酸等の無機酸との塩としてもよく、あるいはギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、クエン酸等の有機酸との塩としてもよい。また、ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩としてもよく、トリエチルアミン等の有機塩基との塩としてもよい。また、ANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドまたはそれらの塩は、薬学的に許容される賦形剤、等張化剤、pH調節剤、希釈剤などと混合して静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、経鼻投与、経肺投与、舌下投与等の非経口的な投与方法で投与することが好ましい。また、これらのナトリウム利尿ペプチドまたはその塩は、リポソームやマイクロカプセルに封入して非経口的に投与してもよく、徐放製剤として患者の体内に埋め込んでもよい。

40

【0024】

ANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドまたはそれらの塩を投与する場合には、例

50

えば凍結乾燥製剤を注射用水に溶解して微量輸液ポンプ（それが無い場合には、小児用微量輸液セット）を用いて連続投与すればよい。ナトリウム利尿ペプチドは、前述のように血管を弛緩・拡張し血圧を低下させる作用を有することから、脂肪肝の予防および/または治療に当たっては、血圧を必要以上に低下させない速度で投与することが好ましく、投与時および投与直後には血圧をモニターすることが推奨される。ANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドまたはそれらの塩の1日の投与量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲であるが、 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \text{mg}/\text{kg}$ が好ましい。投与方法について詳細に述べるならば、ANPを投与する場合には、例えば、ANPの $1000 \mu\text{g}$ を注射用水 10mL に溶解し、“ $\text{体重} \times 0.06 \text{mL}/\text{時間}$ ”の速度（ $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ の投与速度）で投与することが考えられる。投与速度は、上記の速度に限られることなく、その $1/2$ または $1/4$ の速度でもよい。BNPを投与する場合には、 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ をボラス投与した後、 $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ を連続投与することが考えられる。この場合にも、血圧を必要以上に低下させない速度で投与することが好ましく、投与時および投与直後には血圧をモニターすることが推奨される。ANPやBNPが上記の投与速度で血圧や心拍数等に大きな影響を与えない場合には、さらに投与速度を上げてよい。なお、その他のANP誘導体またはBNP誘導体に関しては、その活性と持続性を考慮して、投与速度を決定すればよい。

10

【0025】

また、上記のいずれの薬剤を使用する場合にも、投与期間は、脂肪肝の治療効果が得られるまでとすることが好ましく、継続的に投与してもよく、また間欠的に投与してもよい。脂肪肝の治療効果は、血液学的な検査で血中の中性脂肪、コレステロール値、GOT、GPTを測定することでもよいが、超音波検査やCT検査により判断することが好ましい。

20

【0026】

また、ナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aのアゴニストを含有する脂肪肝の治療用キットとしては、ANPやBNP等のナトリウム利尿ペプチドまたはそれらの塩を凍結乾燥製剤として封入したバイアルとそれを溶解するための注射用水を組み合わせるキットとしたものが挙げられ、また溶解・投与に使用する注射用シリンジをそれらに組み合わせてもよく、さらには微量輸液ポンプや小児用微量輸液セットを組み合わせてもよい。

30

【0027】

cGKIの活性化剤としては、cGMPそのものを用いることもできるが、安定な8-プロモcGMP等の化学合成されたcGMP誘導体を用いてもよく、さらには8-プロモcGMPを分解するホスホジエステラーゼに対する安定性を増強させた誘導体（Pharmacol. Ther., 87巻, 199頁, 2000年）を用いてもよい。また、このようなcGMP誘導体とは異なる化学構造を有する低分子のcGKIの活性化剤を用いてもよい。

【0028】

ANPの遺伝子としては、Science, 226巻, 1206頁, 1984年に記載されているものを用いればよい。また、BNPの遺伝子としては、Biochem. Biophys. Res. Commun., 165巻, 650頁, 1989年に記載されているものを用いればよい。cGMP依存性プロテインキナーズI(cGKI)の遺伝子としては、Hypertension, 27巻, 552頁, 1996年に記載されているcDNAを用いればよい。上記の遺伝子を用いて治療を行う場合には、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスあるいは人工ベクターをベクターとして用いて、筋肉注射や局所注射により遺伝子を導入すればよい。また、上記のようなベクターを使用せず、プラスミドの形で遺伝子を導入してもよい。具体的な遺伝子治療の方法については、実験医学, 12巻, 303頁, 1994年に記載の方法またはそれに引用されている文献の方法等を用いればよい。

40

【0029】

本発明の脂肪肝の予防や治療は、その成因によらず脂肪肝全般について適用できるが、

50

メタボリックシンドロームにより誘発される脂肪肝の予防や治療に好適に用いることができる。また、ナトリウム利尿ペプチド受容体 GC - A のアゴニストを含有する上記の脂肪肝の予防や治療に関する記載は、メタボリックシンドロームや肥満の予防や治療においても同様である。

【実施例】

【0030】

以下に試験例を示して本発明を説明する。

【0031】

[試験例1]

野生型マウスと肝臓特異的にBNPを過剰発現させたマウス(以下、BNP-Tgマウス)に標準食と高脂肪食を与えて、脂肪肝の進展抑制作用を検討した。BNP-Tgマウスは、J. Clinical Invest., 93巻、1911頁、1994年に記載の方法で作製した。

標準食と高脂肪食(熱量比で60%:Research diet社、カタログ番号:D12492)を各々10週齢以降の野生型マウスおよびBNP-Tgマウス(各10匹)に10週間与えた。体重は、6週齢から1週間ごとに測定した。標準食と高脂肪食の投与終了後、肝臓を摘出し、その重量を測定した。また、肝臓をホモジナイズした後、クロロフォルム・メタノール法で脂質を抽出し、中性脂肪測定キット(和光純薬工業、カタログ番号:432-40201)を用いて肝臓内の中性脂肪含量を測定した。

さらに、皮下および腸間膜の脂肪組織を分離し、その重量を測定した。さらに採取した皮下脂肪組織から組織切片を作成し、これをHE染色に付し、マウス一匹につき4視野(100倍視野)観察し、脂肪細胞の平均面積を計測した。

【0032】

<結果>

標準食投与群では、野生型マウス(Wt)とBNP-Tgマウスの体重に差はなかったが、高脂肪食投与群では、BNP-Tgマウスの体重は野生型マウスに比較して高脂肪食投与開始3週後より有意に低値を示した(図1)。

また、高脂肪食投与群では、BNP-Tgマウスの肝重量と肝臓内の中性脂肪含量が野生型マウスに比較して有意に低い値を示した(図2および図3)。

高脂肪食投与群では、BNP-Tgマウスの皮下脂肪組織量、腸間膜脂肪組織量はそれぞれ正常マウスと比して少なかった。さらに、皮下脂肪組織と腸間膜脂肪組織を合計した脂肪組織総重量は、標準食、高脂肪食、いずれを給餌した場合においても、BNP-Tgマウスの方が少なかった(図4A-C)。さらに、高脂肪食投与群の腸間膜脂肪組織の脂肪細胞の平均面積は、BNP-Tgマウスの方が有意に少なかった。(図4D)

【0033】

[試験例2]

10週齢以降の野生型マウス(12匹)およびBNP-Tgマウス(8匹)に熱量比で60%の高脂肪食(Research diet社、カタログ番号:D12492)をそれぞれ10週間与えた。24時間絶食後、ブドウ糖1.0g/kgを腹腔内に投与し、ブドウ糖投与前、投与後15分、30分、60分、120分における血糖値を測定した。

また、上記と同様に高脂肪食を与えたマウスを6時間絶食後、インスリン0.75U/kgを腹腔内に投与し、インスリン投与前、投与後15分、30分、60分、120分における血糖値を測定した。

血液は尾静脈より採取し、デキスター-ZII(バイエル社)を用いて血糖値を測定した。

【0034】

<結果>

BNP-Tgマウスの血糖値は、野生型マウスに比較して、ブドウ糖投与後およびインスリン投与後に有意に低い値を示した(図5および図6)。この結果は、BNP-Tgマウスにおいて耐糖能およびインスリン感受性が改善されていることを示唆する。

【0035】

[試験例3]

野生型マウスと全身性にcGMP依存性プロテインキナーゼIを過剰発現させたマウス(以下、cGK-Tgマウス)に標準食と高脂肪食を与えて、脂肪肝の進展抑制作用を検討した。cGK-Tgマウスは、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100巻、3404頁, 2003年に記載の方法で作製した。

標準食と高脂肪食(熱量比で60%: Research diet社、カタログ番号: D12492)を10週齢以降の野生型マウスおよびcGK-Tgマウス(各12匹)にそれぞれ10週間与えた。体重は、6週齢から1週間ごとに測定した。高脂肪食投与終了後、肝臓を摘出し、その重量を測定した。また、肝臓をホモジナイズした後、クロロフォルム・メタノール法で脂質を抽出し、中性脂肪測定キット(和光純薬工業、カタログ番号: 432-40201)を用いて肝臓内の中性脂肪含量を測定した。さらに、試験例1と同様の方法で、各脂肪組織の重量と脂肪細胞の平均面積を計測した。

10

【0036】

<結果>

標準食投与群および高脂肪食投与群において、cGK-Tgマウスの体重は、野生型マウスに比較して有意に低い値を示した(図7)。

また、高脂肪食を投与したcGK-Tgマウスにおいては、野生型マウスに比較して肝重量と肝臓内の中性脂肪含量が有意に低い値を示した(図8および図9)。皮下脂肪組織重量、腸間膜脂肪組織重量さらにそれらの合計である、総脂肪組織重量いずれについても、食事の内容によらず、cGK-Tgマウスの方が低い値を示した(図10A-D)。

20

【0037】

[試験例4]

10週齢以降の野生型マウスおよびcGK-Tgマウス(各8匹)に熱量比で60%の高脂肪食(Research diet社、カタログ番号: D12492)をそれぞれ10週間与えた。24時間絶食後、ブドウ糖1.0g/kgを腹腔内に投与し、ブドウ糖投与前、投与後15分、30分、60分、120分における血糖値を測定した。

また、上記と同様に高脂肪食を与えたマウスを6時間絶食後、インスリン0.75U/kgを腹腔内に投与し、インスリン投与前、投与後15分、30分、60分、120分における血糖値を測定した。

30

血液は尾静脈より採取し、デキスターZII(バイエル社)を用いて血糖値を測定した。

【0038】

<結果>

cGK-Tgマウスの血糖値は、野生型マウスに比較して、ブドウ糖投与後およびインスリン投与後に有意に低い値を示した(図11および図12)。この結果は、cGK-Tgマウスにおいて耐糖能およびインスリン感受性が改善されていることを示唆する。

【0039】

[試験例5]

野生型マウスおよびcGK-Tgを10週齢まで通常食(F-2, 船橋農場)で飼育。10週齢から20週齢まで高脂肪食(60kcal% fat, D12492, Research Diet)で飼育した後、明期に自由摂食下で、ペントバルビタール麻酔下に解剖し、肩甲骨間褐色脂肪組織、大腿四頭筋組織、肝臓を摘出。直ちに液体窒素で凍結し、-80で保存した。凍結保存組織からRNeasy mini kit for lipid tissue(Qiagen)にてtotal RNAを抽出し、ExScript RT reagent kit(Takara BIO)にてcDNA化した。各遺伝子に特異的なプライマーセット(Takara BIO)とSyber Premix ExTaq(Takara BIO)を用いて、ABI7300 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)にて遺伝子発現を検討した。

40

50

cGK-Tgの肩甲骨間褐色脂肪組織では、熱産生を亢進させてエネルギー消費を高めるperoxisome proliferators-activated receptor co-activator (PGC)-1とuncoupling protein (UCP)-1の遺伝子発現が、野生型マウスの約3倍に亢進していた(図13)。cGK-Tgの骨格筋では、野生型と比較して、熱産生を亢進させてエネルギー消費を高める遺伝子群(PGC-1、UCP-3)の発現亢進に加えて、脂肪酸酸化を活性化させるPPARとPPARの遺伝子発現にも亢進が認められた(図14)。cGK-Tgの肝臓においても、野生型と比較して、PPAR遺伝子発現の亢進が認められた(図15)。以上より、GC-A系のエフェクター分子であるcGKの過剰発現による抗脂肪肝作用のメカニズムの少なくとも一部は、脂肪酸酸化の亢進を中心とした褐色脂肪組織、骨格筋、肝臓でのエネルギー消費の亢進によることが示唆された。

10

20

【0040】

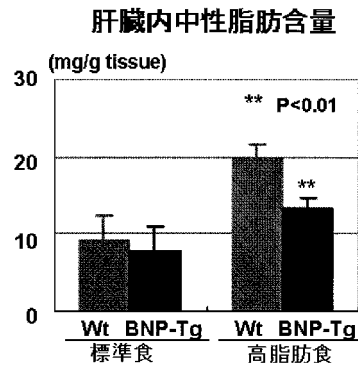
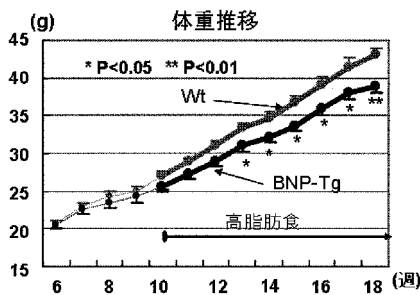
[試験例6]

野生型マウスおよびGC-Aヘテロノックアウトマウス(GC-A^{+/-})を8週齢まで通常食(F-2, 船橋農場)で飼育。8週齢から20週齢まで高脂肪食(45kcal% fat, D12451, Research Diet)で飼育し、20週齢にて明期に自由摂食下にて解剖した。

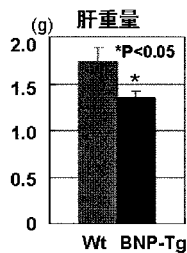
14週齢以降でGC-A^{+/-}マウスで野生型よりも有意に体重増加が亢進していた(図16)。20週齢ではGC-A^{+/-}マウスで、野生型マウスと比較して、体重は有意に大きく、肝臓重量体重比と肝臓中性脂肪含量には大きい傾向が認められた(図17)。総脂肪重量はGC-A^{+/-}マウスで、野生型よりも有意に増加していた(図18)。摂餌量には野生型マウスとGC-A^{+/-}マウスの間に差は認められなかった(図19)。また、高脂肪食による耐糖能の悪化は、GC-A^{+/-}マウスで野生型よりも増強していた(図20)。以上より、GC-A^{+/-}マウスでは高脂肪食による肥満、脂肪肝形成が野生型マウスよりも大きく、耐糖能障害の程度も大きいことが示された。

【図1】

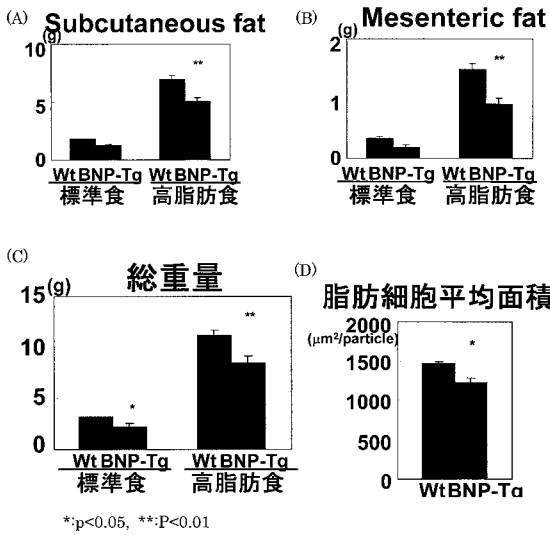
【図3】



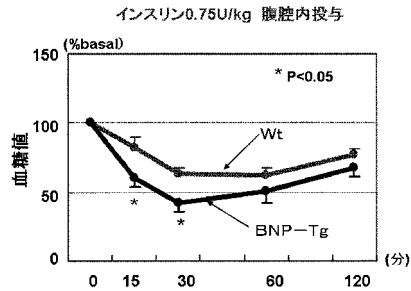
【図2】



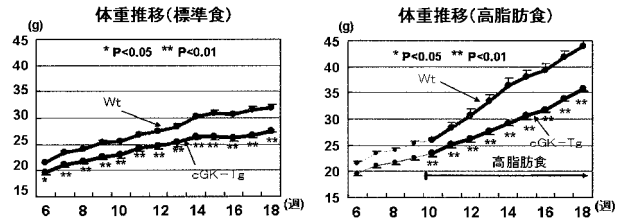
【 図 4 】



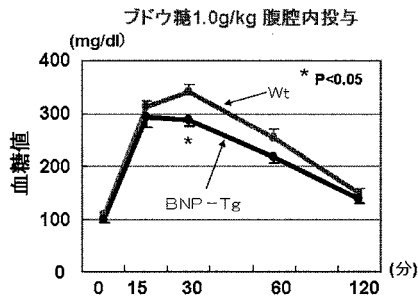
【 図 6 】



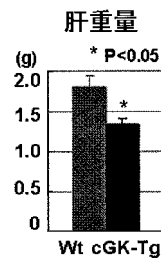
【 図 7 】



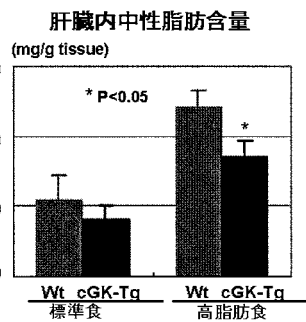
【 図 5 】



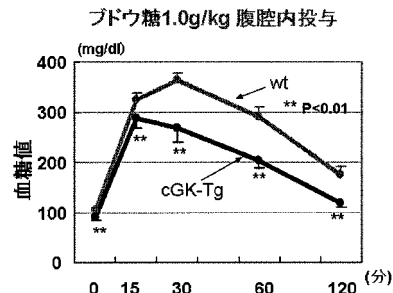
【 図 8 】



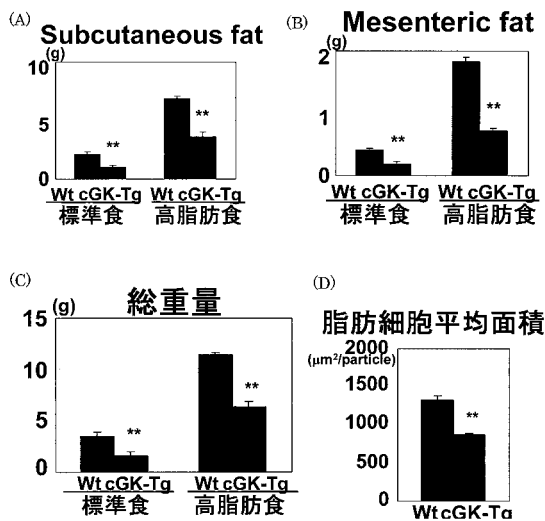
【 図 9 】



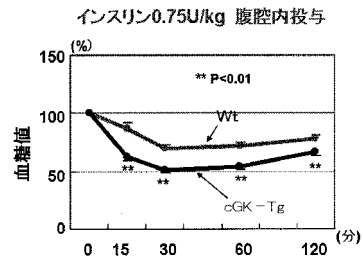
【 図 1 1 】



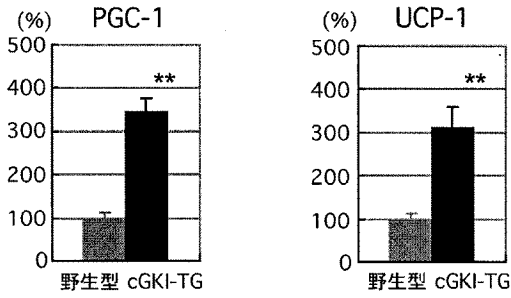
【 図 1 0 】



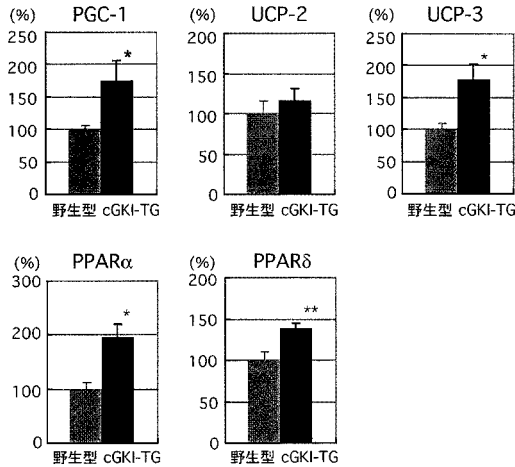
【 図 1 2 】



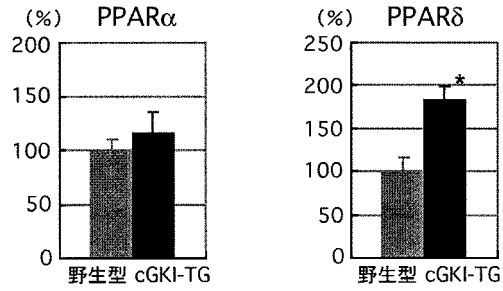
【 図 1 3 】



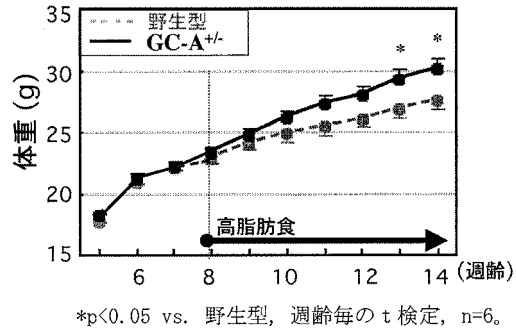
【 図 1 4 】



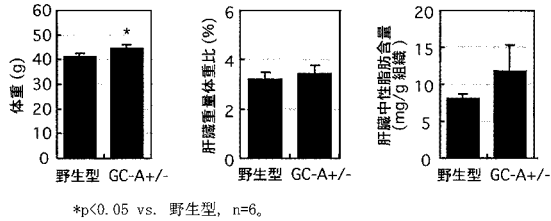
【 図 1 5 】



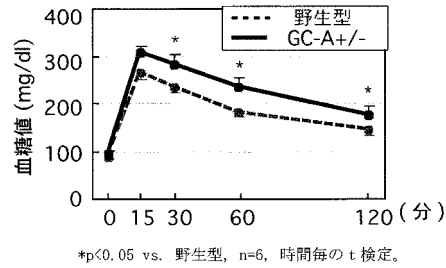
【 図 1 6 】



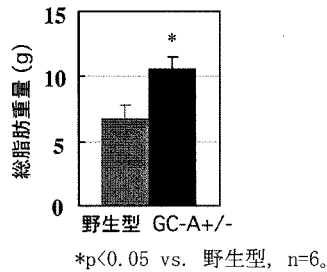
【 図 1 7 】



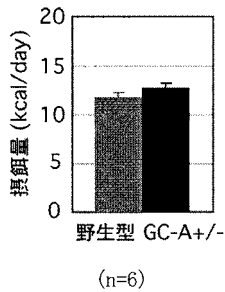
【 図 2 0 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2007/000996
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K45/00(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/08(2006.01)i, A61P3/12(2006.01)i, A61P7/10(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, A61K38/00, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/08, A61P3/12, A61P7/10 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 1996-2007 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), CA (STN), MEDLINE (STN), JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dessi-Fulgheri P. et al., Role of the natriuretic peptide system in lipogenesis/lipolysis. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. (2003), Vol. 13, p.244-249 (Abstract, page 246, left column)	16-19, 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, 44, 46-48, 50-52
Y	Koji ARAI, "Naibunpitsu Taishakei ni Taisuru Sayo Natriuretic Peptides and the endocrine system.", Japanese Journal of Clinical Medicine, (2004), Vol.62, Suppl.9, pages 76 to 79, page 77, '4. Natriuretic Peptide to Adipocytokine'	16-19, 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, 44, 46-48, 50-52
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 16 November, 2007 (16.11.07)		Date of mailing of the international search report 27 November, 2007 (27.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000996

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ichiro KISHIMOTO, "Natriuretic Peptide", Molecular Medicine (2005), Vol.42, No.1, pages 65 to 70, page 67, left column, 'Shibo Soshiki ni Okeru Natriuretic Peptide-kei no Igi', right column, 'Metabolic Syndrome ni Okeru Natriuretic Peptide-kei no Igi'	16-19,23, 25-27,29-31, 33-35,37-40, 44,46-48, 50-52
A	KHOO J.C. et al., Activation of hormone-sensitive lipase and phosphorylase kinase by purified cyclic GMP-dependent protein kinase. Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1977), Vol.74, No.11, p.4843-4847	16-19,23, 25-27,29-31, 33-35,37-40, 44,46-48, 50-52

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000996

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 1-14 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: The inventions as set forth in the above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 15, 20, 24, 28, 32, 36, 41, 45, 49 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: With regard to the terms "an agonist against a natriuretic peptide receptor GC-A" and "an activator of a cGMP-dependent proteinkinase I (cGKI)" cited in the inventions of claims 15, 20, 24, 28, 32, 36, 41, 45 and 49, it is quite (continued to extra sheet)</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This Authority regarded that the international application includes two or more groups of inventions as follows. 1st group of inventions: claims 16-19, a part of claim 23, claims 25-27, 29-31, 33-35, and 37-40, a part of claim 44, and claims 46-48 and 50-52; and 2nd group of inventions: parts of claims 21, 22 and 23, and parts of claims 42, 43 and 44. A technical feature common to the 1st group of inventions resides in a therapeutic agent comprising a natriuretic peptide as an active ingredient. A technical feature common to the 2nd group of inventions resides in a (continued to extra sheet)</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 16-19, a part of 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, a part of 44, 46-48, 50-52</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/000996

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

unclear as to what types of compounds are included within or what types of compounds are excluded from the scopes of these terms, since these terms are defined only by their functions. Therefore, these claims are remarkably unclear, and therefore it is impossible to make a meaningful international search.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

therapeutic agent comprising a gene for cGMP-dependent protein kinase (cGKI) as an active ingredient. These two active ingredients share no common part in chemical structure. Even if cGKI is one component involved in a signaling system starting with a natriuretic peptide *in vivo*, the technical feature cannot also be regarded as the corresponding technical feature, since cGKI itself cannot be activated only by natriuretic peptide. In the inventions of the present application which describes multiple chemical substances having no common chemical structure for known diseases, there is found no common special technical feature. Consequently, the above-stated two groups of inventions do not comply with the requirement of unity of invention, and therefore the present application includes two inventions.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 7 / 0 0 0 9 9 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, A61K38/00(2006.01)i, A61P1/16(2006.01)i, A61P3/04(2006.01)i, A61P3/06(2006.01)i, A61P3/08(2006.01)i, A61P3/12(2006.01)i, A61P7/10(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, A61K38/00, A61P1/16, A61P3/04, A61P3/06, A61P3/08, A61P3/12, A61P7/10			
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 1971-2007年 日本国実用新案登録公報 1996-2007年 日本国登録実用新案公報 1994-2007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) BIOSIS(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)			
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 請求の範囲の番号	
Y	Dessi-Fulgheri P. et al., Role of the natriuretic peptide system in lipogenesis/lipolysis. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. (2003), Vol. 13, p. 244-249 (Abstract、246 ページ左欄)	16-19, 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, 44, 46-48, 50-52	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> 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 16. 11. 2007		国際調査報告の発送日 27. 11. 2007	
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) 佐久 敬	4C 3037
		電話番号 03-3581-1101 内線	3452

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2007/000996
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 請求の範囲の番号
Y	荒井宏司, 「内分泌代謝系に対する作用 Natriuretic peptides and the endocrine system. 日本臨床, (2004), Vol.62, Suppl.9, p.76-79 第77ページの「4. ナトリウム利尿ペプチドとアディポサイトカイン」の部分	16-19, 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, 44, 46-48, 50-52
Y	岸本一郎, 「ナトリウム利尿ペプチド」, Molecular Medicine (2005), Vol.42, No.1, p.65-70 第67ページ左欄「脂肪組織におけるナトリウム利尿ペプチド系の意義」と同ページ右欄「メタボリックシンドロームにおけるナトリウム利尿ペプチド系の意義」	16-19, 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, 44, 46-48, 50-52
A	KHOO J.C. et al., Activation of hormone-sensitive lipase and phosphorylase kinase by purified cyclic GMP-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977), Vol. 74, No. 11, p. 4843-4847	16-19, 23, 25-27, 29-31, 33-35, 37-40, 44, 46-48, 50-52

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2007/000996

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1-14 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、当該請求の範囲に係る発明は、ヒトの身体の治療による処置方法に係るものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求の範囲 15, 20, 24, 28, 32, 36, 41, 45, 49 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、請求の範囲15, 20, 24, 28, 32, 36, 41, 45, 49に係る発明の「ナトリウム利尿ペプチド受容体GC-Aのアゴニスト」及び「cGMP依存性プロテインカイネースI(cGKI)の活性化剤」について、このような機能的な記載のみでは、具体的にどのような化合物が包含され、どのような化合物が包含されないのかが全く不明であるから、前記請求の範囲の記載は著しく不明確であり、有意義な国際調査をすることができない。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

第1群：請求の範囲 16-19、23の一部、25-27、29-31、33-35、37-40、44の一部、46-48、50-52

第2群：請求の範囲 21、22、23の一部、42、43、44の一部

上記第1群に属する発明に共通する技術的特徴は、ナトリウム利尿ペプチドを有効成分とする治療剤に関するものであり、上記第2群に属する発明に共通する技術的特徴は、cGMP依存性プロテインカイネース(cGKI)の遺伝子を有効成分とする治療剤に関するものである。これら2つの有効成分は互いに化学構造において共通する部分は存在しない。仮に、生体内において、ナトリウム利尿ペプチドから始まるシグナル伝達系の中に含まれる一成分がcGKIであったとしても、そもそもcGKI自体はナトリウム利尿ペプチドのみによって活性化されるものではないため、対応する技術的特徴とも認められない。故に、公知の疾患について化学構造の共通しない複数の化学物質が記載された本願発明については、共通する特別な技術的特徴が見出せない。したがって、上記2群に属する発明は互いに単一性を満たしていないから、発明の数は2である。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲 16-19、23の一部、25-27、29-31、33-35、37-40、44の一部、46-48、50-52

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2007年4月）

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 3/10 (2006.01)		A 6 1 P 3/10	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)		A 6 1 K 37/24	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100117156

弁理士 村田 正樹

(74) 代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(72) 発明者 中尾 一和

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

(72) 発明者 伊藤 裕

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

(72) 発明者 宮下 和季

京都府京都市左京区聖護院川原町 5 4 国立大学法人京都大学医学部附属病院内

(72) 発明者 園山 拓洋

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

(72) 発明者 田村 尚久

京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内

F ターム (参考) 4C084 AA02 AA17 BA44 CA25 CA53 DB02 MA52 NA14 ZA592 ZA702
ZA752 ZC332 ZC352

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。