

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 7 月 20 日 (20.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/075642 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 31/198 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01) A61P 11/16 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

(74) 代理人: 熊倉 禎男, 外(KUMAKURA, Yoshio et al.);
〒1008355 東京都千代田区丸の内 3 丁目 3 番 1 号 新
東京ビル 中村合同特許法律事務所 Tokyo (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/300256

(22) 国際出願日: 2006 年 1 月 12 日 (12.01.2006)

(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2005-005416 2005 年 1 月 12 日 (12.01.2005) JP

(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, 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 (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株
式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315
東京都中央区京橋 1 丁目 1 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福地 直之
(FUKUCHI, Naoyuki) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県
川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素株式会社内
Kanagawa (JP). 大貫 朗子 (OONUKI, Akiko) [JP/JP]; 〒
2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素
株式会社内 Kanagawa (JP). 山本 浩史 (YAMAMOTO,
Hiroshi) [JP/JP]; 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴
木町 1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: HYPOXIA RESPONSE ENHANCING AGENT

(54) 発明の名称: 低酸素応答亢進剤

(57) Abstract: A hypoxia response enhancing agent comprising arginine as an active ingredient; and a therapeutic agent for diseases accompanied by ischemia or hypoxia condition, comprising the hypoxia response enhancing agent. This hypoxia response enhancing agent can enhance the activity of HIF-1 being a hypoxia inducing factor, thereby realizing an enhancement of hypoxia response.

(57) 要約: 有効成分としてアルギニン含有する低酸素応答亢進剤、及び該低酸素応答亢進剤含有する虚血あ
るいは低酸素状態を伴って生じる疾患の治療薬を提供する。この低酸素応答亢進剤は、低酸素誘導因子である HIF-1
の作用を亢進させ、低酸素応答を亢進させることができる。

WO 2006/075642 A1

明 細 書

低酸素応答亢進剤

技術分野

[0001] 本発明は、低酸素応答亢進剤、及びこれを含有する医薬組成物に関し、特に医薬品および食品の形態で、或は食品に含まれた形態でこの薬剤を好適に使用することが出来る。

[0002] (発明の背景)

HIF-1 (hypoxia inducible factor-1) は120KDaのサブユニットHIF-1 α と、91~94KDaのサブユニットHIF-1 β よりなる蛋白質であり(非特許文献1)、低酸素で発現が誘導されるDNAエレメント、HRE (hypoxia-response element) に結合し、低酸素下での遺伝子発現を誘導する。

このうちHIF-1 α は低酸素に応答し、酸素存在下においてはユビキチン化、さらにはプロテオソームにおいて分解されることにより、その活性を失う。すなわち、低酸素下ではHIF-1を転写制御因子とする蛋白質の生合成は活発に行われる、酸素濃度が上昇した状況において、HIF-1 α は分解を受け、HIF-1を転写促進因子とする蛋白質の生合成は低下する。HIF-1を転写促進因子とする蛋白質としては、エリスロポエチン、VEGF (vascular endothelial cell growth factor)をはじめ、ドーパミン生合成を制御するチロシンヒドロキシラーゼ、解糖系に関わるホスホフルクトキナーゼ、ホスホグリセロリン酸キナーゼI、乳酸脱水素酵素A、アルドラーゼA、エノラーゼI、あるいはグルコース輸送担体 (Glut-1)、ヘムオキシゲナーゼ1、トランスフェリン、誘導型一酸化窒素合成酵素などが知られている(非特許文献2及び3)。

HIF-1の活性を亢進する薬剤は、HIF-1を転写制御因子とする蛋白質の生合成を亢進するが、例えばIvanらはHIF-1 α の安定化を特徴とする化合物を見出し(非特許文献4)、その化合物がエリスロポエチンの生合成を亢進することを報告し、貧血治療に効果があること示唆している(非特許文献5)。

アルギニンは、エリスロポエチンの産生メカニズムに関与することが報告されている(非特許文献6及び7)が、低酸素誘導因子であるHIF-1との関係はこれまで知られておらず、さらにアルギニンが虚血あるいは低酸素状態を伴って生じる疾患、例えば腎

不全、心筋梗塞、心不全、脳梗塞、糖尿病性血管障害、閉塞性動脈硬化症大腸炎、潰瘍、脊髄障害、視神経障害、神経障害等に対して有効であるかは全く明らかにされておらず、このような病態の治療を考えた場合その解明が必要とされていた。

[0003] 非特許文献1:G. L. Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 5510-5514 (1995)

非特許文献2:永尾ら、蛋白質核酸酵素、Vol.41、No.16、p2522-2531 (1996)

非特許文献3:十川(Sogawa)ら、蛋白質核酸酵素、Vol.44、No.15、p2472-2477 (1999)

非特許文献4:M. Ivan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 13459-13464 (2002)

非特許文献5:Q. Wang et al., J Am Soc Nephrol. 2004; Oct 15: 773A

非特許文献6:S. Imagawa et. Al., blood, 96, 1716-1722 (2000)

非特許文献7:S. Imagawa et al., Kidney Int., 61, 396-404 (2002)

発明の開示

[0004] 本発明は、低酸素誘導因子であるHIF-1に対して作用を亢進させ、低酸素応答を亢進させる低酸素応答亢進剤を提供することを目的とする。

本発明は、又、虚血あるいは低酸素状態を伴って生じる疾患の治療薬を提供することを目的とする。

さらに本発明は、上記亢進剤を含有する食品及びHIF-1作用亢進剤を提供することを目的とする。

[0005] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、アルギニンの低下がHIF-1 α の不安定化を引き起こし、アルギニンの添加によってHIF-1 α の安定性が回復する現象を見出し、本発明の完成に至った。

すなわち、本発明は、有効成分としてアルギニンを含有することを特徴とする低酸素応答亢進剤を提供する。

本発明は、又、低酸素応答亢進剤を含有することを特徴とする虚血あるいは低酸素状態を伴って生じる疾患の治療薬を提供する。

本発明は、又、アルギニンを含有し、低酸素応答亢進作用を有する旨の表示をしたパッケージに包装されてなることを特徴とする食品を提供する。

本発明は、又、有効成分としてアルギニンを含有することを特徴とするHIF-1作用亢

進剤を提供する。

発明を実施するための最良の形態

[0006] 本発明のアルギニンを有効成分とする薬剤は、その薬剤に含有されるアルギニンの実質の効果が発現されれば良く、アルギニンの含量率は100%～0.1質量%(以下、%と略称する)であるのが良く、好ましくは100%～5%である。また、薬剤中のアルギニンの含量は0.001～20gであるのがよく、好ましくは0.1～10gである。

本発明の薬剤に有効成分として含まれるアルギニンは、そのままの形でも良いが様々な塩でも良い。又、生体反応でアルギニンに変換される化合物を用いても良い。塩の例としては蟻酸、酢酸、プロピオン酸、クエン酸、マロン酸、リンゴ酸のような有機酸、塩酸、硫酸、硝酸のような無機酸、あるいは種々のアミン、金属塩等が挙げられる。またL-体、D-体、DL-体いずれの形でも良いが、好ましくはL-体、DL-体がある。

生体内の反応でアルギニンに変換される化合物としては、例えば、シトルリン、オルニチン、アルギノコハク酸あるいはアルギニンを含むペプチド等が挙げられるが、これら以外でも想定される代謝酵素による1～5段階の反応でアルギニンへと変換される化合物、プロテアーゼ、エステラーゼ、トランスフェラーゼ等でアルギニンを生じる化合物等も含まれる。

[0007] 本発明の薬剤の特徴である低酸素応答の亢進とは、生体内で虚血あるいは低酸素状態(例えば、酸素濃度20vol%以下、好ましくは10%以下)において行われる反応の亢進を指し、具体的にはVEGF(vascular endothelial cell growth factor)をはじめ、ドーパミン生合成を制御するチロシンヒドロキシラーゼ、解糖系に関わるホスホフルクトキナーゼ、ホスホグリセロリン酸キナーゼI、乳酸脱水素酵素A、アルドラーゼA、エノラーゼI、あるいはグルコース輸送担体(Glut-1)、ヘムオキシゲナーゼ1、トランスフェリン、誘導型一酸化窒素合成酵素等、低酸素で誘導される蛋白質の発現亢進等が挙げられる。

本発明の薬剤を用いた治療対象とする虚血あるいは低酸素状態を伴って生じる疾患とは、疾患部位に何らかの虚血あるいは低酸素状態が生じる疾患を指し、例えば、腎不全、心筋梗塞、心不全、脳梗塞、糖尿病性血管障害、閉塞性動脈硬化症大腸炎、潰瘍、脊髄障害、視神経障害、神経障害などが挙げられるが、その他の疾患で

も良い。

本発明のHIF-1の作用を亢進することを特徴とする薬剤とは、生体内においてHIF-1、より具体的にはHIF-1のその病態が関与する蛋白質をコードする遺伝子の発現を実質的に亢進する薬剤を指す。

[0008] さらに、アルギニンによるHIF-1作用の亢進を介したエリスロポエチンの産生の上昇作用を見出したことから、アルギニンを含む、上記疾患に対する治療薬として、同じメカニズムであるHIF-1の作用を亢進しない薬剤と併用することができる。又は、同じHIF-1作用の亢進であっても、作用が相加的に発現する可能性があることから、アルギニンを含む、上記疾患に対する治療薬として、同じメカニズムであるHIF-1の作用を亢進する薬剤と併用することができる。

このような他の薬剤と共に用いる方法としては、腎不全、心筋梗塞、心不全、脳梗塞、糖尿病性血管障害、閉塞性動脈硬化症大腸炎、潰瘍、脊髄障害、視神経障害、神経障害等の虚血を伴って生じる疾患に対する単一あるいは複数の薬剤と同時に使用する方法が挙げられ、その薬剤がHIF-1の作用を亢進しない薬剤であることがより好ましいが、その薬剤がHIF-1の作用を亢進する薬剤であっても良い。

本発明の薬剤を医薬品として使用する場合、その製剤の形は注射剤、液剤、シロップ剤錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤、クリーム剤、軟膏剤、座剤などいかなる形態でも良く、乳糖、ブドウ糖、澱粉、炭酸カルシウム、ゼラチン、セルロース、ヒドロキシメチルセルロース、等の可能なあらゆる担体、水、エタノール、オリーブ油等の可能なあらゆる溶剤、界面活性剤、安定化剤等の薬学的に可能ないかなる成分、甘味料等の調味料、香料、着色剤等を含んでいても良い。

また本発明の食品は溶液、粉末、固体のいかなる形態でも良く、食品として使用可能ないかなる担体、溶剤、界面活性剤、安定化剤、甘味料、調味料、香料、着色剤等を含んでいても良い。また他の食品、飲料品と混合していても良い。

以下実施例により本発明をさらに詳細に説明する。なお、以下の実施例は、本発明を説明するものであって、本発明をこれに限定するものではない。

実施例

[0009] 実施例1 Hep3B細胞を用いたアルギニンのエリスロポエチン(EPO)分泌亢進作用

ヒト胎児肝細胞株Hep3Bを用い、培地中のアルギニン(Arg)濃度の変化によるエリスロポエチン産生量の変化を測定した。実験時に用いた培地は、D-MEM培地組成を元に、アミノ酸を一切含まない培地(Zero培地)、20種類の全アミノ酸を表1に示される量で含有する培地(Full培地)、及びFull培地からアルギニンのみを除いたアルギニン欠乏培地(Δ Arg培地)を用いた。

[0010] 表1 Full培地中のアミノ酸組成

Glycine	0.4mM	L-Valine	0.8mM
L-Alanine	0.4mM	L-Leucine	0.8mM
L-Serine	0.4mM	L-Isoleucine	0.8mM
L-Threonine	0.8mM	L-Phenylalanine	0.4mM
L-Cystine	0.2mM	L-Tyrosine	0.4mM
L-Methionine	0.2mM	L-Tryptophan	0.08mM
L-Glutamine	4 mM	L-Lysine	0.8mM
L-Asparagine	0.4mM	L-Arginine	0.4mM
L-Glutamic Acid	0.4mM	L-Histidine	0.2mM
L-Aspartic acid	0.4mM	L-Proline	0.4mM

[0011] Hep3B細胞を96ウェル培養シャーレに 5×10^4 cells/wellで播種し、24時間培養後Zero培地で1回洗浄した後、アルギニンを最終濃度0~400uM添加した Δ Arg培地で、通常酸素下(normoxia、21%O₂)及び低酸素下(hypoxia、3%O₂)で24時間培養を行なった。培養終了後、培地中に含まれているエリスロポエチン量をEPO ELISA kit (R&D社、1693417)にて定量を行なった。実験はN=2で行なった。

エリスロポエチンの分泌量は、通常酸素下(酸素濃度21vol%)ではアルギニン欠乏では全く分泌されないが、アルギニン添加により濃度依存的に分泌量が増加することが認められ、200uMの添加でほぼ最大値を示した(図1)。また、低酸素下でのエリスロポエチン分泌量はアルギニン欠乏でも通常酸素下に比べ高い値であったが、アルギニン50uMの添加で更に増加し、50uMの添加で最大値を示すことが確認された(図1)。

[0012] 実施例2 Hep3B細胞を用いたアルギニンのエリスロポエチンプロモーター活性に対する作用(野生型HIF結合領域:WT、変異型HIF結合領域: Δ HIFに対する作用)

実施例1において示されたように、アルギニンは通常酸素下ではエリスロポエチン(EPO)産生に必要な成分であるが、EPO遺伝子の発現制御に関与する酸素感受性

転写因子であるHIF-1の関与が示唆された。HIF-1は、EPO遺伝子下流に位置するエンハンサー領域に結合サイトが存在することが知られており、HIF-1の関与を検討するために、EPOプロモーター領域及びエンハンサー領域をもつレポーターアッセイ系を構築し、EPOプロモーター活性でアルギニンの効果とHIF-1の関与を検討した。

野生型(WT)EPOレポーターベクターの構築は、下記のように行った。Human Genomic DNA (Roche、1691112)より、制限酵素SalI及びHindIIIサイトを導入したEPO遺伝子のプロモーター領域(転写開始点の-118～+26)と、制限酵素BamHI及びSalIサイトを導入したエンハンサー領域(ポリA付加シグナルの下流120～245bp)をそれぞれ配列表1と2、3と4に示したプライマーを用い、PCR法でクローニングを行った。

- [0013] 得られた2つのプロモーター領域及びエンハンサー領域を増幅したPCR断片を、ルシフェラーゼレポーターベクターpGL3-Enhancer (Promega、E1771)のBglIII-HindIIIサイトに3者ライゲーションで導入し、EPO遺伝子のプロモーター領域とその上流にエンハンサー領域をもつ野生型(WT)EPOレポーターベクターを構築した。

また、HIF-1が結合できない変異型(Δ HIF)EPOレポーターベクターの構築は、下記のように行った。野生型(WT)EPOレポーターベクターを元に配列表5および6に示したプライマーを用いて、エンハンサー領域に存在するHIF-1結合領域(TACGTGCT)にQuikChange Site-Directed Mutagenesis kit (:STRATAGENE 200517-5)を用いて2箇所変異(TACTTGCG)を導入し、HIF-1が結合できない変異型(Δ HIF)EPOレポーターベクターを構築した。

さらにコントロールとして用いるための、野生型(WT/Enh)SV40レポーターベクター及び変異型(Δ HIF/Enh)SV40レポーターベクターの構築は下記のように行った。細胞内で恒常的に発現するSV40プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子が導入されているレポーターベクターpGL3-Cont.(Promega、E1741)のSalI-BamHIサイトに、クローニングした野生型EPOエンハンサー領域及び変異型(Δ HIF)エンハンサー領域を導入し、野生型(WT/Enh)SV40レポーターベクター及び変異型(Δ HIF/Enh)SV40レポーターベクターを構築した。

- [0014] Hep3B細胞を96ウェル培養シャーレに 5×10^4 cells/wellで播種し、6時間培養後、各レポーターベクター(プラスミド溶液1mg/ml)を含むトランスフェクション溶液に置換

(100ul/well)し、遺伝子導入する。トランスフェクションにはFugene6 (Roche)を用い、培地1mlに対し、OPTI-MEM 50ulにFugene6 1.8ulを加え、混合し、室温で5分静置する。その後プラスミド溶液を1.2ug (1mg/ml)を加え混合し、室温で20分静置した溶液に、培地を1ml加えた溶液をトランスフェクション溶液として用いた。

遺伝子導入18時間後に1×Zero培地で1回洗浄を行い、アルギニンを最終濃度0uM～300uM添加したΔ Arg培地で、通常酸素下 (normoxia、21%O₂) 及び低酸素下 (hypoxia、3%O₂) で24時間培養を行なった。培養終了後、Dual-GloLuciferase Assay kit (Promega、E2920)でルシフェラーゼ活性を測定した。実験はN=3で行なった。

その結果、レポーターアッセイにおいても、EPO蛋白発現量と同様に通常酸素下ではアルギニンの添加により濃度依存的にEPOプロモーター活性が増加すること、また低酸素下ではアルギニン50uMで最大値を示した(図2)。しかし、HIF-1が結合できない変異型レポーターベクターを用いた評価では、アルギニン濃度依存的なEPOプロモーター活性の増加は見られなかった(図3)。更に、恒常的に発現するSV40プロモーターにHIF-1結合領域を含むEPOのエンハンサー領域を導入すると、アルギニン濃度依存的にプロモーター活性が上昇すること、及び変異型(Δ HIF)エンハンサー領域を導入するとアルギニン存在下でもプロモーター活性が上昇しないことが確認され、アルギニンはHIF-1結合領域を含むエンハンサー領域に作用し、遺伝子発現を増加することが確認された(図4)。

[0015] 実施例3 Hep3B細胞を用いたアルギニンのHIF-1 α に対する作用

低酸素感受性因子であるHIF-1は、HIF-1 α とHIF-1 β (Arnt) のヘテロダイマーから成り、HIF-1 α が通常酸素下ではユビキチン/プロテアソーム系で分解されること、及び低酸素下ではその分解が抑制され安定化したHIF-1 α が核内へ移行し転写促進に働くことが知られている。よってアルギニン添加によるHIF-1を介したエリスロポエチン増加は、HIF-1 α の安定化に関与している可能性があり、アルギニン添加とHIF-1 α 蛋白量について検討を行った。

Hep3B細胞を6ウエル培養シャーレに 9×10^5 cells/wellで播種し、24時間培養後、Zero培地で1回洗浄を行い、20種類のアミノ酸を含むFull培地及びΔ Arg培地で通常酸素下 (normoxia、21%O₂) 及び低酸素下 (hypoxia、3%O₂) で24時間培養を行なった。

培養終了後、cold PBSで1回洗浄後、氷上に5分静置した後、RIPA Buffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 50mM Tris.HCl pH 7.4, 0.1% SDS, 50mM β -glycerophosphate, 25mM NaF, 20mM EGTA, 1mM DTT, 1mM Na_2VO_3 , Protease Inhibitor cocktail (ナカライテスク, 25955-11))で細胞粗抽出液を回収した。回収した細胞粗抽出液を15000 rpm 10分遠心した上清の蛋白定量を行ない、各サンプルの総蛋白量20ugを6~13%のSDS-PAGEで分画し、PVDFメンブレンにトランスファーした後、抗HIF-1 α 抗体 (Becton Dickinson社, 610958)を用いたWestern法によりHIF-1 α 蛋白の検出を行った。

- [0016] その結果、通常酸素下のFull培地ではHIF-1 α 蛋白が検出されたが、アルギニン欠乏培地である Δ Arg培地ではHIF-1 α 蛋白は消失し、アルギニン100uM添加でHIF-1 α 蛋白が検出された。一方、低酸素下では、Full培地及び Δ Arg培地共に安定化したHIF-1 α 蛋白が同等に検出された。よって通常酸素下では、アルギニンはHIF-1 α 蛋白の安定化に必須で、アルギニンの欠乏でHIF-1 α 蛋白が不安定化し、消失することが確認された。

すなわち、本発明では、通常酸素下においてはアルギニン単独添加で、その濃度依存的にエリスロポエチンの分泌上昇を誘導する作用が見られた。また、この作用は低酸素感受性因子であるHIF-1を介していることが示され、アルギニンの低下がHIF-1 α 蛋白の不安定化を引き起こすこと、及びアルギニンの添加によってHIF-1 α 蛋白の安定性が回復することが示された。

図面の簡単な説明

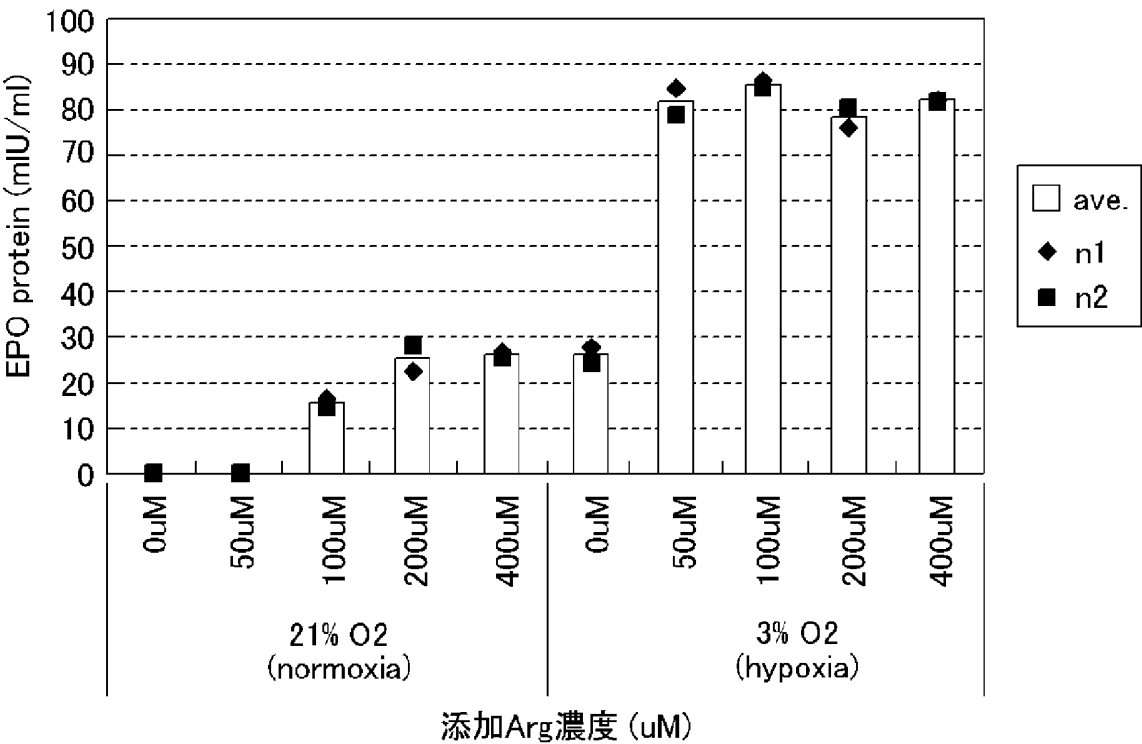
- [0017] [図1]EPO発現におけるアルギニンの影響を示す。
[図2]EPOプロモーター活性におけるアルギニンの影響を示す。
[図3]HIF-1結合部位におけるアルギニンの影響を示す (EPOプロモーター活性) (3-1:21% O₂下 (normoxia); 3-2:3% O₂下 (hypoxia))。
[図4]HIF-1結合部位におけるアルギニンの影響を示す (SV40プロモーター活性) (4-1:21% O₂下 (normoxia); 4-2:3% O₂下 (hypoxia))。
[図5]HIF-1 α 蛋白質に対するアルギニンの影響を示す。

請求の範囲

- [1] 有効成分としてアルギニンを含有することを特徴とする低酸素応答亢進剤。
- [2] エリスロポエチンの分泌を亢進する請求項1記載の低酸素応答亢進剤。
- [3] HIF-1の作用を亢進する請求項1又は2記載の低酸素応答亢進剤。
- [4] HIF-1 α の作用を亢進する請求項1又は2記載の低酸素応答亢進剤。
- [5] 通常酸素下で亢進する請求項2～4にいずれか1項記載の低酸素応答亢進剤。
- [6] 請求項1～4のいずれか1項記載の低酸素応答亢進剤を含有することを特徴とする虚血あるいは低酸素状態を伴って生じる疾患の治療薬。
- [7] 虚血あるいは低酸素状態を伴って生じる疾患が、腎不全、心筋梗塞、心不全、脳梗塞、糖尿病性血管障害、閉塞性動脈硬化症大腸炎、潰瘍、脊髄障害、視神経障害又は神経障害である請求項6記載の治療薬。
- [8] アルギニンを含有し、低酸素応答亢進作用を有する旨の表示をしたパッケージに包装されてなることを特徴とする食品。
- [9] 有効成分としてアルギニンを含有することを特徴とするHIF-1作用亢進剤。
- [10] HIF-1 α の作用を亢進する請求項9記載のHIF-1作用亢進剤。

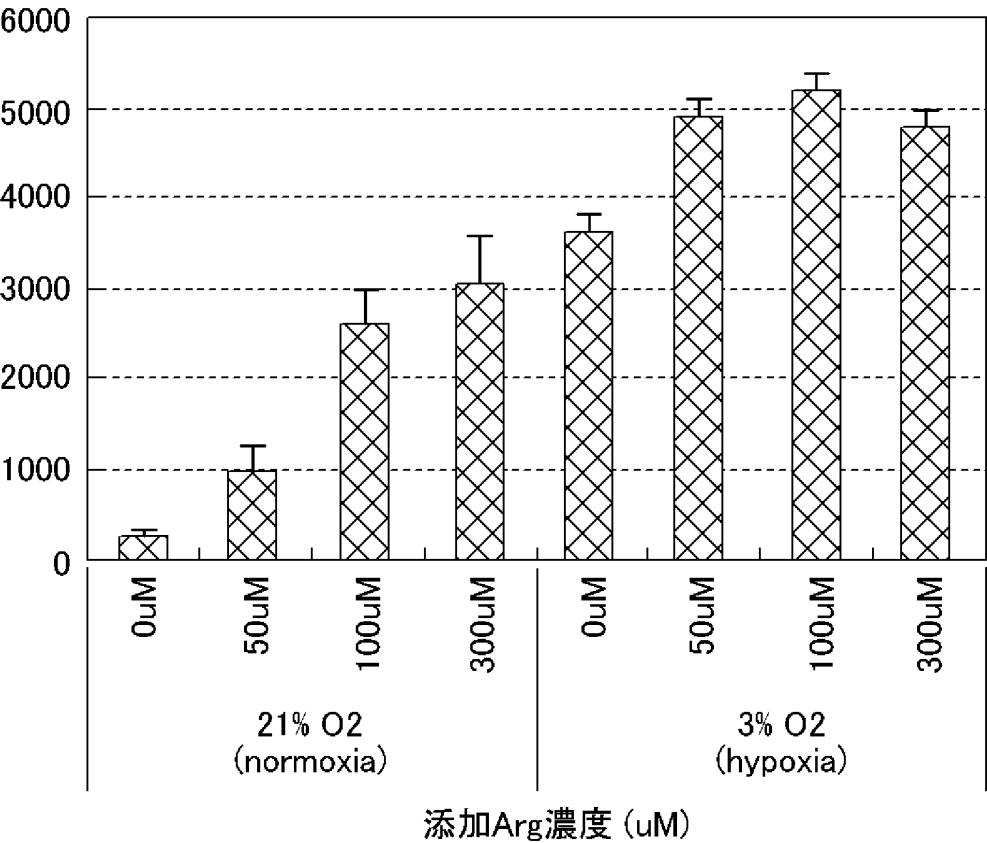
[図1]

FIG. 1



[図2]

FIG. 2



[図3]

FIG. 3-1

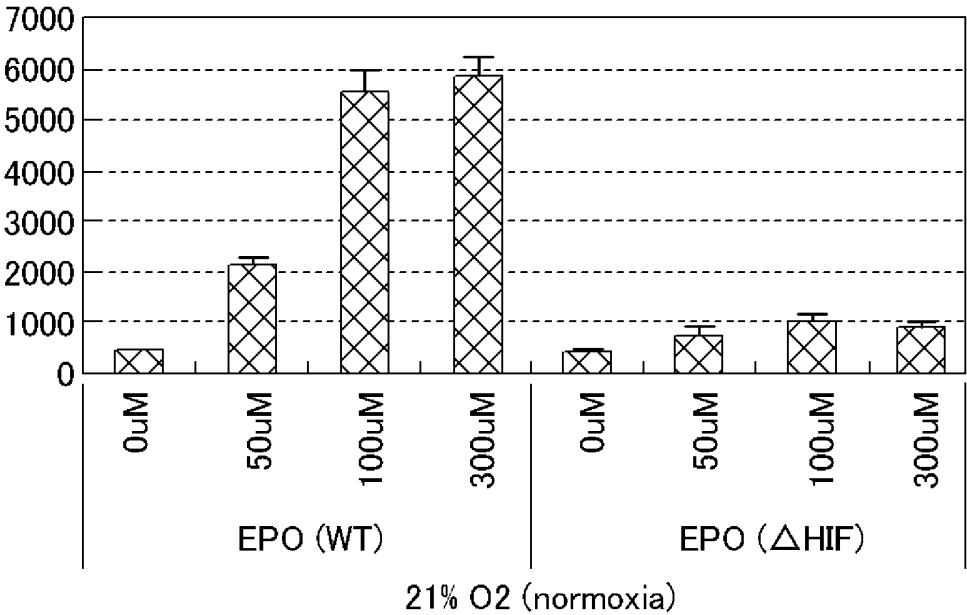
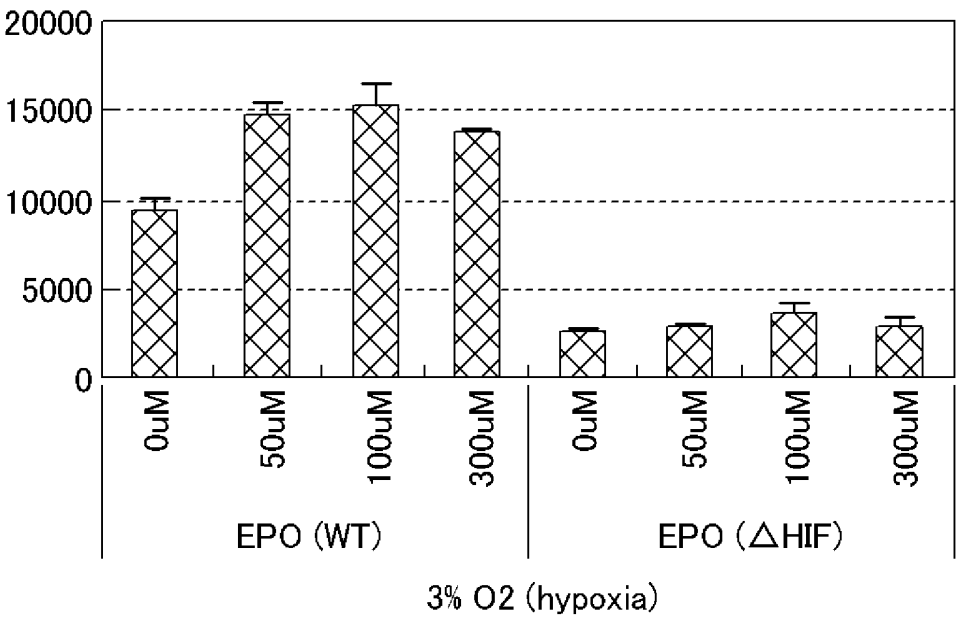


FIG. 3-2



[図4]

FIG. 4-1

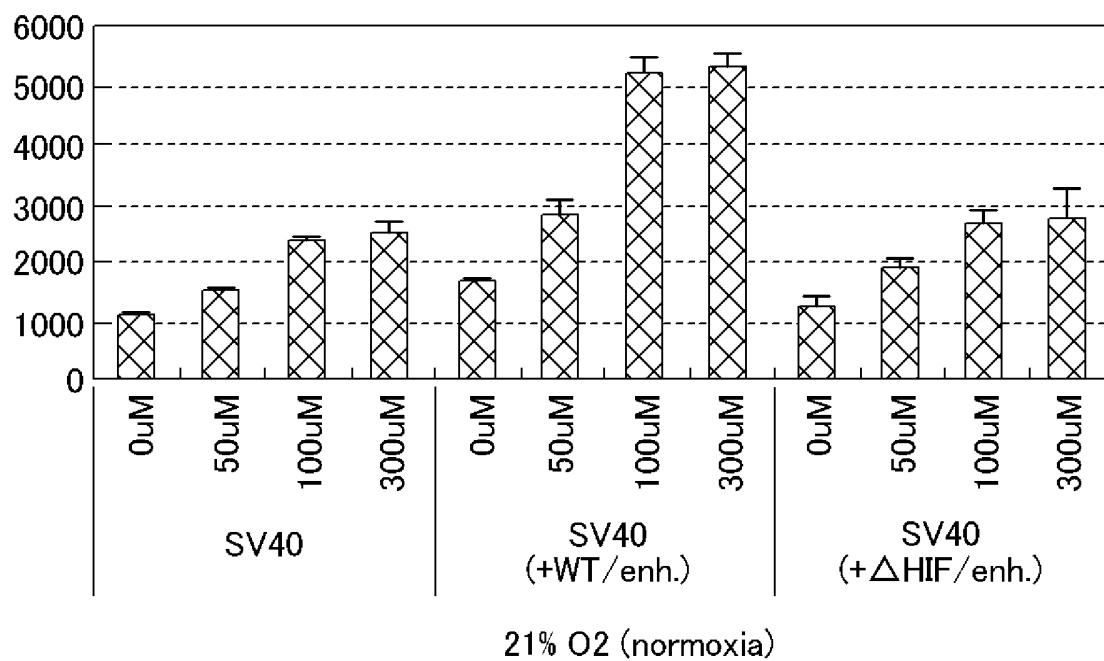
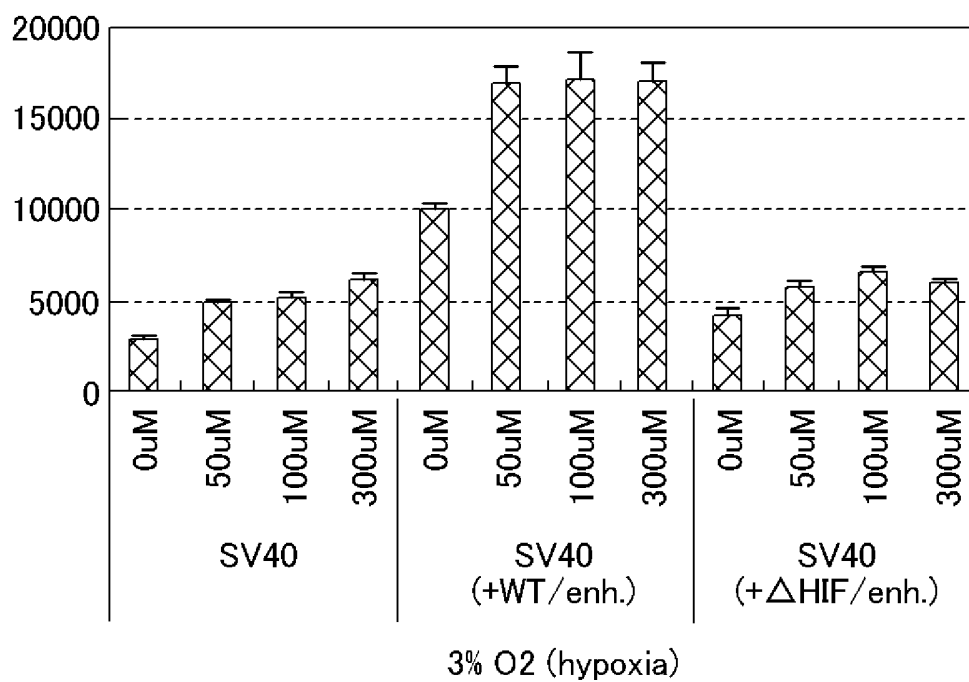
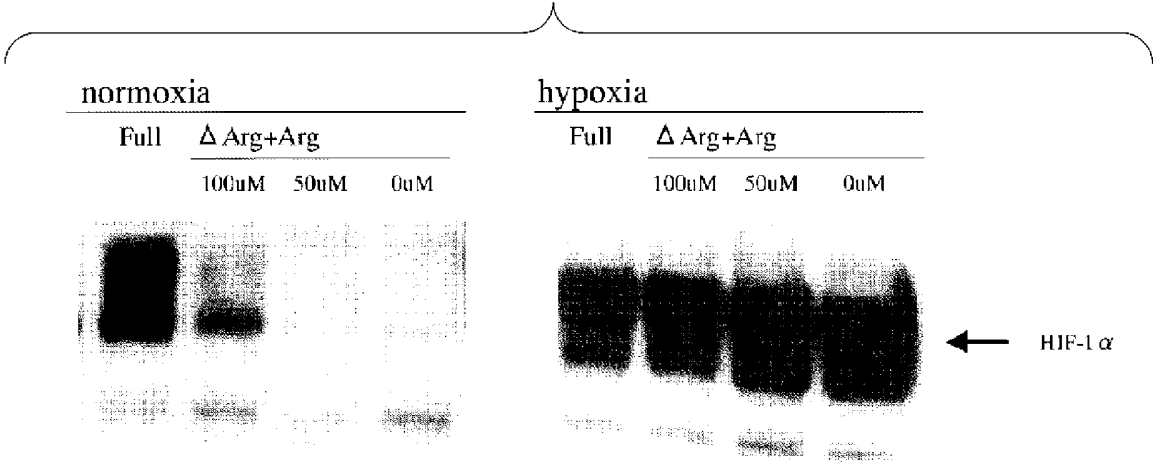


FIG. 4-2



[図5]

FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300256

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/198 (2006.01), **A23L1/305** (2006.01), **A61P1/00** (2006.01), **A61P1/04** (2006.01), **A61P3/10** (2006.01), **A61P9/10** (2006.01), **A61P11/16** (2006.01), **A61P13/12** (2006.01), **A61P25/00** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01)

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)

A23L1/305, A61K31/198, A61P1/00, A61P1/04, A61P3/10, A61P9/10, A61P11/16, A61P13/12, A61P25/00, C12N15/09

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	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

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

BIOSIS (STN), CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Shigehiko IMAGAWA et al., "L-arginine ni yoru Jinsei Hinketsu no Shinki Chiryo", Igaku no Ayumi, Vol.211, No.8, 2004, pages 839, 840	1-9 10
X Y	Shigehiko IMAGAWA et al., "NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) no GATA-2 Sokushin ni yoru Epo Sansei Teika wa L-arginine ni yori Kaizen suru", Igaku no Ayumi, Vol.196, No.3, 2001, pages 229, 230	1-8 9, 10
X Y	Taylor, B.E. et al., Nitric Oxide Mediates Metabolism as Well as Respiratory and Cardiac Responses to Hypoxia in the Snail <i>Lymnaea stagnails</i> , Journal of Experimental Zoology, Vol.295A, 2003, pages 37 to 46, particularly, Figs. 1, 4	1-8 9, 10

☒ 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
10 February, 2006 (10.02.06)

Date of mailing of the international search report
21 February, 2006 (21.02.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/300256

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Shigehiko IMAGAWA et al., "Erythropoietin to	1-10
Y	Teisanso Otokei", Vol.44, No.15, 1999, pages 2478 to 2484	9,10
Y	Masaya NAGAO et al., "Sanso ni yoru Idenshi Hatsugen Seigyo", Protein, nucleic acid and enzyme, Vol.41, No.16, 1996, pages 2522 to 2531	9,10
X	JP 2004-147630 A (Yugen Kaisha JNP Kenkyusho), 27 May, 2004 (27.05.04), Particularly, Claims; page 2, lines 43 to 49 (Family: none)	1-10
X	JP 2002-534360 A (Nitrosystems, Inc.), 15 October, 2002 (15.10.02), Particularly, Claims; page 10, line 26 to page 11, line 23 & WO 2000/040086 A1 & EP 1139753 A1	1-10
X	JP 2003-532622 A (HENRY FORD HEALTH SYSTEM), 05 November, 2003 (05.11.03), Particularly, Claims; page 3, lines 3 to 12; page 5, line 4 to page 6, line 4 & WO 2000/076318 A1 & EP 1233670 A1	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/198 (2006.01), A23L1/305 (2006.01), A61P1/00 (2006.01), A61P1/04 (2006.01), A61P3/10 (2006.01), A61P9/10 (2006.01), A61P11/16 (2006.01), A61P13/12 (2006.01), A61P25/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)

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 (I P C))

Int.Cl. A23L 1/305, A61K 31/198, A61P 1/00, A61P 1/04, A61P 3/10, A61P 9/10, A61P 11/16, A61P 13/12, A61P 25/00, C12N 15/09

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	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006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), C Aplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

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
X Y	今川重彦他, L-アルギニンによる腎性貧血の新規治療, 医学のあゆみ, Vol. 211, No. 8, 2004, p. 839, 840	1-9 10
X Y	今川重彦他, NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) の GATA-2 促進による Epo 産生低下は L-arginine により改善する, 医学のあゆみ, Vol. 196, No. 3, 2001, p. 229, 230	1-8 9, 10

☒ 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

10.02.2006

国際調査報告の発送日

21.02.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / 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)

上條 のぶよ

電話番号 03-3581-1101 内線 3490

4 C

3 6 3 4

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
X Y	Taylor, B.E. et al., Nitric Oxide Mediates Metabolism as Well as Respiratory and Cardiac Responses to Hypoxia in the Snail <i>Lymnaea stagnails</i> , Journal of Experimental Zoology, Vol.295A, 2003, p.37-46, 特に、Fig.1, Fig.4	1-8 9, 10
X Y	今川重彦他, エリスロポエチンと低酸素応答系, Vol.44, No.15, 1999, p.2478-2484	1-10 9, 10
Y	永尾雅哉他, 酸素による遺伝子発現制御, 蛋白質核酸酵素, Vol.41, No.16, 1996, p.2522-2531	9, 10
X	JP 2004-147630 A (有限会社ジェイエヌピー研究所) 2004.05.27, 特に、特許請求の範囲、第2頁第43-49行 (ファミリーなし)	1-10
X	JP 2002-534360 A (ナイトロシステムズ アイエヌシー) 2002.10.15, 特に、特許請求の範囲、第10頁26行-第11頁23行 & WO 2000/040086 A1 & EP 1139753 A1	1-10
X	JP 2003-532622 A (ヘンリーフォードヘルスシステム) 2003.11.05, 特に、特許請求の範囲、第3頁第3-12行、第5頁第4行-第6頁第4行 & WO 2000/076318 A1 & EP 1233670 A1	1-10