

(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2017-96785
(P2017-96785A)

(43) 公開日 平成29年6月1日(2017.6.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50	Z 2GO45
A 6 1 K 36/53 (2006.01)	A 6 1 K 36/53	4BO18
A 6 1 K 36/61 (2006.01)	A 6 1 K 36/61	4BO24
A 6 1 K 36/185 (2006.01)	A 6 1 K 36/185	4BO63
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1O5	4CO88
審査請求 未請求 請求項の数 16 OL (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2015-229481 (P2015-229481)
(22) 出願日 平成27年11月25日 (2015.11.25)

(71) 出願人 598015084
学校法人福岡大学
福岡県福岡市城南区七隈8丁目19番1号
(74) 代理人 100080160
弁理士 松尾 憲一郎
(74) 代理人 100149205
弁理士 市川 泰央
(72) 発明者 倉原 琳
福岡県福岡市城南区七隈八丁目19番1号
学校法人福岡大学内
Fターム(参考) 2G045 AA24 AA25 AA40 BA13 BA14
BB03 BB20 CB01 CB20 DA14
DA36 DB07 DB09 FA16 FA29
FB12 GC15

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織線維化スクリーニング方法および抗組織線維化薬剤ならびに機能性食品

(57) 【要約】

【課題】 TRPA1チャネルを介して抗組織線維化物質のスクリーニング方法ならびに抗組織線維化測定用スクリーニングキットを提供すること、および抗組織線維化薬剤ならびに機能性食品を提供すること。

【解決手段】 本発明の抗組織線維化物質のスクリーニング方法は、TRPA1チャネルを発現する間葉系細胞を用いてTRPA1チャネル活性化作用を有するTRPA1チャネル活性化物質をスクリーニングし、得られたTRPA1チャネル活性化物質を線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制することにより抗組織線維化物質をスクリーニングすることからなる。本発明の抗組織線維化薬剤および機能性食品は、抗組織線維化物質であるローズマリー、セージまたはメースのアルコール抽出分を主成分として含有する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TRPA1チャンネルを発現する間葉系細胞を用いてTRPA1チャンネル活性化作用を有するTRPA1チャンネル活性化物質をスクリーニングし、得られたTRPA1チャンネル活性化物質を線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制することにより抗組織線維化物質をスクリーニングすることからなる抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のスクリーニング方法であって、前記間葉系細胞が線維芽細胞または筋線維芽細胞であることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載のスクリーニング方法であって、前記間葉系細胞が消化器由来の間葉系細胞であることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 4】

請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法であって、前記TRPA1チャンネル活性化物質が、TRPA1チャンネルが活性化されるもしくは活性化している物質であることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 5】

請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法であって、前記TRPA1チャンネル活性化物質が、TRPA1チャンネルが活性化されるもしくは活性化している植物抽出物または化合物であることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のスクリーニング方法であって、前記植物抽出物が、植物の水、アルコールまたはこれらの混合物による抽出物であることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 7】

請求項 6 に記載のスクリーニング方法であって、前記アルコールがエタノールであることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 8】

請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法であって、前記TRPA1チャンネル活性化物質が、ローズマリー、セージ、メースまたは甘草の抽出物であることを特徴とする抗組織線維化物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】

ローズマリー、セージまたはメースの抽出物であって、該抽出物がTRPA1チャンネル活性化作用を有すると共に、抗組織線維化作用を有する抽出物を主成分とすることを特徴とする抗組織線維化薬剤。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の抗組織線維化薬剤であって、前記抽出物がアルコール抽出物であることを特徴とする抗組織線維化薬剤。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載の抗組織線維化薬剤であって、前記抽出物がエタノール抽出物であることを特徴とする抗組織線維化薬剤。

【請求項 12】

ローズマリー、セージまたはメースの抽出物であって、該抽出物がTRPA1チャンネル活性化作用を有すると共に、抗組織線維化作用を有する抽出物を主成分とすることを特徴とする抗組織線維化機能性食品。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の抗組織線維化機能性食品であって、前記抽出物がアルコール抽出物であることを特徴とする抗組織線維化機能性食品。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の抗組織線維化機能性食品であって、前記抽出物がエタノ

10

20

30

40

50

ール抽出物であることを特徴とする抗組織線維化機能性食品。

【請求項 15】

TRPA1チャンネルを発現する間葉系細胞および線維化サイトカインTGF-を含むことを特徴とする抗組織線維化測定用スクリーニングキット。

【請求項 16】

請求項 15 に記載の抗組織線維化測定用スクリーニングキットであって、前記間葉系細胞が線維芽細胞又は筋線維芽細胞であることを特徴とする抗組織線維化測定用スクリーニングキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、組織線維化スクリーニング方法および抗組織線維化薬剤ならびに機能性食品に関するものである。更に詳細には、本発明は、間葉系細胞TRPA1チャンネルの活性化を介する組織線維化スクリーニング方法および抗組織線維化薬剤ならびに機能性食品に関するものである。

【背景技術】

【0002】

間葉系細胞（主に線維芽細胞や筋線維芽細胞）は臓器線維化の過程で重要な役割を果たす。臓器の線維化は肝臓・心臓・肺臓・腎臓・血管・消化管・皮膚など多くの組織に見られる。線維化病変は、放置すれば死の機転をとる重篤な慢性疾患である場合も多いけれども、現在ところ選択的な治療薬は存在しない。

20

【0003】

肝炎に伴う肝硬変で見られる肝臓の線維化には、甘草の抽出成分であるグリチルリチン、膚の癬痕化・消化管癬痕狭窄・肺線維症にはステロイドが用いられ、他に肺線維症に用いられるピルフェニドンなど作用ターゲットが不明な抗線維化薬が存在する。しかし、いずれの薬の抗線維化の作用機序は明らかにされておらず、ステロイドの強い副作用が問題となっている。

【0004】

一方、一過性受容器電位(Transient Receptor Potential)イオンチャンネルのスーパーファミリーに属する非選択性陽イオンチャンネルの一つとしてTRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) チャンネルが知られている。

30

【0005】

このTRPA1チャンネルは、侵害受容ニューロンにおいて低温受容器(17)として見出された(非特許文献1)。またTRPA1チャンネルは、リガンド依存性イオンチャンネルであり、リガンドが結合することにより構造変化を惹起し、その結果チャンネルが開口し、カルシウムイオンやナトリウムイオンなどの陽イオンを細胞内に流し、細胞の膜電位を調節する作用を有している。

【0006】

TRPA1リガンドとしては、例えば、アリルイソチオシアネート(AITC)、シンナムアルデヒド等の刺激性天然物、ホルマリン、アクロレイン等の環境刺激物などが挙げられる。さらにTRPA1チャンネルは、冷刺激、細胞内カルシウムイオンなどによっても活性化されることも知られている(非特許文献2)。

40

【0007】

またパラベン類やアルカリ剤が配合された化粧品などの外用剤を皮膚に用いた場合、使用者によっては皮膚に不快な刺激を感じることもあるが、かかる不快な刺激にTRPA1チャンネルの活性化が関連していることが報告されている(例えば、特許文献1~4参照)。

【0008】

このようにTRPA1チャンネルがパラベン類やアルカリ剤に応答することから、TRPA1チャンネルはこれらの化合物による刺激を抑制する物質のスクリーニングに利用することが可能であることが報告されている(非特許文献1、3)。

50

【0009】

このように様々な物理化学刺激によって活性化されるTRPA1チャンネルについて研究の結果、本発明者らはTRPA1チャンネルが組織の線維化に深く関与することを見出した（非特許文献4、5）。

【0010】

TRPA1チャンネルは筋線維芽細胞に多く発現しており、AITCなどTRPA1を活性化する刺激は線維化マーカーを抑制し、抗線維化作用が確認された。また、TRPA1チャンネルは細胞外のコラーゲンの濃度の増加によって発現が増し、抗線維化作用を示して自らのコラーゲン産生を抑制することから、コラーゲンのネガティブフィードバック調節因子であることが分かった。

10

【0011】

さらに、これらの知見から、本発明者らは、TRPA1チャンネルを活性化する化合物や物質から組織線維化予防・治療に有用な化合物や物質をスクリーニングすることが可能ではないかとの仮説を立てて研究を開始することにした。

【0012】

まず、胃腸の機能回復やイレウス・線維化狭窄の緩和に良く使われる薬であって、乾姜・人参・山椒の乾燥エキスや日局コウイによって構成されている大建中湯という漢方薬は、消化管運動促進や血流増加、ホルモン分泌促進などの効果が報告されている上、その薬効が即効性であることから、この漢方薬は消化管へ直接作用する可能性が強く示されている（非特許文献4）。そこで、大建中湯について粘膜上皮化に発現するこの筋線維芽細胞に対する直接作用を検討した。

20

【0013】

この結果、大建中湯およびその構成薬である乾姜、人参、山椒エキスのエタノール抽出成分においては、TRPA1チャンネルは筋線維芽細胞InMyoFib細胞に対し効果を有することが確認された。また、大建中湯や生姜、山椒の抽出成分はTRPA1を介するカルシウム流入を惹起することも確認された。

【0014】

さらに、大建中湯によるTGF受容体下流の線維化シグナルに対するTRPA1チャンネルの影響について検討した結果、大建中湯エキスの濃度に依存してTGF- β 1（5 ng/ml, 24 hr）刺激下のSmad-2リン酸化レベルが有意に抑制されることも確認された（非特許文献4）。

30

【0015】

ところで、自己免疫異常に起因する難治性疾患として、クローン病(CD)や潰瘍性大腸炎(UC)などの炎症性腸疾患(IBD)がある。IBDは、若年で発症し頑固な下痢や便秘を繰り返す経過を辿ることから、長年に亘り生活の質を劣化させる難治性の疾患として問題になっていた。

【0016】

このIBDの治療法として抗TNF抗体療法が現在最も注目を浴びている。この抗TNF抗体療法は、IBDの炎症に対しては顕著な効果を奏するが、線維化による腸狭窄という大きな問題が解決されずに残されたままである。

【0017】

そこで、クローン病患者の組織を生検して、非狭窄部位(non-stenosis)と狭窄部位(stenosis)におけるTRPA1およびその他の遺伝子のmRNA発現量をマイクロアレイ解析して比較したところ(図1)、線維化芽細胞や筋線維芽細胞が狭窄部に多く集積していて、それらの細胞の多くで見られるTRPA1、I型コラーゲン、 α -SMA(平滑筋型アクチン)、N-CadherinのmRNA発現が線維化狭窄部位で著しく増加していることが確認された(図2)。

40

【0018】

さらに、組織の線維化を評価するモデルとして非常に有用である細胞として、消化管筋線維芽細胞(InMyoFib)が知られている。この細胞は、TGF- β 1で刺激すると、細胞が敷石状の形態から細長い線維状の形態に変化し(図3)、線維化マーカーの上昇が観察される(Kurahara, L.H., et al. Inflammatory Bowel Diseases, 21(3):496-506, 2015)。

50

この細胞を用いてTGF- β 1で刺激したところ、この細胞で最も多く発現するTRPチャンネルがTRPA1チャンネルであることがマイクロアレイ解析で示唆された(図4)。

【0019】

上記知見から、本発明者らは、TRPA1チャンネルが、組織の線維化を評価する1つの有力な指標となりえるとの前提のもとに、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0020】

【特許文献1】特開2008-79528号公報

【特許文献2】特開2009-82053号公報

【特許文献3】特開2009-225733号公報

【特許文献4】特開2011-140471号公報

【非特許文献】

【0021】

【非特許文献1】Story et al. 2003, Cell 112, 819-829

【非特許文献2】Bandell, M., et al., Neuron, 2004 Mar 25; 41(6):849-57

【非特許文献3】Kwan et al. 2006, Neuron 50, 277-289.

【非特許文献4】倉原(海)琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司：大建中湯の抗線維化・抗狭窄作用における消化管筋線維芽細胞TRPA1の役割 / 第67回日本薬理学会西南部会 / 2014年11月 / 北九州

【非特許文献5】倉原(海)琳、住吉美保、青柳邦彦、平石敬三、井上隆司：大建中湯の抗線維化狭窄作用に関わる消化管筋線維芽細胞TRPA1の分子機序 / 第56回日本平滑筋学会総会 / 2014年8月 / 横浜

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

したがって、本発明は、1つの形態として、TRPA1チャンネルを発現する間葉系細胞を用いてTRPA1チャンネル活性化作用を有するTRPA1チャンネル活性化物質をスクリーニングし、得られたTRPA1チャンネル活性化物質を線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制することにより抗組織線維化物質をスクリーニングすることからなる抗組織線維化物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0023】

本発明は、その別の形態として、TRPA1発現間葉系細胞、TRPA1チャンネル活性化測定剤および組織線維化マーカーとしての組織もしくは細胞からなる抗組織線維化測定用スクリーニングキットを提供することを目的とする。

【0024】

本発明は、そのさらに別の形態として、TRPA1チャンネルを活性化しかつ組織線維化マーカーを抑制する抗組織線維化物質を主成分として含有することからなる抗組織線維化薬剤を提供することを目的とする。

【0025】

本発明は、そのさらに別の形態として、TRPA1チャンネルを活性化しかつ組織線維化マーカーを抑制する抗組織線維化物質を主成分として含有することからなる抗組織線維化機能性食品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】

【0026】

上記目的を達成するために、本発明は、1つの形態として、TRPA1チャンネルを発現する間葉系細胞を用いてTRPA1チャンネル活性化作用を有するTRPA1チャンネル活性化物質をスクリーニングし、得られたTRPA1チャンネル活性化物質を線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制することにより抗組織線維化物質をスクリーニングすることからなる抗組織線維化物質のスクリーニング方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0027】

本発明は、別の形態として、TRPA1発現間葉系細胞と、線維化サイトカインTGF- β 1を含む構成からなる抗組織線維化測定用スクリーニングキットを提供する。

【0028】

本発明は、さらに別の形態として、TRPA1チャンネルを活性化しかつ組織線維化マーカーを抑制する抗組織線維化物質を主成分として含有することからなる抗組織線維化薬剤を提供する。

【0029】

本発明は、さらに別の形態として、TRPA1チャンネルを活性化しかつ組織線維化マーカーを抑制する抗組織線維化物質を主成分として含有することからなる抗組織線維化機能性食品を提供する。

10

【発明の効果】

【0030】

本発明に係る抗組織線維化物質のスクリーニング方法および抗組織線維化測定用スクリーニングキットは、任意の物質からTRPA1チャンネル活性化方法によりTRPA1チャンネル活性化物質を選択し、選択したTRPA1チャンネル活性化物質から線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制する抗組織線維化物質をスクリーニングすることができ、得られた抗組織線維化物質は、抗組織線維化薬剤または抗組織線維化機能性食品として有用である。

【図面の簡単な説明】

20

【0031】

【図1】図1は、クローン病患者の炎症組織部位の非狭窄部位(non-stenosis)(左側)と狭窄部位(stenosis)(右側)を示す図である。(参考例1)

【図2】図2は、非狭窄部位と狭窄部位におけるTRPA1、MYOCD(Myocardin)、I型コラーゲン、 α -SMA(平滑筋型アクチン)、およびN-CadherinのmRNA発現をそれぞれ示すグラフである。(参考例1)

【図3】図3は、消化器筋線維芽細胞(InMyoFib)をTGF- β 1で刺激した状態と未刺激状態を示す細胞染色図である。(参考例2)

【図4】図4は、筋線維芽細胞(InMyoFib)におけるTRPAファミリーのmRNAの定量化発現量を比較したマイクロアレイ解析結果を示す図である。(参考例2)

30

【図5】図5は、筋線維芽細胞(InMyoFib)を用いたカルシウムイメージング及びパッチクランプの結果を説明する図である。(参考例3)

【図6】図6は、TRPA1siを導入した筋線維芽細胞(InMyoFib)を用いたTRPA1siRNA干渉実験を説明する図である。(参考例4)

【図7】図7は、TRPA1チャンネルがTGF- β 1下流のリン酸化シグナルに対して抑制的であることを示唆している図である。(参考例5)

【図8】図8は、TRPA1やI型コラーゲンのタンパク質発現を示す免疫プロット図(左図)とそれを定量化した図(右図)である。(参考例6)

【図9】図9は、筋線維芽細胞(InMyoFib)にコラーゲンを添加した場合、組織線維化マーカーであるI型コラーゲン(COL1A1)、 α -SMA(ACTA2)、N-カドヘリン(CDH2)ならびに線維化マスター転写因子MYOCD(Myocardin)の発現が抑制されるが、TRPA1siRNAで前処理した細胞ではこのような抑制作用が認められないことを示す図である。(参考例7)

40

【図10】図10は、ローズマリーのエタノール抽出液の1000倍希釈を用いたカルシウム(Ca^{2+})イメージング実験の結果を示す図である。(実施例1)

【図11】図11は、ローズマリーのエタノール抽出液の希釈液を用いた線維化マーカーの定量PCR実験の結果を説明するグラフである。(実施例1)

【図12】図12は、セージのエタノール抽出液の希釈液を用いたカルシウム(Ca^{2+})イメージング実験の結果を説明するグラフである。(実施例2)

【図13】図13は、メースのエタノール抽出液の希釈液を用いた線維化マーカーの定量PCR実験の結果を説明するグラフである。(実施例3)

50

【図14】図14は、甘草（リコリス）のエタノール抽出液が筋線維芽細胞（InMyoFib）においてTRPA1チャンネルを活性化することを説明するカルシウム（Ca²⁺）イメージング実験の結果図である。（実施例4）

【図15】図15は、甘草（リコリス）のエタノール抽出液が線維化マーカー -SMA発現を濃度依存的に抑制することを説明する図である。（実施例4）

【図16】図16は、グリチルレチン酸が筋線維芽細胞（InMyoFib）においてTRPA1チャンネルを活性化して、線維化マーカーを抑制する定量PCR実験の結果を説明することを説明する図である。（実施例5）

【図17】図17は、グリチルリチンが筋線維芽細胞（InMyoFib）においてTRPA1チャンネルを活性化することを説明する図である。（実施例6）

【図18】図18は、プレドニゾロンが筋線維芽細胞（InMyoFib）においてTRPA1チャンネルを活性化することを説明する図である。（実施例7）

【図19】図19は、ビルフェニドンが筋線維芽細胞（InMyoFib）においてTRPA1チャンネルを活性化することを説明する図である。（実施例8）

【発明を実施するための形態】

【0032】

本発明に係る抗組織線維化物質のスクリーニング方法は、TRPA1チャンネルを発現する間葉系細胞を用いてTRPA1チャンネル活性化作用を有するTRPA1チャンネル活性化物質をスクリーニングし、得られたTRPA1チャンネル活性化物質を線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制することにより抗組織線維化物質をスクリーニングすることからなる。

【0033】

本明細書において使用する用語「TRPA1チャンネル」は、前述したように、一過性受容器電位(Transient Receptor Potential)イオンチャンネルのスーパーファミリーに属する非選択性陽イオンチャンネルの一つを意味する。

【0034】

本明細書における用語「TRPA1チャンネル活性化」は、ある物質がTRPA1チャンネル活性化方法によりTRPA1チャンネルが活性化される現象と、TRPA1チャンネルが活性化された現象の両者を意味して使用されるが、どちらの意味に該当するかは通常文面によって解釈することができる。

【0035】

本明細書において使用する用語「物質」は、本発明によってTRPA1チャンネルが活性化されるもしくは活性化される物質、例えば原料植物の乾燥物もしくはその抽出物などの物質ばかりではなく、TRPA1チャンネルが活性化されるもしくは活性化される化合物自体をも意味している。つまり、本発明においては、特段の定めがない限りまた文面から一般的には、かかる物質ならびに化合物を包含して一括して単に「物質」という。したがって、用語「TRPA1チャンネルが活性化物質」は、TRPA1チャンネルが活性化されるもしくは活性化される原料植物などの物質ならびにTRPA1チャンネルが活性化されるもしくは活性化される化合物自体をも意味している。

【0036】

したがって、本発明に係る抗組織線維化物質のスクリーニング方法に供することができる物質は、特定の物質に限定されるものではなく、TRPA1チャンネル活性化される物質であればいずれでも使用することができる。本発明において、スクリーニング法自体も、また物質がTRPA1チャンネル活性化されるかどうかも、当該技術分野で慣用されている手法に従って測定することができる。

【0037】

本発明において使用される原料植物としては、成分としてTRPA1チャンネル活性化化合物を含有する植物であれば特に限定されるものではなく、例えば、ローズマリー、セージ、メース、甘草、乾姜、山椒などが挙げられる。また植物といっても、その部位も特に限定されるものではなく、例えば、葉部、茎部、枝部、根部、花部、芽部、種子などであって

10

20

30

40

50

もよい。

【0038】

本発明に使用される原料植物などの物質の乾燥物とは、原料植物などの物質を乾燥したものであって、具体的には、天日乾燥、加熱乾燥、フリーズドライなどの公知の乾燥方法で乾燥したものである。かかる乾燥物は、通常、粉碎して粉末化され、乾燥粉末として使用するのがよい。

【0039】

本発明に使用される原料植物などの物質の抽出物とは、原料植物などの物質を、必要に応じて乾燥、細切し、抽出溶媒を用いて抽出することにより得られるものを意味する。本発明において原料植物などから抽出物を抽出する方法は特に限定されず、常法に従って行なうことができる。例えば、原料植物を抽出溶媒に浸漬し、室温あるいは加熱して原料植物に含まれる可溶性成分を抽出する方法が挙げられる。このように溶媒抽出によって得られた抽出液はそのまま利用してもよいが、常法に従って希釈、濃縮、乾燥、精製などの処理を施してもよい。したがって、本発明でいう「抽出物」は、抽出液をそのまま利用する溶媒抽出物、またかかる溶媒抽出物を希釈液で希釈した希釈物もしくはかかる溶媒抽出物を濃縮した濃縮物もしくはかかる溶媒抽出物、希釈物、濃縮物などをフリーズドライした乾燥物をも包含している。

【0040】

本発明において、物質の抽出に使用する抽出溶媒としては、例えば、水、エタノール、プロパノール等のアルコールなどが挙げられる。これらの抽出溶媒は単独またはこれら2種以上の混合物として使用することができる。これらの抽出溶媒のうち、エタノールと水の混合溶媒が、抽出効率が高くかつヒトに対して安全なことから好ましい。

【0041】

本発明におけるTRPA1チャンネル活性化化合物の例としては、グリセルリチン、グリチルレチン酸、プレドニゾンやメチルプレドニゾン等のステロイド、抗線維化薬ピルフェニドンなどが挙げられる。

【0042】

本発明のTRPA1チャンネル活性化物質は、TRPA1発現細胞において、線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制するかどうかスクリーニングされる。

【0043】

本発明において使用することができるTRPA1チャンネルを発現する間葉系細胞としては、TRPA1チャンネルが機能的に作用する細胞であれば特に限定されるものではなく、例えば、線維芽細胞や筋線維芽細胞などが挙げられる。またかかる細胞の由来も特に限定されるものではなく、例えば、大腸等の消化器、心臓、角膜、肺臓などの組織由来のものがよいが、消化器由来の間葉系細胞、特に筋線維芽細胞(InMyoFib)が好ましい。

【0044】

なお、筋線維芽細胞(InMyoFib)においてTRPA1チャンネルが機能的に作用することは確認している。つまり、筋線維芽細胞におけるカルシウムイメージングの結果から、TRPA1チャンネルアゴニスト(アリルイソチオシアネート:AITC)がカルシウムイオン(Ca^{2+})流入を大きく促進し、そのカルシウムイオン流入が、TRPA1特異的なブロッカーによって有意に抑制される(図5の上段左図)と共に、またTRPA1のRNA干渉実験(図5の下段左図)によっても有意に抑制されることが示された。また、パッチクランプのデータから、筋線維芽細胞において、TRPA1チャンネルアゴニストはTRPA1の性質を持つ電流を活性化し、その電流はTRPA1特異的なブロッカーHによって有意に抑制されることが分かった(それぞれ図5の上段ならびに下段の右図)。これらの結果から、筋線維芽細胞(InMyoFib)においてTRPA1チャンネルは機能的に作用することを確認することができる。

【0045】

さらに、本発明のスクリーニング方法においては、TRPA1チャンネル活性化物質が線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制するかどうかスクリーニングされる。本発明において組織の線維化を評価する1つの指標となるのが組織線維化マーカー

10

20

30

40

50

ーである。本発明の組織線維化マーカーとしては、例えば、 α -SMA（平滑筋型アクチン）、I型コラーゲン、TGF受容体下流のリン酸化シグナル、N-カドヘリンなどが使用することができる。

【0046】

さらにまた、図6に示すように、TRPA1siを導入した筋線維芽細胞（InMyoFib）を用いたTRPA1siRNA干渉実験において、線維化のマスター転写因子であるMYOCD（Myocardin）の発現が有意に増加し（左図）、また線維化マーカーである α -SMAとI型コラーゲンのmRNA発現が増加している（右図）のが確認された。これらの結果から、TRPA1チャンネルはTGF- β 1刺激下流の線維化シグナルに対して抑制的に機能することが分かった。

【0047】

また、一般的に、TGF受容体の下流には多くのリン酸化シグナルが存在し、線維化を促進することが知られている。筋線維芽細胞（InMyoFib）において、TGF- β 1下流のSmad-2のリン酸化がTRPA1チャンネルのsiRNA導入によって著しく促進され、TRPA1チャンネルはTGF- β 1下流のリン酸化シグナルに対して抑制的であることが示唆された（図7）。

【0048】

TRPA1は、細胞外のコラーゲンの量の増加に伴って増加し、筋線維芽細胞自体のコラーゲン放出を抑制することから、TRPA1チャンネルはコラーゲン産生のネガティブフィードバック調節因子としての役割を持っている（図8）。

【0049】

さらに、筋線維芽細胞（InMyoFib）にコラーゲン添加すると、組織線維化マーカーであるI型コラーゲン（COL1A1）、 α -SMA（ACTA2）ならびにN-カドヘリン（CDH2）、また線維化マスター転写因子MYOCD（Myocardin）の発現がTGF刺激の有無に関係なく抑制されるが、TRPA1siRNAで前処理した細胞ではこのような抑制作用は認められなかった（図9）。

【0050】

上述した知見に基づいて、本発明に係る抗組織線維化物質のスクリーニング方法は、抗組織線維化作用を有する物質をスクリーニングすることができる。したがって、本発明のスクリーニング方法によってスクリーニングして得られた抗組織線維化作用を有する物質は、抗組織線維化薬剤または機能性食品として有用である。

【0051】

本発明に係る抗組織線維化薬剤は、本発明によりスクリーニングされた抗組織線維化作用を有する物質を常法に従って製剤することによって調製することができる。

【0052】

本発明に係る抗組織線維化薬剤としては、その投与形態ならびに剤型は、特に限定するものではないが、例えば、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、カプセル剤等の固形製剤、または液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤等の液剤およびゼリー剤等の半固形製剤などの経口投与用製剤などが挙げられる。これらの製剤は、必要に応じて薬理的に許容される担体を用いて、常法により調製することができる。

【0053】

薬学的に許容される担体としては、製剤の素材として慣用されている各種有機あるいは無機担体物質が用いられる。固形製剤には、例えば、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤など、また液状製剤には、例えば、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などを配合することができる。また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤等の添加物を用いることもできる。

【0054】

賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。結合剤としては、例えば、白糖、D-マンニトール、デキストリン、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキ

10

20

30

40

50

シメチルセルロースカルシウムなどが挙げられる。溶剤としては、例えば、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。懸濁化剤としては、例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリンなどの界面活性剤、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子などが挙げられる。等張化剤としては、例えば、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液などが挙げられる。無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコールなどが挙げられる。防腐剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。抗酸化剤としては、例えば、トコフェロール類、亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

10

【0055】

本発明の抗組織線維化薬剤の投与量は、成分として大人一日当たり約1mg/kg ~ 500mg/kg、好ましくは5mg/kg ~ 300mg/kgであるのがよい。

20

【0056】

本発明に係る抗組織線維化機能性食品とは、組織線維化の予防もしくは治療の目的で摂取する食品および/または飲料を意味し、保健機能食品である特定保健用食品や栄養機能食品などを意味している。なお、本発明において、機能性食品としてして製品化する場合には、食品に一般的に用いられる添加剤、例えば、着色料、保存料、増粘安定剤、酸化防止剤漂白剤、防菌防黴剤、酸味料、調味料、乳化剤、強化剤、製造用剤、香料等の添加剤を添加していてもよい。

【0057】

本発明の抗組織線維化機能性食品の形態は、経口投与可能な形態であれば特に制限されるものではなく、例えば、粉末状、顆粒状、カプセル状、タブレット状、グミ状、ガム状、キャンディー状、丸剤、錠剤状、棒状、板状、液状、クリーム状、軟膏状、シート状等の剤型、形態をとることができる。

30

【0058】

本発明の抗組織線維化機能性食品は、日常的に経口摂取しやいように、各種の食品、飲料と混ぜて機能性食品とすることで、長期的に摂取することも可能である。食品としては、例えば、ソーセージ、ハム、魚介加工品、ゼリー、キャンディー、チューインガムなどが挙げられる。また、飲料としては、例えば、茶類、清涼飲料水、酒類、栄養ドリンクなどが挙げられる。

【0059】

本発明の抗組織線維化機能性食品の摂取量は、対象者の年齢、性別などの個別差にもよるが、成分重量換算で、0.2~3.0g/1日程度であるのがよい。

40

【0060】

本発明に係る抗組織線維化測定用スクリーニングキットは、TRPA1を発現する線維芽細胞、筋線維芽細胞などの間葉系細胞と、線維化サイトカインTGF- β 1を含む構成にするのがよい。

【0061】

以下、本発明を参考例と実施例により詳細に説明するが、本発明は下記実施例で一切限定されるものではなく、下記実施例は本発明を例示的に説明するだけである。

【0062】

〔参考例1〕

50

本参考例においては、クローン病患者の組織を生検して、図1に示すような非狭窄部位 (non-stenosis) と狭窄部位 (stenosis) におけるTRPA1およびその他の遺伝子のmRNA発現量を定量PCRによって解析した。その結果、線維化芽細胞や筋線維芽細胞が多く集積している線維化狭窄部位に、それらの細胞の多くで見られるTRPA1 (TRPA1)、I型コラーゲン (COL1A1)、 α -SMA (平滑筋型アクチン) (ACTA2) ならびにN-Cadherin (CDH2) のmRNA発現が著しく増加していることが確認されたが、線維化マスター転写因子Myocardin (MYOCA) のmRNA発現は非狭窄部位と狭窄部位との間では大した差異は認められなかった (図2)。

【0063】

定量PCRは次のように行った。RNeasy RNA Extraction Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) を用いてInMyoFib細胞からTotal RNAを抽出した。逆転写後にBioMark™ HD System (Fluidigm) を用いた定量PCR実験を行った。定量PCRに用いた温度サイクルを以下に示す。ステップ1は95℃を60秒；ステップ2は、1サイクルを、96℃を5秒、60℃を20秒として35サイクルを行った。定量PCRには、TaqMan (登録商標) Gene Expression Assay kits (Life Technologies社) : TRPA1 (Hs00175798_m1), MYOCD(myocardin; Hs00538071_m1), ACTA2(α -SMA; Hs00426835_g1), CDH2(N-cadherin; Hs00983056_m1), COL1A1(Hs00164004_m1) を用いた。

【0064】

〔参考例2〕

本参考例では、組織線維化の評価モデルとして非常に有用な細胞である消化器筋線維芽細胞を用いたマイクロアレイ解析によって、当該細胞に最も多く発現するTRPチャンネルの形態を調べた。その結果、マイクロアレイ解析によって消化器筋線維芽細胞に最も多く発現するTRPチャンネルがTRPA1チャンネルであることが示唆された (図3)。図3中、上図は筋線維芽細胞 (InMyoFib) を未処理の状態での細胞染色したコントロールを示し、下図は筋線維芽細胞 (InMyoFib) をTGF- β 1 (5 ng/ml, 48 hr) で刺激した状態で細胞染色した図を示している。また、上下の図中、左側の図は明視野の細胞像、中央の図は線維化マーカー α -SMA (平滑筋型アクチン) とDAPI (核の染色)、および右側の図はビメンチンとDAPI (核の染色) をそれぞれ染色する薬剤で染色した状態を示す図である。この結果から、筋線維芽細胞 (InMyoFib) は、TGF- β 1で刺激することによって敷石状の形態から細長い線維状の形態に変化しているのが分かる。

【0065】

マイクロアレイ解析の結果、筋線維芽細胞 (InMyoFib) において、TRPファミリーのmRNAの発現量を定量化して比較したところ、TRPファミリーのうち最も多く発現しているのがTRPA1であることが示唆された (図4)。

【0066】

上記マイクロアレイ解析実験は Human Genomic U133 Plus 2.0 Array 6800 GeneChips (Affymetrix) を用いて行い、そのデータ解析はGeneSpring v.7.3 software (Agilent Technologies) を用いて行った。

【0067】

〔参考例3〕

本参考例では、筋線維芽細胞 (InMyoFib) を用いてカルシウムイメージングを行った。カルシウムイメージングは、Fura-2 AMを用いたデジタル蛍光イメージングにより行い、InMyoFib細胞内カルシウム濃度を測定した。InMyoFib細胞をpoly-L-lysine (Sigma) でコートしたガラスチャンパー内に播種し、蛍光顕微鏡のステージ上にセットした。InMyoFib細胞に5 μ M Fura-2/AMを添加して室温・遮光状態で30分インキュベーションし、励起波長:340 nm / 380 nm, 蛍光波長:510 nm でInMyoFib細胞内カルシウム濃度の測定を行った。その結果、カルシウムイオン濃度が高くなると、340 nm 励起の蛍光強度は上昇し、380 nm 励起の蛍光強度は低下した。そのときの蛍光強度比 ($R = F_{ex, 340nm} / F_{ex, 380nm}$) を蛍光顕微鏡 (DMI600B, Leica)、EMCCDカメラ (Nippon Roper, Tokyo, Japan) で測定した。採取したデータはSlideBook 4.2 software (Intelligent Imaging Innovation Inc., Denver,

10

20

30

40

50

CO, USA)で解析を行った。細胞外液の組成は以下に示すとおりであった (単位 mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose (Tris base でpH = 7.4に調節)。

【0068】

カルシウムイメージングの結果は図5に示すとおりである。図5において、上段左図は、筋線維芽細胞において、TRPA1チャンネルアゴニスト (AITC) がカルシウムイオン (Ca²⁺) 流入を大きく促進しているとともに、そのカルシウムイオン流入がTRPA1特異的なブロッカー (HC-030031) によって有意に抑制されていることを示すカルシウムイメージング; 下段左図は、カルシウムイオン流入がTRPA1のRNA干渉実験で有意に抑制されることを示す図; 上段右図は、TRPA1チャンネルアゴニストがTRPA1の性質を持つ電流を活性化することを示すパッチクランプデータ; 下段右図は、その電流がTRPA1特異的なブロッカーによって有意に抑制されることを示すパッチクランプデータを示している。これらの結果から、筋線維芽細胞 (InMyoFib) において、TRPA1チャンネルが機能的に作用していることが確認された。

10

【0069】

[参考例4]

本参考例は、TRPA1siを導入した筋線維芽細胞 (InMyoFib) において、TRPA1チャンネルがTGF- β 1刺激下で線維化シグナルに対して抑制的に作用するかどうかを調べるTRPA1siRNA干渉実験に関するものである。

【0070】

TRPA1siRNA干渉実験の結果を図6に示す。TRPA1siRNA干渉実験では、TRPA1siを導入した筋線維芽細胞 (InMyoFib) において線維化マスター転写因子であるMYOCD (Myocardin) の発現が有意に増加していると同時に (図6左図)、線維化マーカーである α -SMA (平滑筋型アクチン) とI型コラーゲンのmRNA発現も増加しているのが確認された (図6右図)。これらの結果から、TRPA1チャンネルはTRPA1siを導入した筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTGF- β 1刺激下で線維化シグナルに対して抑制的に作用することが確認された。

20

【0071】

TRPA1siRNA干渉実験では、Human Stealth TRPA1 siRNAs: TRPA1 HSS113276 (5' -GGAGCAAUUGCUGUUUACUUAUU-3' および5' -AAUAGAAGUAAACAGCAAUUGCU-CC-3') (Invitrogen; Carlsbad, CA, USA) を遺伝子導入試薬Lipofectamine (登録商標) 3000を用いてInMyoFib細胞に導入し、TRPA1の遺伝子発現を抑制するかどうかを調べた。TRPA1遺伝子発現の抑制がMYOCD, COL1A1, ACTA2の遺伝子発現に及ぼす効果は定量PCR (上述) によって測定を行った。

30

【0072】

[参考例5]

本参考例は、TRPA1チャンネルがTGF- β 1刺激下流でリン酸シグナルに対して抑制的に作用するかどうかを調べる実験である。一般的には、TGF受容体の下流において、多くのリン酸シグナルが存在していて線維化を促進していることが知られている。本参考例は、筋線維芽細胞 (InMyoFib) において、TGF- β 1下流のSmad-2のリン酸化がTRPA1チャンネルのsiRNA導入により著しく促進され、TRPA1チャンネルはTGF- β 1下流のリン酸シグナルに対して抑制的であることを示唆している (図7)。

40

【0073】

免疫プロットは、InMyoFib細胞におけるSmad2のリン酸化レベルを調べるためにSmad-2/3やphospho-Smad-2の免疫プロット法実験で行った。細胞の全分画を溶菌バッファで溶解し、5% (v/v) 2-mercaptoethanol や1% (w/v) bromophenol blueを含むサンプルバッファ中でタンパク質を変性させた後に10% (w/v) SDS-PAGEゲルで電気泳動を行った。電気泳動したサンプルはPVDF膜へ転写し、Blocking One (Nacalai Tesque) 中で室温1時間ブロッキングを行った後、一次抗体と反応させた。その後HRP標識の二次抗体と室温で45分間反応させ、ECL試薬 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) で現像して結果を観察した。なお、使用した抗体は、 β -actin (Abcam), Smad-2/3, phospho-Smad-2 (Cell Signaling

50

Technology, Beverly, MA, USA)である。

【0074】

〔参考例6〕

本参考例は、TRPA1が細胞外のコラーゲンの量の増加に伴って増加すると共に筋線維芽細胞自体のコラーゲン放出を抑制すること示している(図8)。このことから、TRPA1チャンネルは、コラーゲン産生のネガティブフィードバック調節因子の役割を有することが分かる。

【0075】

なお、免疫ブロット実験は上述した方法により行った。使用した抗体は、TRPA1 (mouse; Sigma-Aldrich), α -actin (Abcam), Collagen I (Abcam)である。

10

【0076】

〔参考例7〕

本参考例では、筋線維芽細胞(InMyoFib)外にコラーゲンを添加し、上記同様に定量PCR実験をしたところ、組織線維化マーカーであるI型コラーゲン(COL1A1)、 α -SMA (ACTA2)ならびにN-カドヘリン(CDH2)および線維化マスター転写調節因子であるミオカルディン(MYOC)の発現はTGF- β 1刺激の有無に関係なく抑制されたが、TRPA1siRNAで前処理した細胞ではこの抑制作用は認められなかった(図9)。

【0077】

〔実施例1〕

実施例1では、筋線維芽細胞(InMyoFib)を用いてローズマリーのエタノール抽出成分の抗線維化作用を調べた。本実施例で使用したローズマリーのエタノール抽出成分は、ローズマリーの葉の粉末1gを100%エタノール20ml中で5分間ソニケーションして、室温で1時間攪拌し、3000rpmで5分間遠心分離した上清を採取し抽出して作製した。なお、上記遠心分離後の沈殿は再度10mlエタノールで攪拌・遠心し上清も回収した。

20

【0078】

本実施例の実験の詳細は次の通りである。上記で得た試料1gをエタノール20ml中で5分間ソニケーションし、その後室温で1時間3000rpmで5分間遠心分離した。遠心分離後の上清は、上記と同様に定量し、分注して保存した。一方、遠心分離後の沈殿は、エタノール10mlで洗浄し、5分間3000rpmで遠心分離し、その上清を、上記と同様に定量し、分注して保存した。

30

【0079】

本実施例で得られたローズマリーのエタノール抽出液を細胞外液(単位 mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 glucose (Tris base でpH = 7.4に調節)で1000倍希釈した希釈液を用いて上記と同様にカルシウム(Ca²⁺)イメージング実験を実施した。カルシウムイメージング実験の結果は図10に示すとおりである。

【0080】

上記カルシウムイメージング実験の結果から、ローズマリーのエタノール抽出成分は高い抗線維化作用を有すると共に、その作用機序は間葉系TRPA1チャンネル活性化を介していることが確認された。つまり、ローズマリーのエタノール抽出成分によって起こる細胞内へのカルシウム(Ca²⁺)流入は、すべてTRPA1チャンネル特異的なアンタゴニストHC-030031によって有意に抑制された。

40

【0081】

同様に、ローズマリーのエタノール抽出成分の5000倍、2000倍、1000倍希釈液についてそれぞれ抗線維化作用を調べた結果、いずれもTGF- β 1 (5ng/ml)刺激によって起こる線維化マーカーの上昇に対して、濃度依存的に抑制効果が観察された(図11)。

【0082】

〔実施例2〕

実施例1と同様に、セージのエタノール抽出成分によって起こる細胞内へのカルシウム(Ca²⁺)流入は、すべてTRPA1チャンネル特異的なアンタゴニストHC-030031によって有意に抑制された。セージのエタノール抽出液の1000倍、2000倍および5000倍希釈液について、

50

抗組織線維化作用を調べた。その結果を図 1 2 に示す。その結果、セージのエタノール抽出液の希釈液と同様な結果が得られた。

【 0 0 8 3 】

〔実施例 3〕

実施例 1 と同様に、メースのエタノール抽出成分によって起こる細胞内へのカルシウム (Ca^{2+}) 流入は、すべてTRPA1チャンネル特異的なアンタゴニストHC-030031によって有意に抑制された。メースのエタノール抽出液の1000倍、2000倍、5000倍および10000倍希釈液について、抗組織線維化作用を調べた。その結果を図 1 3 に示す。その結果、メースのエタノール抽出液の希釈液と同様な結果が得られた。

【 0 0 8 4 】

〔実施例 4〕

実施例 1 と同様にして、甘草 (リコリス) のエタノール抽出液について筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTRPA1チャンネルが活性化し、線維化マーカーが発現するかどうか調べた。その結果、図 1 4 で示すように、甘草 (リコリス) のエタノール抽出液が筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTRPA1チャンネルを活性化することが確認された。また、図 1 5 に示すように、甘草 (リコリス) のエタノール抽出液は、線維化マーカー -SMAの発現を濃度依存的に抑制した。

【 0 0 8 5 】

〔実施例 5〕

甘草に含まれる18 グリチルレチン酸について筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTRPA1チャンネルを活性化するかどうかをカルシウムイメージング法にて上記と同様に調べた。その結果は図 1 6 に示す。

【 0 0 8 6 】

〔実施例 6〕

実施例 5 と同様にして、グリチルリチンについて筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTRPA1チャンネルを活性化するかどうか調べた結果、図 1 7 に示すように、TRPA1チャンネルを介するカルシウム (Ca^{2+}) 流入が活性化した。

【 0 0 8 7 】

〔実施例 7〕

実施例 5 と同様にして、プレドニゾロンについて筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTRPA1チャンネルを活性化するかどうか調べた結果、図 1 8 に示すように、TRPA1チャンネルを介するカルシウム (Ca^{2+}) 流入が活性化した。

【 0 0 8 8 】

〔実施例 8〕

実施例 5 と同様にして、ピルフェニドンについて筋線維芽細胞 (InMyoFib) においてTRPA1チャンネルを活性化するかどうか調べた結果、図 1 9 に示すように、TRPA1チャンネルを介するカルシウム (Ca^{2+}) 流入が活性化した。

【産業上の利用可能性】

【 0 0 8 9 】

本発明に係る抗組織線維化物質のスクリーニング方法および抗組織線維化測定用スクリーニングキットは、任意の物質からTRPA1チャンネル活性化方法によりTRPA1チャンネル活性化物質を選択し、選択したTRPA1チャンネル活性化物質から線維化サイトカインTGF- β 1刺激下で組織線維化マーカーを抑制する抗組織線維化物質をスクリーニングすることができ、得られた抗組織線維化物質は、抗組織線維化薬剤または抗組織線維化機能性食品として有用である。

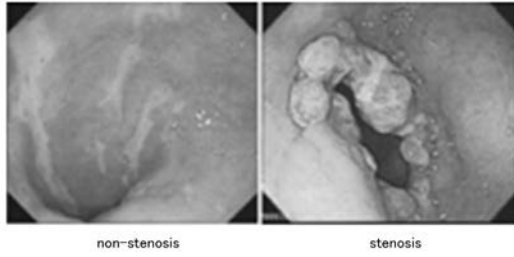
10

20

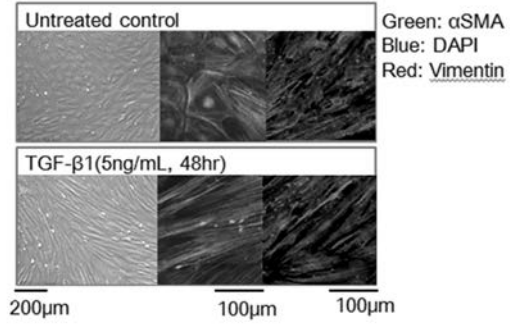
30

40

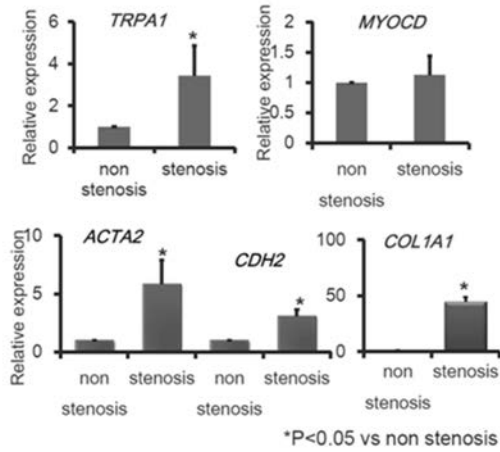
【 図 1 】



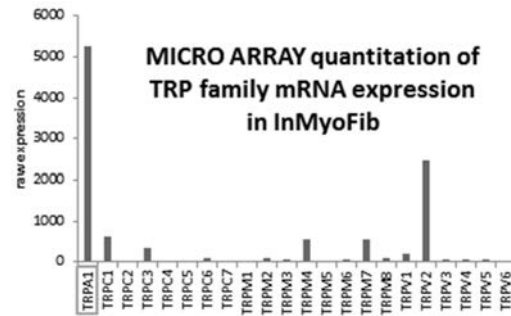
【 図 3 】



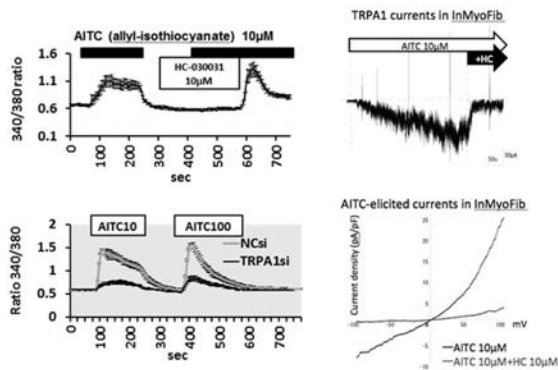
【 図 2 】



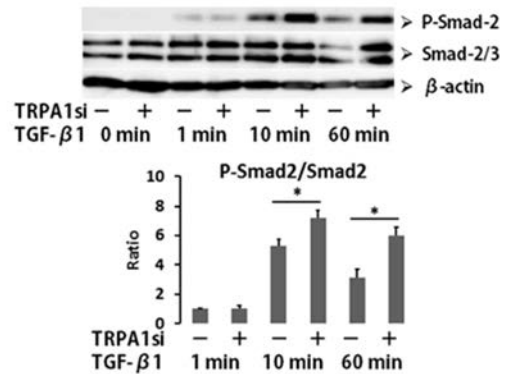
【 図 4 】



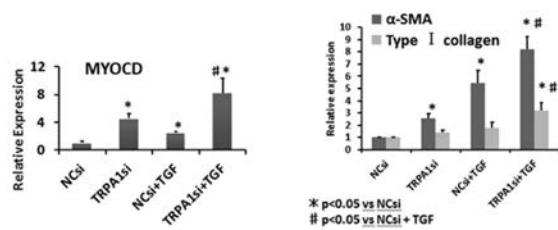
【 図 5 】



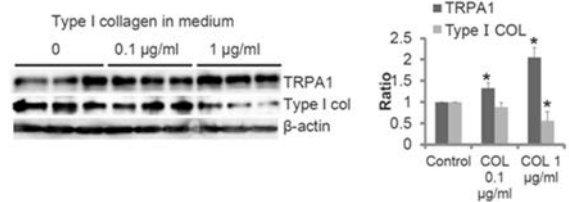
【 図 7 】



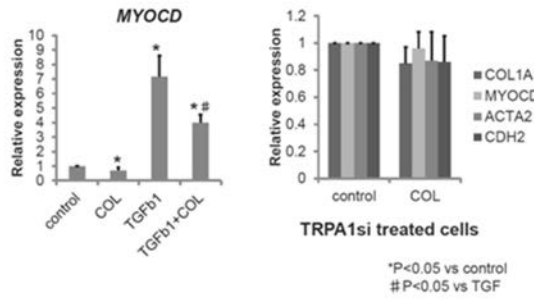
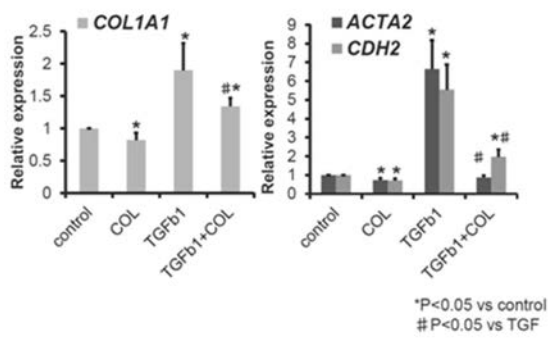
【 図 6 】



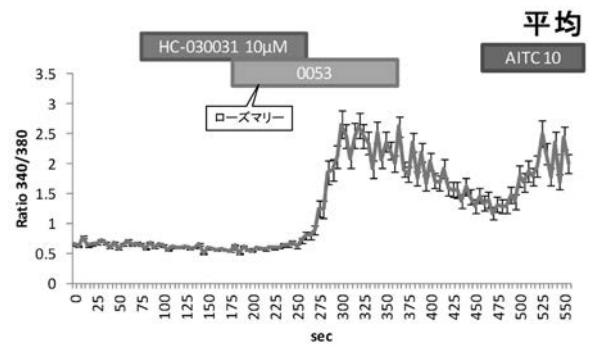
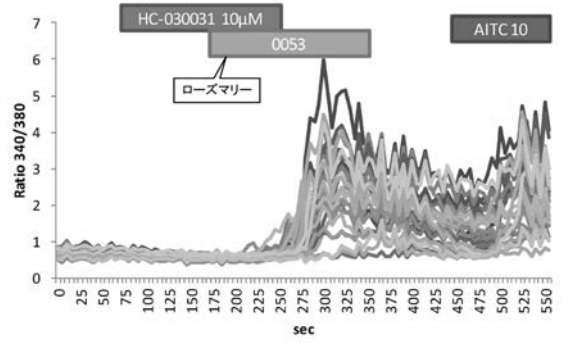
【 図 8 】



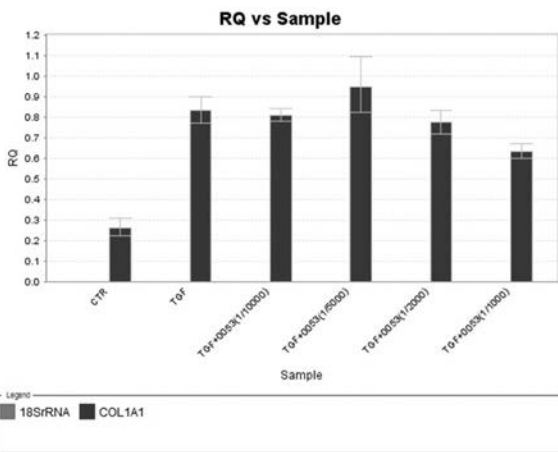
【 図 9 】



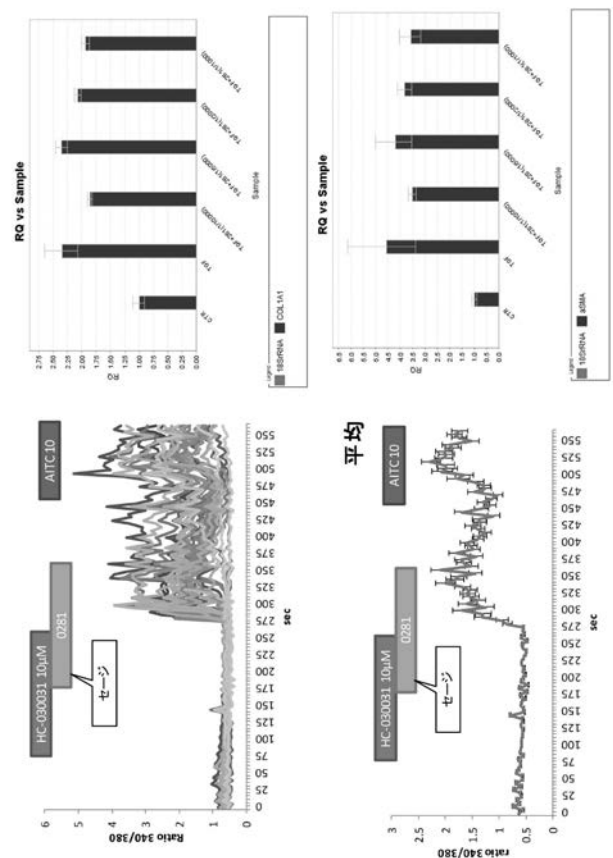
【 図 10 】



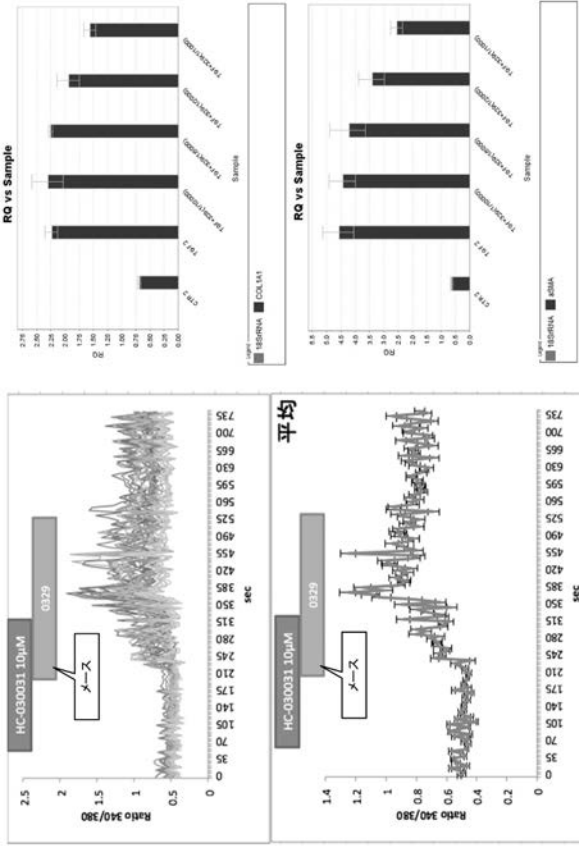
【 図 11 】



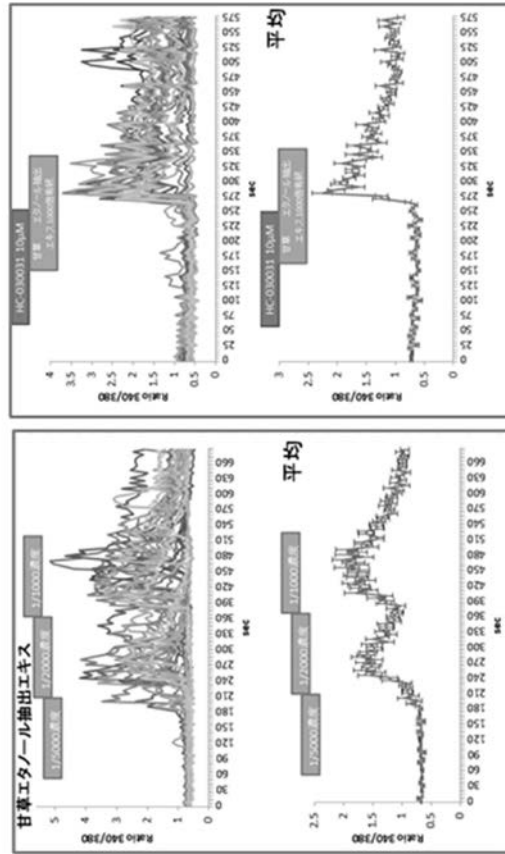
【 図 12 】



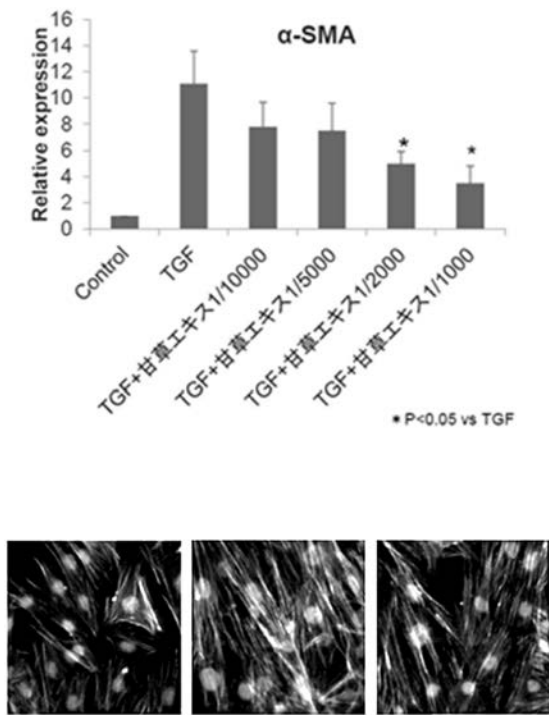
【 図 1 3 】



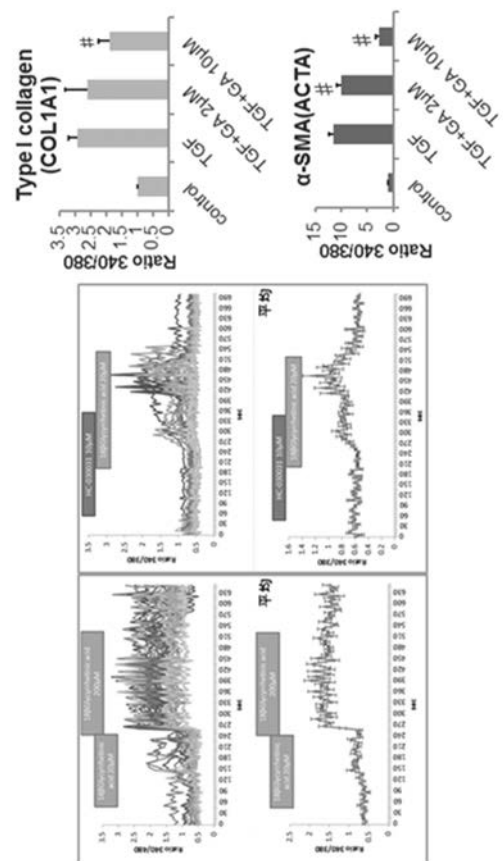
【 図 1 4 】



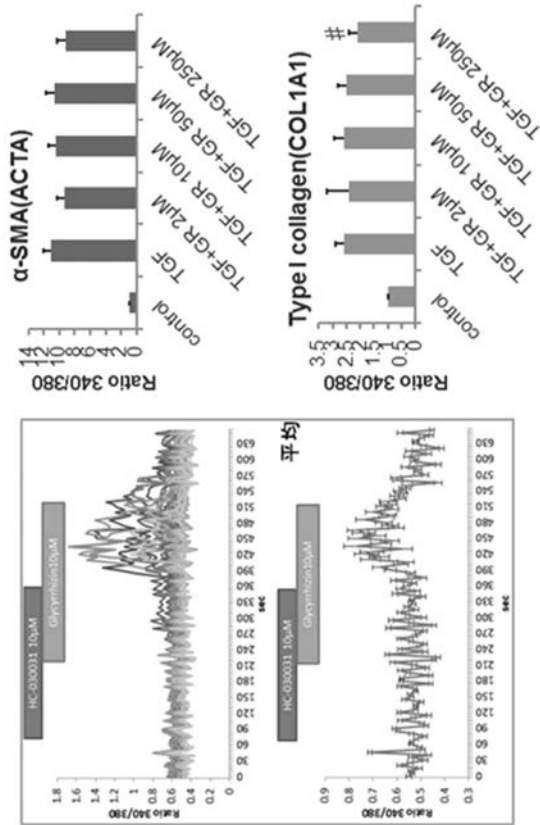
【 図 1 5 】



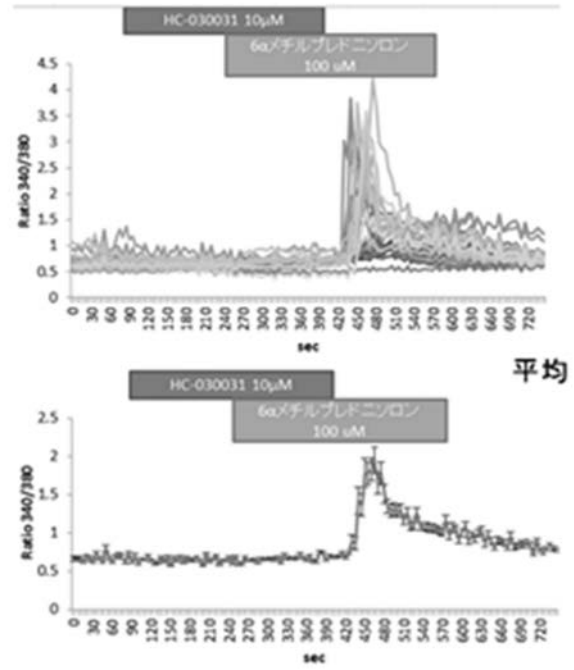
【 図 1 6 】



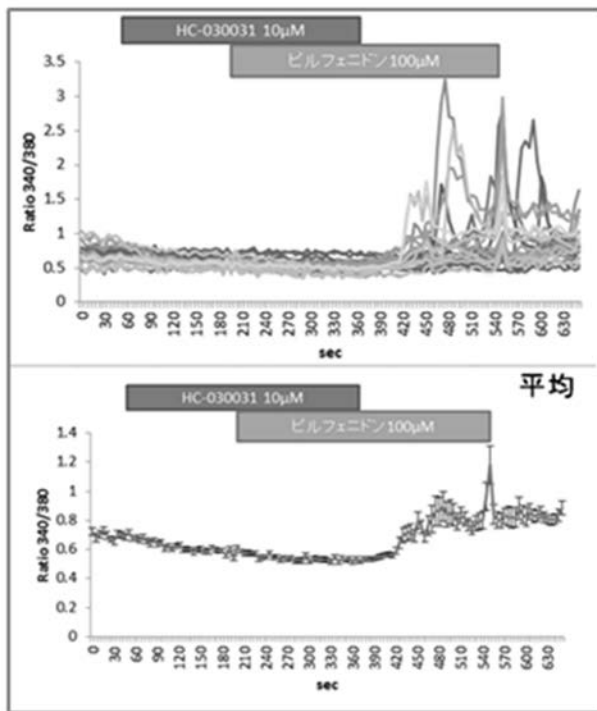
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I			テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A	
A 2 3 L 33/10 (2016.01)	A 2 3 L	1/30	B	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	

F ターム(参考)	4B018	LB05	LB06	LB08	LB10	LE01	LE02	LE03	LE05	MD48	MD63
		MD66									
	4B024	AA11	CA01	CA09	CA11	HA12					
	4B063	QA01	QA18	QQ09	QQ53	QR08	QR42	QR50	QR55	QR62	QR66
		QS25	QS28	QS36	QX01						
	4C088	AB12	AB38	AB57	AC02	BA10	CA06	MA52	NA14	ZB21	ZC41