

(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2015-17082

(P2015-17082A)

(43) 公開日 平成27年1月29日(2015.1.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C07K 14/47 ZNA	4C084
<b>C07K 1/02 (2006.01)</b>	C07K 1/02	4H045
<b>C07K 1/113 (2006.01)</b>	C07K 1/113	
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A61K 37/02	
<b>A61P 25/28 (2006.01)</b>	A61P 25/28	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-239622 (P2013-239622)	(71) 出願人	503360115 独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
(22) 出願日	平成25年11月20日(2013.11.20)	(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2013-125797 (P2013-125797)	(72) 発明者	金井 求 東京都文京区目白台3-9-2-203
(32) 優先日	平成25年6月14日(2013.6.14)	(72) 発明者	相馬 洋平 東京都文京区本駒込1-1-27-904
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	谷口 敦彦 神奈川県横浜市都筑区北山田1-1-52-305
		(72) 発明者	佐々木 大輔 東京都文京区白山2-20-5-308

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Aβペプチド酸化体

(57) 【要約】

【課題】 A ペプチドの凝集抑制剤及び毒性低減剤、並びにアルツハイマー病の予防治療剤の提供。

【解決手段】 A ペプチドを構成する一以上のアミノ酸残基が酸化されている A ペプチド酸化体 (Metのみが酸化されている A ペプチド酸化体を除く)。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

A ペプチドを構成する一以上のアミノ酸残基が酸化されている A ペプチド酸化体 (Met のみが酸化されている A ペプチド酸化体を除く)。

## 【請求項 2】

少なくとも Tyr 及び His から選ばれる一以上のアミノ酸残基が酸化されている請求項 1 記載の A ペプチド酸化体。

## 【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の A ペプチド酸化体を含有する医薬。

## 【請求項 4】

請求項 1 又は 2 記載の A ペプチド酸化体を有効成分とする A ペプチド凝集抑制剤。

## 【請求項 5】

請求項 1 又は 2 記載の A ペプチド酸化体を有効成分とする A ペプチド毒性低減剤。

## 【請求項 6】

請求項 1 又は 2 記載の A ペプチド酸化体を有効成分とするアルツハイマー病の予防及び / 又は治療剤。

## 【請求項 7】

A ペプチドを酸化することを特徴とする、A ペプチドを構成する一以上のアミノ酸残基が酸化されている A ペプチド酸化体 (Met のみが酸化されている A ペプチド酸化体を除く) の製造法。

## 【請求項 8】

A ペプチド酸化体が、少なくとも Tyr 及び His から選ばれる一以上のアミノ酸残基が酸化されている A ペプチド酸化体である請求項 7 記載の製造法。

## 【請求項 9】

A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とする医薬。

## 【請求項 10】

A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とする A ペプチド凝集抑制剤。

## 【請求項 11】

A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とする A ペプチド毒性低減剤。

## 【請求項 12】

A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とするアルツハイマー病の予防及び / 又は治療剤。

## 【請求項 13】

A ペプチドを酸化することを特徴とする A ペプチドの凝集抑制方法。

## 【請求項 14】

A ペプチドを酸化することを特徴とする A ペプチドの毒性低減方法。

## 【請求項 15】

A ペプチドを酸化することを特徴とするアルツハイマー病の予防及び / 又は治療方法

。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、A ペプチド酸化体及びこれを有効成分とするアルツハイマー病の予防治療剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

アルツハイマー病は神経細胞の変性、脱落と共に老人斑の形成と神経原線維変化の病理学的特徴を有する神経変性疾患である。アルツハイマー病は記憶、認識、思考、判断等が進行的に損失する認知症状を引き起こし、最終的に死に至らせる。

脳内に沈着した老人斑を構成する主たる物質はアミロイド ペプチド (A ペプチド)

10

20

30

40

50

であり、39 - 43個のアミノ酸から成る。A ペプチドは細胞毒性を示し、これによりアルツハイマー病が引き起こされると考えられている（非特許文献1）。細胞から分泌されるA ペプチドは主に40個或いは42個のアミノ酸から成るポリペプチドであり、特に42個から成るA ペプチドはより凝集性が強く早期に脳内に沈着すること、及び細胞毒性が強いことが知られている（非特許文献2）。従って、A ペプチドの産生を阻害する薬剤及びA ペプチドの凝集を阻害する薬剤は、アルツハイマー病予防治療薬として期待されている。

A ペプチドの産生を阻害する薬剤としては、A ペプチド産生酵素である - セクレターゼ及び - セクレターゼを阻害する薬剤が研究されている。また、A ペプチドの分解酵素促進剤や抗A ペプチド抗体、さらにA ペプチドの凝集を阻害する薬剤等が研究されている。

10

#### 【0003】

一方、A ペプチドのMet酸化体（A ペプチドのMet残基の硫黄原子が酸化（O）された酸化体）が生体内に少量存在すること、及び当該Met酸化体はA ペプチドに比べて凝集性が低いことが報告されている（非特許文献3～5）。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

#### 【0004】

【非特許文献1】J. Hardy, D. J. Selkoe, Science 2002, 297, p353.

【非特許文献2】S. A. Gravina, et al. J. Biol. Chem., 1995, Vol. 270, p7013

20

【非特許文献3】Hou, L. et al. J. Biol. Chem., 2002, Vol.277, No.43, p40173-40176

【非特許文献4】Bitan, G. et al. J. Am. Chem. Soc., 2003, Vol.125, No.50, p15359-15365

【非特許文献5】Moskovitz, J. et al. Biochemistry, 2011, 50, p10687-10697

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

しかしながら、A ペプチド産生酵素阻害剤では十分にA ペプチドの産生を阻害することができず、また抗A ペプチド抗体は安全性の問題で未だ開発の成功に至っていない。

30

従って、全く新たな視点からA ペプチドの凝集を阻害し、A ペプチドの毒性を低減することによるアルツハイマー病の予防治療剤を開発することが望まれている。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0006】

そこで本発明者は、A ペプチドを人工的に改変することにより凝集を抑制し、毒性を低減させるべく種々検討した。非特許文献3～5によれば、生体内に存在するA ペプチドのMet酸化体はそれ自身が低い凝集性しか示さないことが知られているが、A ペプチドを人工的に酸化して得られた特定のA ペプチド酸化体が、それ自身凝集性を示さないだけでなく、ネイティブA ペプチドの凝集を強力に抑制し、かつネイティブA ペプチドの神経毒性を低減させることから、全く新たなアルツハイマー病の予防治療剤として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

40

#### 【0007】

すなわち、本発明は、次の[1]～[15]を提供するものである。

#### 【0008】

[1] A ペプチドを構成する一以上のアミノ酸残基が酸化されているA ペプチド酸化体（Metのみが酸化されているA ペプチド酸化体を除く）。

[2] 少なくともTyr及びHisから選ばれる一以上のアミノ酸残基が酸化されている[1]記載のA ペプチド酸化体。

[3] [1]又は[2]記載のA ペプチド酸化体を含有する医薬。

50

[ 4 ] [ 1 ] 又は [ 2 ] 記載の A ペプチド酸化体を有効成分とする A ペプチド凝集抑制剤。

[ 5 ] [ 1 ] 又は [ 2 ] 記載の A ペプチド酸化体を有効成分とする A ペプチド毒性低減剤。

[ 6 ] [ 1 ] 又は [ 2 ] 記載の A ペプチド酸化体を有効成分とするアルツハイマー病の予防及び / 又は治療剤。

[ 7 ] A ペプチドを酸化することを特徴とする、A ペプチドを構成する一以上のアミノ酸残基が酸化されている A ペプチド酸化体 ( Met のみが酸化されている A ペプチド酸化体を除く ) の製造法。

[ 8 ] A ペプチド酸化体が、少なくとも Tyr 及び His から選ばれる一以上のアミノ酸残基が酸化されている A ペプチド酸化体である [ 7 ] 記載の製造法。

[ 9 ] A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とする医薬。

[ 10 ] A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とする A ペプチド凝集抑制剤。

[ 11 ] A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とする A ペプチド毒性低減剤。

[ 12 ] A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を有効成分とするアルツハイマー病の予防及び / 又は治療剤。

[ 13 ] A ペプチドを酸化することを特徴とする A ペプチドの凝集抑制方法。

[ 14 ] A ペプチドを酸化することを特徴とする A ペプチドの毒性低減方法。

[ 15 ] A ペプチドを酸化することを特徴とするアルツハイマー病の予防及び / 又は治療方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

本発明の A ペプチド酸化体を用いれば、A の凝集を抑制でき、かつ A による毒性を低減できるため、アルツハイマー病の予防及び / 又は治療に有用である。また、A ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を用いれば、生体内又は細胞内で A ペプチド酸化体が生成する結果として A ペプチドの凝集を抑制し、A ペプチドによる毒性を低減できるためアルツハイマー病の予防及び / 又は治療が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1】光触媒リポフラビンを利用した A 1 - 4 2 の酸化反応を示す。A 1 - 4 2 配列中 \* 印は L y s - C の切断部位。今回酸化が確認されたアミノ酸には下線を付した。

【図 2】質量分析装置 ( M A L D - T O F M S ) による A 1 - 4 2 の酸化反応解析を示す。t は反応時間を表す。

【図 3】アミノ酸分析によるネイティブ A と A 酸化体との比較を示す。括弧内は A 中の理論的なアミノ酸の数を示す。Ratio of amino acid はフェニルアラニンを 3 としたときのサンプル中のアミノ酸のモル比。

【図 4】酵素消化後の L C / M S 解析の L C チャートを示す。L C 条件 : C 1 8 逆相カラム ( 1 5 0 ( 4 . 6 m m ) , 0 % - 1 0 0 % アセトニトリル / 0 . 1 % aqueous TFA 4 0 m i n のグラジエントモード , 流速 0 . 9 m L m i n <sup>-1</sup> , U V 2 3 0 n m で検出。酵素消化後の A フラグメントの理論質量 : A 1 - 1 6 [ M + 2 H ] <sup>2+</sup> : 9 7 7 . 9 , A 1 7 - 2 8 [ M + 2 H ] <sup>2+</sup> : 6 6 3 . 3 , A 2 9 - 4 2 [ M + H ] <sup>+</sup> : 1 2 6 9 . 8 .

【図 5】酵素消化後の質量分析 ( M A L D - T O F M S ) を示す。

【図 6】酵素消化後得られた A 1 - 1 6 の L C / M S / M S 分析を示す。左 3 つは上部に記載の保持時間に検出された M S スペクトル。右チャートは抽出クロマトグラフ。L C c o n d i t i o n s : C 1 8 r e v e r s e - p h a s e c o l u m n ( 1 0 0 ( 1 . 0 m m , 4 0 ) w i t h a b i n a r y s o l v e n t s y s t e m : l i n e a r g r a d i e n t o f 2 % - 4 2 % a c e t o n i t r i l e i n 0 . 1 % a q u e o u s f o r m i c a c i d o v e r 2 0 m i n a t a f l o w r a t e o f 2 0 μ L m i n <sup>-1</sup> .

【図 7】A 1 - 1 6 + 1 6 D a の M S / M S スペクトル ( 図 6 中の保持時間 9 . 2 分のピーク ) を示す。Adduct of 16 Da was observed from b<sub>10</sub> to b<sub>13</sub> and y<sub>7</sub> to y<sub>10</sub> ions, whereas b<sub>2</sub> to b<sub>9</sub> (except for b<sub>4</sub>) and y<sub>1</sub> to y<sub>6</sub> ions were intact, suggesting that +16 D

10

20

30

40

50

a modification occurred at Tyr<sup>10</sup> residue.

【図 8】チロシンおよびヒスチジンにおける酸化修飾構造（推定）を示す。

【図 9】A<sub>1-16</sub>+14 Da の MS / MS スペクトル（図 6 中の保持時間 10.6 分のピーク）を示す。Adduct of 14 Da was observed from b<sub>13</sub> to b<sub>15</sub> and y<sub>4</sub> to y<sub>10</sub> ions, whereas b<sub>6</sub> to b<sub>12</sub> and y<sub>1</sub> to y<sub>3</sub> ions were intact, suggesting that +14 Da modification occurred at His<sup>13</sup> residue.

【図 10】A<sub>1-16</sub>+14 Da の MS / MS スペクトル（図 6 中の保持時間 11.5 分のピーク）を示す。Adduct of 14 Da was observed from b<sub>14</sub> and b<sub>15</sub> and y<sub>3</sub> to y<sub>6</sub> ions, whereas b<sub>6</sub> to b<sub>13</sub> and y<sub>1</sub> and y<sub>2</sub> ions were intact, suggesting that +14 Da modification occurred at His<sup>14</sup> residue.

【図 11】チオフラビンT蛍光アッセイ結果を示す。(n=6, mean((SD; \*\*p<0.01 versus native A<sub>1-42</sub> by Student's t-test).

【図 12】原子間力顕微鏡解析を示す。左はネイティブ A<sub>1-42</sub>、右は酸化型 A<sub>1-42</sub>。t は反応時間を表す。

【図 13】円二色性分光分析を示す。t は反応時間を表す。

【図 14】PC12 細胞によるネイティブ A<sub>1-42</sub> (E, F, G) および A<sub>1-42</sub> 酸化体 (H) の毒性比較を示す。縦軸は細胞生存率。(n=5, mean ± SEM; \*\*\*p<0.001 versus A or in indicated pair by Tukey's test).

【図 15】原子間力顕微鏡解析を示す。左はネイティブ A<sub>1-42</sub> 単独、右はネイティブ A<sub>1-42</sub> + A<sub>1-42</sub> 酸化体。

【図 16】PC12 細胞によるネイティブ A<sub>1-42</sub> 単独 (C) とネイティブ A<sub>1-42</sub> + A<sub>1-42</sub> 酸化体 (D) の毒性比較を示す。縦軸は細胞生存率。(n=6, mean ± SEM; \*\*\*p<0.001 versus A or in indicated pair by Tukey's test)

【図 17】細胞存在下における光酸化反応による細胞生存率の評価を示す。A<sub>1-42</sub> は、ネイティブ A<sub>1-42</sub>。Catalyst 1 は、リボフラビン。Catalyst 2 は、A<sub>1-42</sub> 親和性ペプチド結合フラビンを示す。縦軸は細胞生存率。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体は、A<sub>1-42</sub> ペプチドを構成する一以上のアミノ酸残基が酸化されている A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体 (Met のみが酸化されている A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体を除く) である。

A<sub>1-42</sub> ペプチドは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列 (1-42) を有するか、又は配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の 1-40 アミノ酸配列を有するペプチドである。

【0012】

本発明の A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体は、A<sub>1-42</sub> ペプチドを構成する 40 又は 42 アミノ酸残基のうちの一以上のアミノ酸残基が酸化されていればよいが、少なくとも Tyr 及び His から選ばれる一以上のアミノ酸残基が酸化されている A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体が好ましい。なお、Tyr 及び His から選ばれる一以上のアミノ酸残基が酸化されていれば、さらに Met も酸化されている A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体も含まれる。好ましい A<sub>1-42</sub> ペプチド酸化体としては、Tyr 酸化体、His 酸化体、Tyr 及び His 酸化体、Tyr 及び Met 酸化体、His 及び Met 酸化体、Tyr、His 及び Met 酸化体、並びにこれらの混合物が挙げられる。なお、配列番号 1 中に、Tyr 及び Met はそれぞれ 1 個存在するだけであるから、その Tyr 及び Met が酸化される。一方、His は、6 His、13 His 及び 14 His が存在するので、これらの His の全てが酸化されていてもよいが、13 His 及び 14 His が酸化されているのがより好ましい。酸化の形態としては、酸素による酸化であるのが好ましく、具体的には各アミノ酸残基にヒドロキシ基又はオキシ基 (オキシド) が付加した形態であるのがより好ましい。

【0013】

前記のアミノ酸残基の酸化体としては、マススペクトル分析結果から、Tyr の場合には、チロシン残基のフェニル基にヒドロキシ基が 2 個又は 3 個置換した構造 (ジヒドロキ

10

20

30

40

50

シフェニル基、トリヒドロキシフェニル基)を有しているものと推定される。また、Hisの場合には、ヒスチジン残基のイミダゾール環が酸化された構造、すなわち、デヒドロイミダゾロン環、ヒドロキシイミダゾロン環を有しているものと推定される。また、Metの場合には、メチオニン残基中の硫黄原子に酸素が付加しているものと推定される。

【0014】

本発明のAペプチド酸化体は、例えばAペプチドを酸化することにより製造することができる。酸化反応は、Aペプチドのアミノ酸残基に酸素原子を供給できる酸化反応であればよく、例えば、リボフラビン、チオフラビンT、コンゴレッド、メチレンブルー、ローズベンガル、アクリジン誘導体、ポルフィリンおよびその金属錯体(金属=鉄、マンガン、亜鉛)、ルテニウムトリスピリジン錯体、これらの分子にAペプチド親和性分子を結合させた化合物等の酸化触媒及び酸素の存在下に光を照射する方法、過酸化物、超原子価ヨウ素、過塩素酸等の酸化剤を反応させる方法が挙げられる。

10

【0015】

酸化触媒を用いる方法においては、空気中や溶液中の酸素が利用されるので反応の場合には、Aペプチド及び酸化触媒を添加し、光を照射すればよい。照射する光は、酸化触媒の種類により決定すればよい。この反応は、生理的条件下、例えば30~40で反応が進行するので特に好ましい。

【0016】

酸化剤を用いる方法では、Aペプチド含有液に酸化剤を添加して反応を行えばよい。

【0017】

本発明のAペプチド酸化体は、後記実施例に示すように優れたAペプチド凝集抑制作用、及びAペプチド毒性低減作用を有するため、Aペプチド凝集抑制剤、Aペプチド毒性低減剤、またヒトを含む動物のアミロイド沈着、Aペプチド凝集が関与する疾患、例えばアルツハイマー病、ダウン症等の予防治療薬として有用である。

20

【0018】

また、生体内又は細胞内でAペプチドを酸化すれば、当該生体内又は細胞内で本発明のAペプチド酸化体が生成するため、Aペプチドの凝集抑制、Aペプチドの毒性低減、またアルツハイマー病の予防及び/又は治療が可能である。

【0019】

生体内又は細胞内でAペプチドを酸化するには、生体内又は細胞内に酸化剤又は酸化触媒を導入して酸化反応を生起させればよい。ここで用いられる酸化剤としては、前記Aペプチド酸化体の製造において列挙した酸化剤、例えば過酸化物、超原子価ヨウ素、過塩素酸等が挙げられる。また、前記の酸化触媒と光の反応も用いることができる。光の照射は、例えば光学的治療手段と同様に行えばよい。

30

具体的には、酸化触媒を生体内又は細胞内に導入し、酸化触媒が目的とする部位に移行した時点で光を照射すればよい。生体内への酸化触媒又は酸化剤の投与手段としては、筋肉内注射、静脈内注射、局所投与、経口投与等が挙げられる。

【0020】

生体内又は細胞内で、Aペプチドを選択的に酸化するため、リボフラビンやチオフラビンTに、Aペプチド親和性分子を結合させたリボフラビン誘導体を合成し、これを反応させることも可能である。Aペプチド親和性分子としては、例えばチオフラビンT、コンゴレッド、スチルベン誘導体、ポリチオフエン誘導体、アクリジン誘導体、アミノナフチル誘導体、Lys-Leu-Val-Phe-Phe(配列番号2)誘導体、クルクミン、ミリセチン、リファンピシン、ノルジヒドログアイヤレチン酸が挙げられる。

40

【0021】

生体内又は細胞内でAペプチド酸化体を生成させる成分、すなわち、Aペプチドの酸化剤又は酸化触媒は、Aペプチド凝集抑制剤、Aペプチド毒性低減剤及びアルツハイマー病予防及び/又は治療剤として有用である。

【0022】

本発明の医薬は、前記Aペプチド酸化体、あるいはAペプチドの酸化剤又は酸化触

50

媒を有効成分として含有する。

【0023】

本発明のA ペプチド酸化体、あるいはA ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を人体用の医薬として使用する場合、投与量は成人1日当たり1mg～1g、好ましくは10mgから300mgの範囲である。

【0024】

本発明のA ペプチド酸化体、あるいはA ペプチドの酸化剤又は酸化触媒を含有する医薬組成物は投与法に応じ適当な製剤を選択し、薬学的に許容される担体を用いて各種製剤の調製法にて調製できる。本発明を主剤とする医薬組成物の剤形としては例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤や、液剤、シロップ剤、エリキシル剤、油性ないし水性の懸濁液等を経口用製剤として例示できる。

10

【0025】

注射剤としては製剤中に安定剤、防腐剤、溶解補助剤を使用することもあり、これらの補助剤を含むこともある溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって固形製剤として用時調製の製剤としてもよい。また一回投与量を一の容器に収納してもよく、また多投与量を一の容器に収納してもよい。

【0026】

また外用製剤として液剤、懸濁液、乳濁液、軟膏、ゲル、クリーム、ローション、スプレー、貼付剤等を例示できる。

【0027】

固形製剤としては本発明のA ペプチド酸化体、あるいはA ペプチドの酸化剤又は酸化触媒とともに薬学上許容されている添加物を含み、例えば充填剤類や増量剤類、結合剤類、崩壊剤類、溶解促進剤類、湿潤剤類、潤滑剤類等を必要に応じて選択して混合し、製剤化することができる。

20

液体製剤としては溶液、懸濁液、乳液剤等を挙げることができるが添加剤として懸濁化剤、乳化剤等を含むこともある。

【実施例】

【0028】

以下、本発明を実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明の範囲は下記実施例に限定されることはない。

30

【0029】

実施例1（各実験方法の詳細）

（1）チオフラビンTアッセイの実験

A 1-42（20μM）およびリボフラビン（4μM）が溶解したリン酸緩衝液（10mM，pH7.4）を、蛍光ランプ照射下（24W，昼白色，光源と反応液の距離約3cm）37にてインキュベートした。反応液の一部（10μL）を、チオフラビンT（5μM）を含む50mMグリシン-NaOH緩衝液（pH8.5，400μL）に加え、直ちに混和しチオフラビンTの蛍光強度を測定した。蛍光強度測定において励起波長として440nm、蛍光波長として470nmを用いた。

【0030】

40

（2）原子間力顕微鏡分析の実験

A 1-42（20μM）およびリボフラビン（4μM）が溶解したリン酸緩衝液（10mM，pH7.4）を、蛍光ランプ照射下（24W，昼白色，光源と反応液の距離約3cm）37にてインキュベートした。反応液の一部（10μL）をマイカ上にのせ、室温で3分間インキュベートした後、20μLの水で洗浄し、風乾した。測定は、Nano Wizard II（JPK instruments AG, Berlin, Germany）を使用し、空気中室温にてタッピングモードにより行った。

【0031】

（3）円二色性分光分析の実験

A 1-42（20μM）およびリボフラビン（4μM）が溶解したリン酸緩衝液（1

50

0 mM, pH 7.4) を、蛍光ランプ照射下 (24 W, 昼白色, 光源と反応液の距離約 3 cm) 37 °C にてインキュベートした。反応液の一部を Model 202SF (AVIV Biomedical, Inc., Lakewood, NJ) を使用して分析した。

#### 【0032】

##### (4) 細胞実験

ラット副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞 (理化学研究所から購入) を使用した。A<sub>1-42</sub> (20 μM) およびリボフラビン (4 μM) が溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) を、蛍光ランプ照射下 (24 W, 昼白色, 光源と反応液の距離約 3 cm) 室温にてインキュベートした。反応液の一部 (50 μL) を細胞培養培地 (50 μL) に加え (最終 A<sub>1-42</sub> 濃度は 10 μM)、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C、48 時間インキュベートした。細胞の観察および写真撮影はデジタルカメラ DFC360 FX (Leica Microsystems GmbH) 付き倒立顕微鏡 DM I 6000 B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) にて行った。WST-8 (2-(2-メトキシ-4-ニトロフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム, モノナトリウム塩) を含む生細胞数測定試薬 (10 μL) を加え、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C で 6 時間インキュベートした後、450 nm (参照波長: 655 nm) の吸光度を iMark™ プレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) により測定した。

10

#### 【0033】

##### 実施例 2

##### 酸化反応

A<sub>1-42</sub> (配列番号 1) (20 μM) およびリボフラビン (4 μM) が溶解したリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を、蛍光ランプ照射下 (24 W, 昼白色, 光源と反応液の距離約 3 cm)、37 °C にてインキュベートし (図 1)、質量分析装置 (MALD-TOF MS) にて反応を追跡した (図 2)。反応 3 時間後、原料の A<sub>1-42</sub> の消失とともに、酸素原子が 1-8 個付加した酸化 A<sub>1-42</sub> のスペクトルが観察された。同一試料をアミノ酸分析したところ、チロシンとヒスチジンの量が、酸化していないコントロールサンプルと比べ約半分に減少した (図 3)。同一解析から、メチオニンの若干の減少も観察された。これらの結果から、チロシン、ヒスチジン、メチオニンにて酸化反応が進行したことおよびチロシンとヒスチジンはメチオニンと比べ酸化を受けやすいことが判明した。このように、質量分析測定の結果より、反応 3 時間後、ほとんどの A<sub>1-42</sub> が酸化されていることが判明した。

20

30

#### 【0034】

さらに詳しく酸化構造を解析するために、酸化 A<sub>1-42</sub> のサンプルをエンドペプチダーゼである Lys-C (Lys の C 末端側を切断 (図 1 参照)。Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland から購入) で酵素消化し (酵素は A<sub>1-42</sub> に対して 50 分の 1 の量、37 °C で約 12 時間反応)、得られた消化物を LC/MS (ESI-TOF) および質量分析装置 (MALD-TOF MS) にて分析した。LC/MS 分析において、A<sub>29-42</sub> の 16 Da 付加体が検出された (図 4)。先のアミノ酸分析の結果と合わせると、35 位のメチオニンの側鎖がスルホキシドに酸化されたものと考えられる。また、質量分析装置 (MALD-TOF MS) により A<sub>17-28</sub> が検出され、酸素原子付加体は観察されなかった (図 5)。これは、A<sub>17-28</sub> 領域においては酸化を受けていないことを示すものである。一方、質量分析装置 (MALD-TOF MS) にて A<sub>1-16</sub> に酸素原子が 1-6 個付加したピーク群が見られた (図 5)。さらに、A<sub>1-16</sub> を LC/MS/MS (ESI-Qq-TOF) 解析したところ、A<sub>1-16</sub> への 16 Da 付加体が検出され (図 6, 左下のスペクトル図)、保持時間 9.2 分 (図 6, 右のスペクトル) のピークは 10 位チロシンが +16 Da の修飾を受けている分子種由来であった (図 7)。これはおそらくチロシンが 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンへ酸化されたものと考えられる (図 8)。また、LC/MS/MS (ESI-Qq-TOF) 解析から、A<sub>1-16</sub> への 14 Da 付加体が検出され (図 6, 左真ん中のスペクトル)、保持時間 10.6 分と保持時間 11.5 分 (図 6, 右のスペクトル) が、それぞれ 13 位ヒスチ

40

50

ジンおよび14位ヒスチジンの14Da付加体であることが示唆された(それぞれ図9、図10)。これはおそらくヒスチジンがデヒドロ-2-イミダゾロン誘導体へ酸化されたものと考えられる(図8)。また、28Da付加体、30Da付加体、44Da付加体も検出され、これらは10位チロシン、13位ヒスチジン、14位ヒスチジンでの複合的な酸化に由来するものと考えられる。図5の質量分析(MALD-TOFMS)において酸素原子が1~6個付加したピーク群が見られることを考えると、一つのチロシンやヒスチジンに対して複数の酸素原子が付加した化合物の存在も示唆される。例えば、チロシンにおける3,4,5-トリヒドロキシフェニルアラニンやヒスチジンにおけるヒドロキシ-2-イミダゾロン誘導体が推定される(図8)。(1)Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. & Davies, M. J. Photo-oxidation of proteins. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 38-53 (2012). 2) Schey, K. L. & Finley, E. L. Identification of peptide oxidation by tandem mass spectrometry. *Acc. Chem. Res.* 33, 299-306 (2000)参照)以上のように、リポフラビン触媒システムにより10位チロシン、13位ヒスチジン、14位ヒスチジン、35位メチオニンにおける酸化の進行が確認された。

10

【0035】

## 実施例3

凝集性に関する検討

A 1-42 (20 μM) およびリポフラビン (4 μM) が溶解したリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を、蛍光ランプ照射下 (24 W, 昼白色, 光源と反応液の距離約 3 cm)、37 °C にてインキュベートしたサンプル (「A 酸化体」) と、コントロールとして光非照射下で反応したサンプル (「ネイティブ A」) を使用し、それぞれの凝集性をチオフラビン T アッセイ (チオフラビン T の蛍光強度はシート構造に富んだ凝集体の量と相関することが知られている。) により評価した (図 11)。インキュベート 3 時間および 6 時間において、A 酸化体のチオフラビン T 蛍光強度はネイティブ A と比べ顕著に低く、この結果は、A 酸化体の低い凝集性を示唆するものである。また、原子間力顕微鏡解析より、ネイティブ A では明らかな繊維を形成する一方、酸化型 A では繊維形成がほとんど観察されなかった (図 12)。さらに、円二色性分光分析法により、ネイティブ A ではランダムコイル構造からシート構造への転移が見られる一方、酸化型 A ではランダムコイル構造を維持することが分かった (図 13)。

20

【0036】

## 実施例4

細胞毒性に関する検討

ラット副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞 (神経モデル細胞) を用いて、ネイティブ A と A 酸化体の細胞毒性を比較した (図 14)。ネイティブ A (10 μM) 存在下では 90% 以上の細胞が死滅するのに対し、A 酸化体 (10 μM) 存在下では 50% 以上の細胞生存率が維持された。また、ネイティブ A 存在下でのみアポトーシス様の細胞死が観察された。この結果は酸化修飾により細胞毒性が著しく低下することを示すものである。

30

【0037】

## 実施例5

ネイティブ A の凝集性および細胞毒性の阻害

原子間力顕微鏡解析より、A 酸化体 (20 μM) の共存下ネイティブ A (20 μM) をインキュベートした場合 (37 °C, 6 時間)、ネイティブ A (20 μM) 単独に比べ、アミロイド繊維量が顕著に減少した (図 15)。この結果は A 酸化体がネイティブ A の凝集を阻害したことを示すものである。また、ネイティブ A (10 μM) 存在下では PC12 細胞の生存率が 20% 程度であったのに対し、A 酸化体 (10 μM) をネイティブ A (10 μM) に共存させた場合、細胞生存率が 60% 以上であった (図 16)。この結果は、A 酸化体がネイティブ A の細胞毒性を抑えることを示すものである。

40

【0038】

50

## 実施例 6

ラット副腎髄質由来褐色細胞腫である PC12 細胞（理化学研究所から購入）を使用した。PC12 細胞をシードしたプレートウェル内において、20  $\mu$ M の A および触媒（4  $\mu$ M の 1 または 20  $\mu$ M の 2）を含むリン酸緩衝生理食塩水（pH 7.4, 50  $\mu$ L）に対して 500 nm の LED（light emitting diode）を 15 分、37 °C の条件で照射した。反応後、0.1% の馬血清を含む培地入りの HEPES 緩衝液を 50  $\mu$ L 加え（最終 A 濃度：10  $\mu$ M）、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下 48 時間インキュベートした。WST-8（2-（2-メトキシ-4-ニトロフェニル）-3-（4-ニトロフェニル）-5-（2,4-ジスルホフェニル）-2H-テトラゾリウム，モノナトリウム塩）を含む細胞数測定試薬（10  $\mu$ L）を加え、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37 °C で 6 時間インキュベートした後、450 nm（参照波長：655 nm）の吸光度を iMark™ プレートリーダー（Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA）により測定した。

10

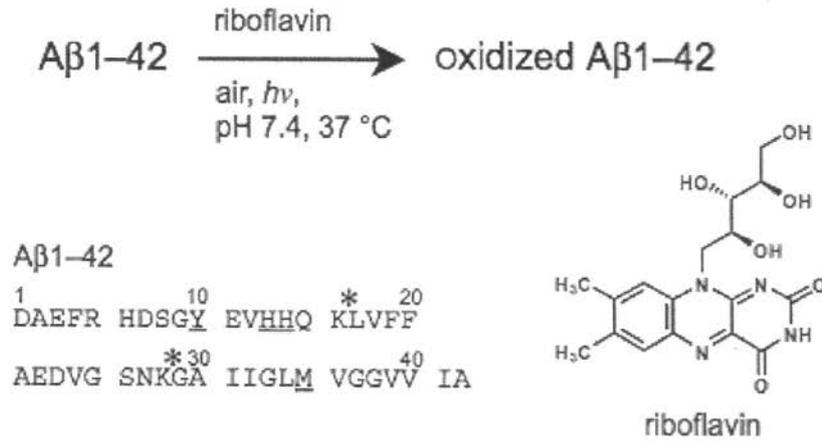
## 【0039】

結果を図 17 に示す。A 選択的な酸素化を達成するために、A に対して高い親和性を持つペプチド、D-[Lys-Leu-Val-Phe(4-phenyl)-Phe]（配列番号 3）を同定し、これを A に親和性を有するタグとしてフラビンに結合した（図 17 中 Catalyst 2）。Catalyst 2 またはリボフラビンそのもの（図 17 中 Catalyst 1）を、A を含むリン酸緩衝液に添加し、細胞存在下光照射を行った。500 nm の LED を光源として使用し、15 分間、37 °C にて光照射した。ここで、Catalyst 2 はリボフラビンそのものと比べて酸化活性が低かったためリボフラビンの 5 倍量使用しており、本条件において、Catalyst 1, 2 は A を同程度（約 60% 程度）酸化することを確認した。本酸化反応後さらに細胞を二日間インキュベートした後の細胞生存率を調べた（図 17 の棒グラフ）。リボフラビンを光照射条件下で使用した際（f と h の比較）、A の有無に関わらずほとんどの細胞が死滅した。これは非特異的な酸化が起こったために細胞が傷害された結果と考えられる。一方、j の条件において、A 非存在下で Catalyst 2 を用いた際、光照射後、50% 以上の細胞が生存した。これは、Catalyst 2 自身の酸化活性が相対的に低いために、生体分子へのランダムな酸化反応が妨げられた可能性が考えられる。一方、A 存在下では（k と l の比較）、光照射した場合、光がない時と比べ細胞生存率が有意に上昇した。これは、A が酸素化反応を受けて無毒化したために、細胞死が回避されたためと考えられる。以上のように、Catalyst 2 を用いることによって、細胞存在下、A 選択的な酸素化反応により、A の毒性を低減することができた。

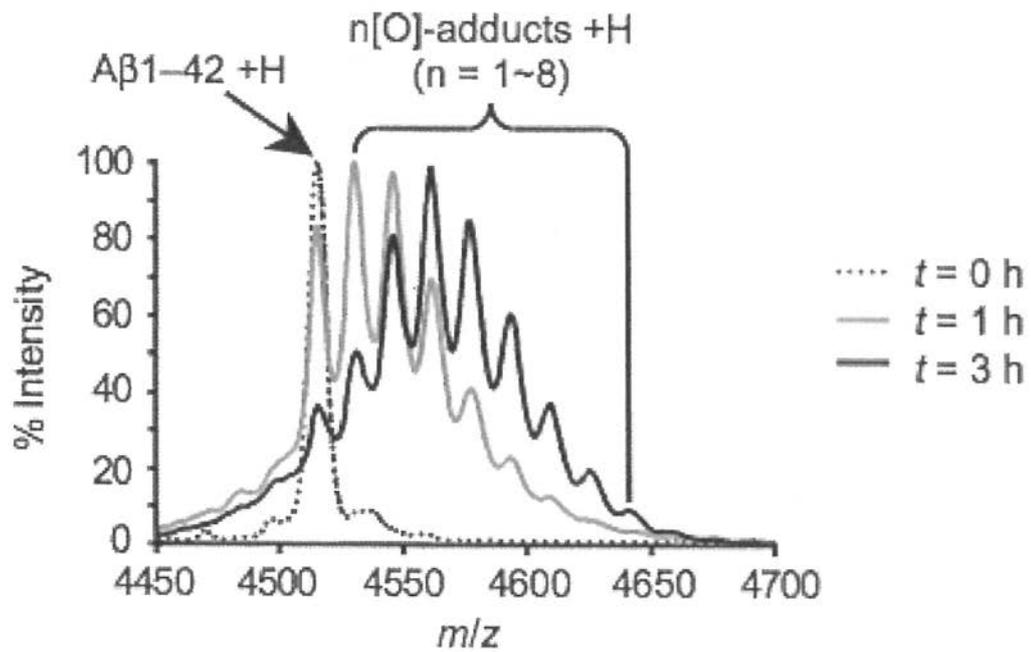
20

30

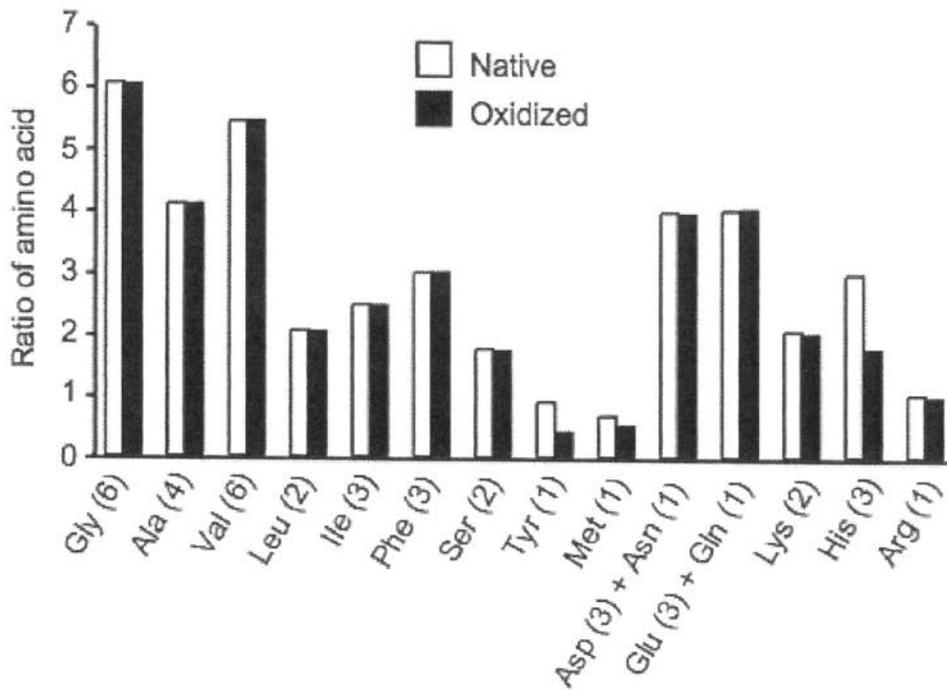
【 図 1 】



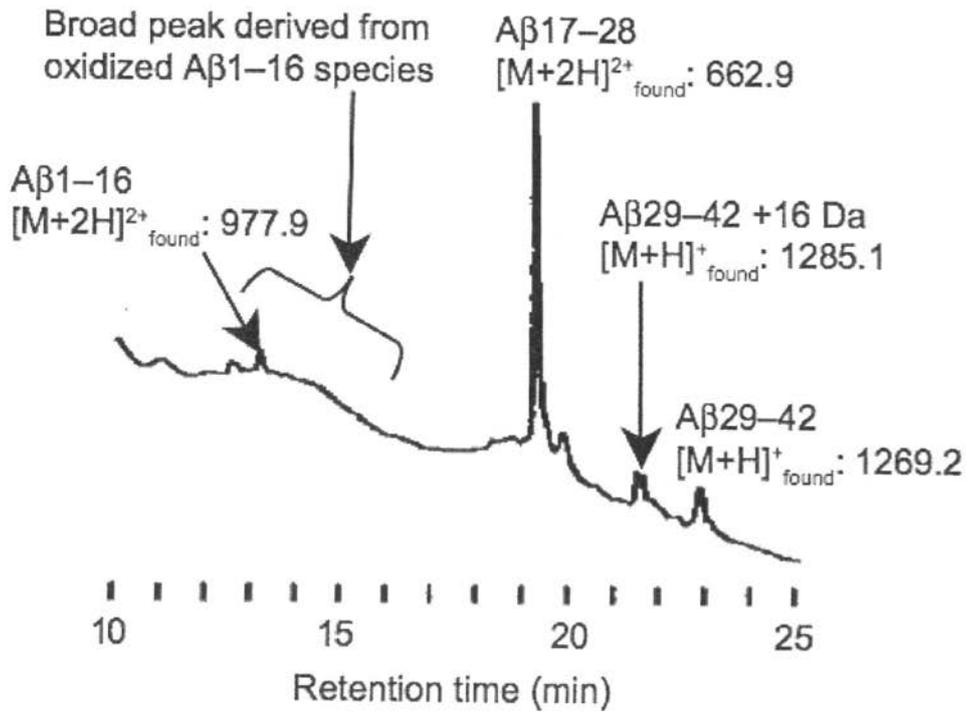
【 図 2 】



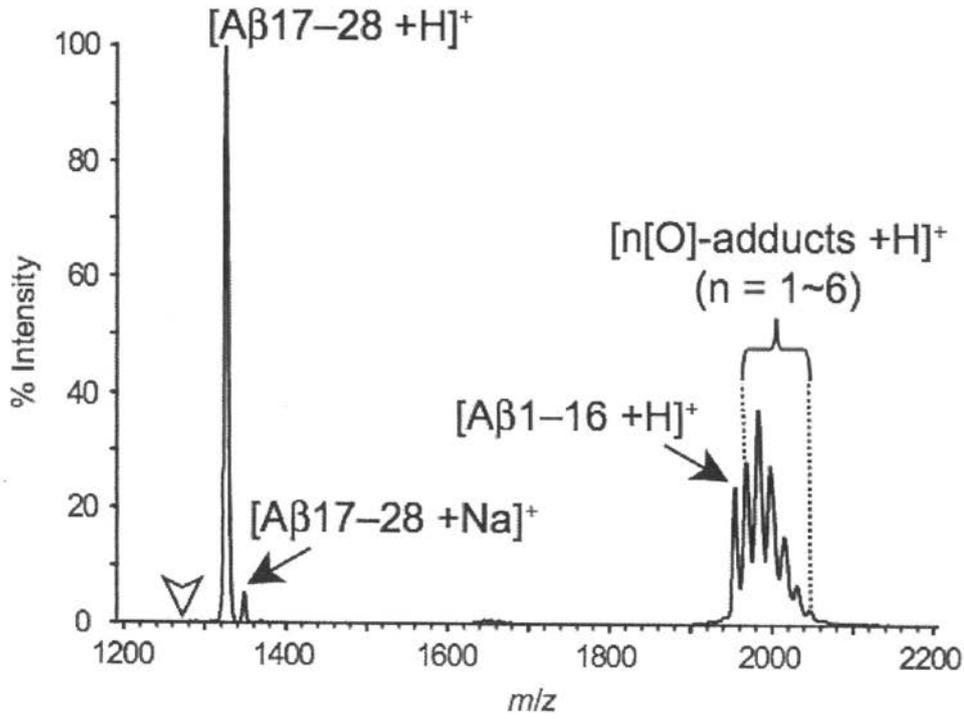
【 図 3 】



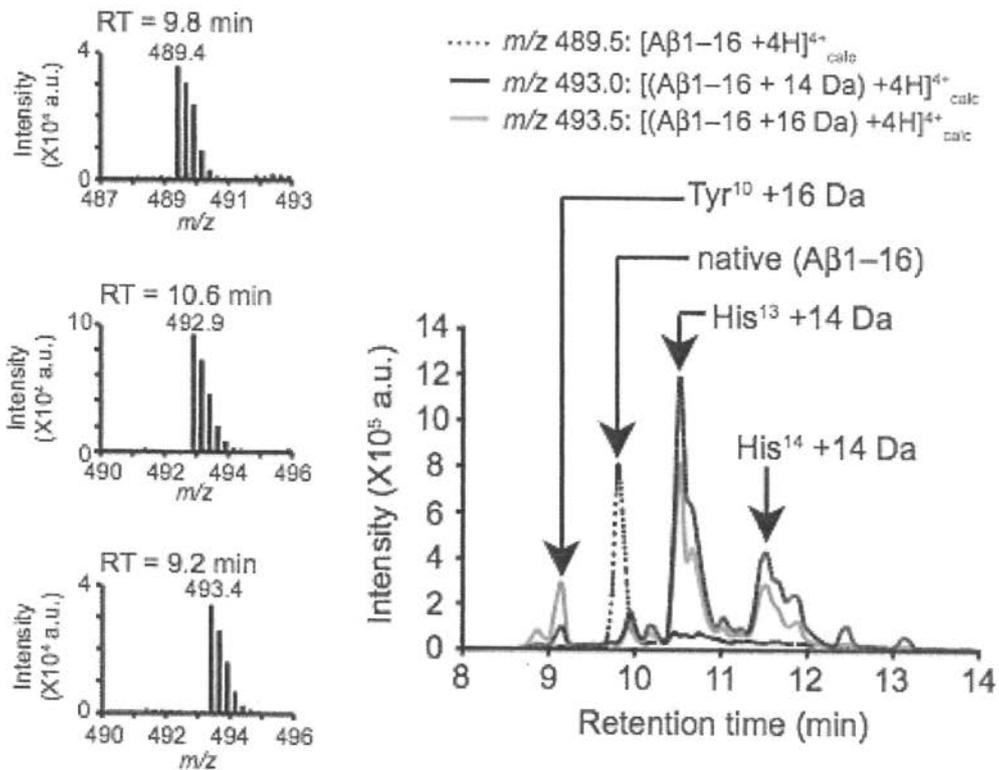
【 図 4 】



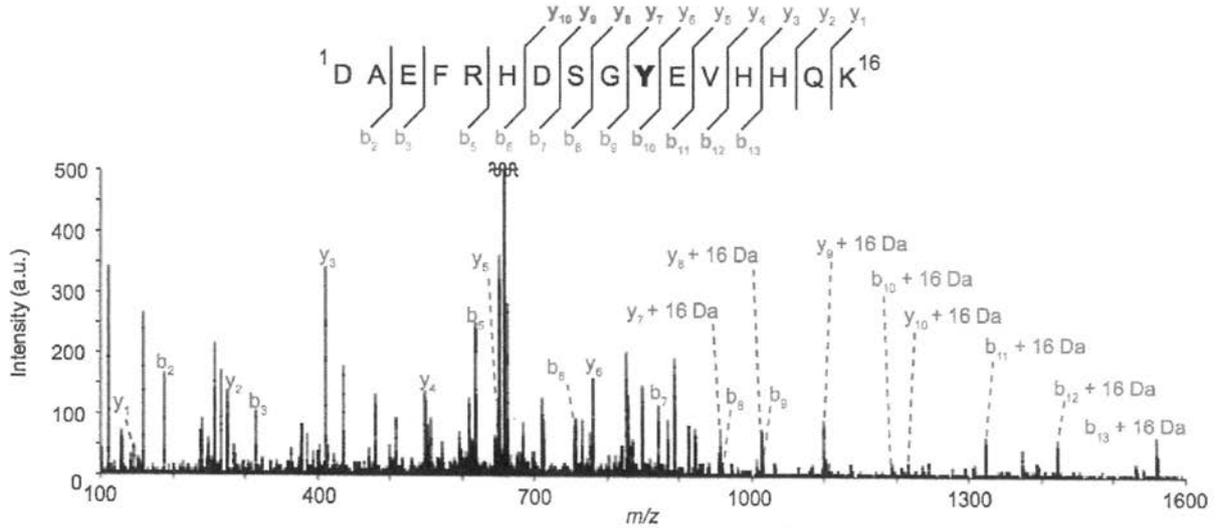
【 図 5 】



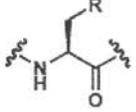
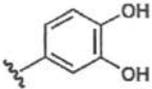
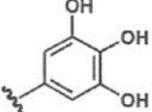
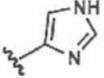
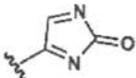
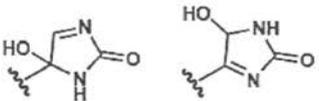
【 図 6 】



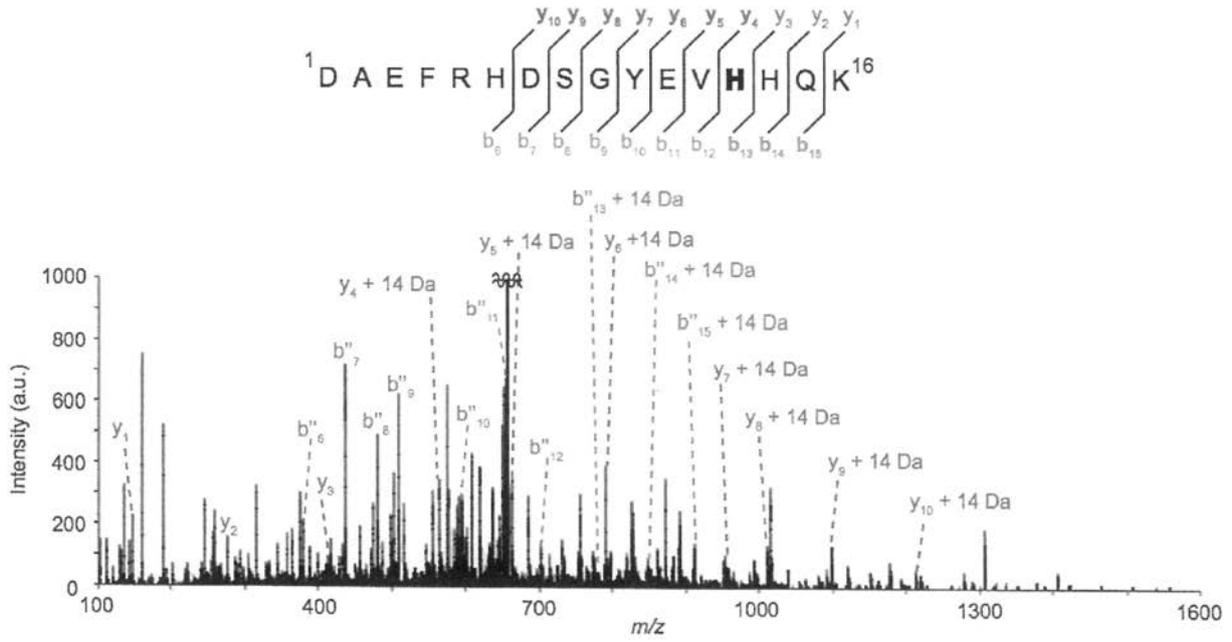
【 図 7 】



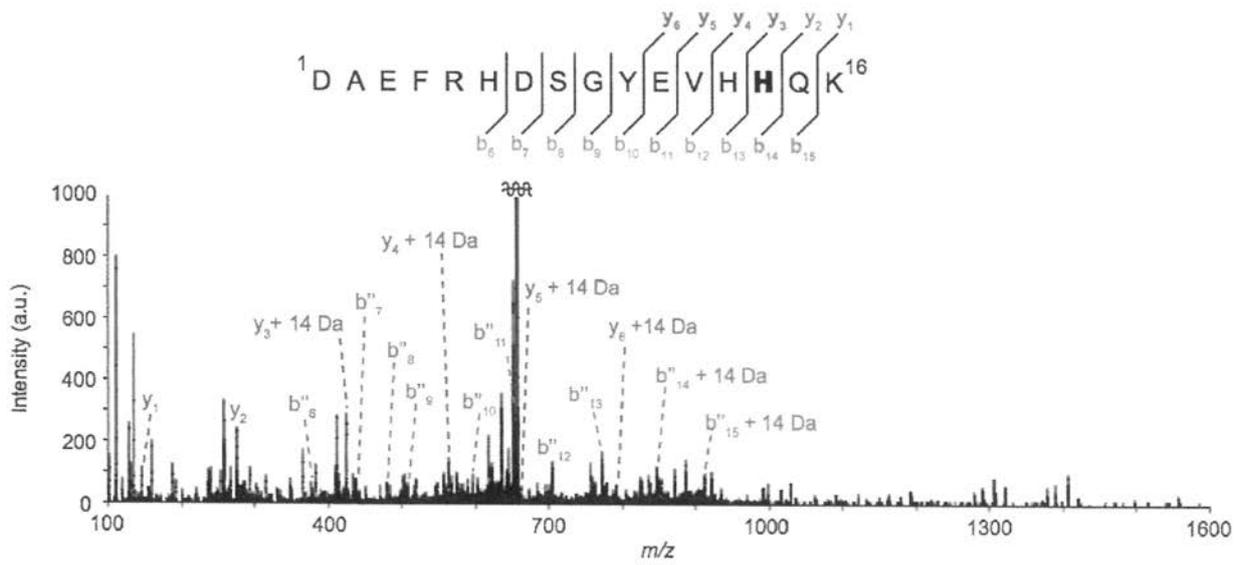
【 図 8 】

amino acid (R)	mass change	plausible product (R)
 tyrosine	+ 16 Da	 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)
	+ 32 Da	 3,4,5-trihydroxyphenylalanine (TOPA)
 histidine	+ 14 Da	 dehydro-2-imidazolone derivative
	+ 32 Da	 hydroxy-2-imidazolone derivatives

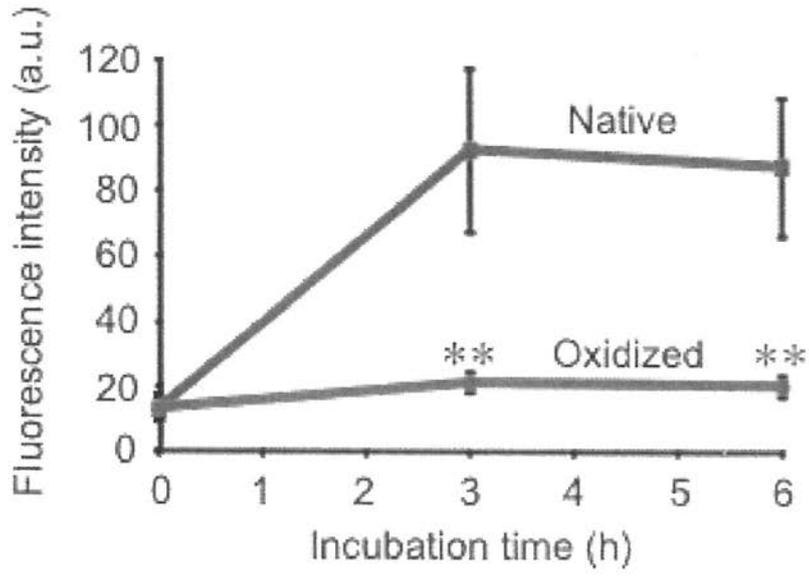
【 図 9 】



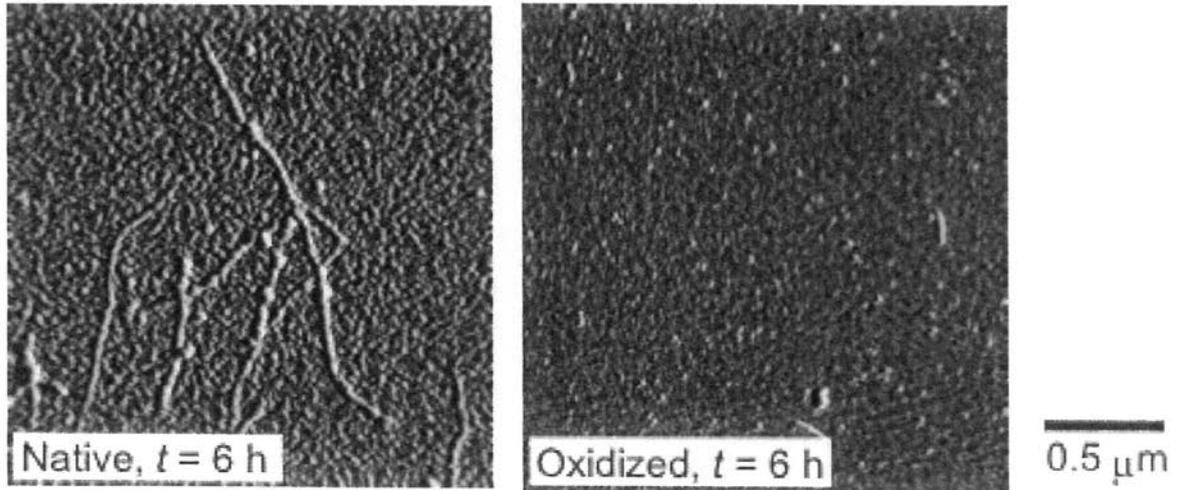
【 図 1 0 】



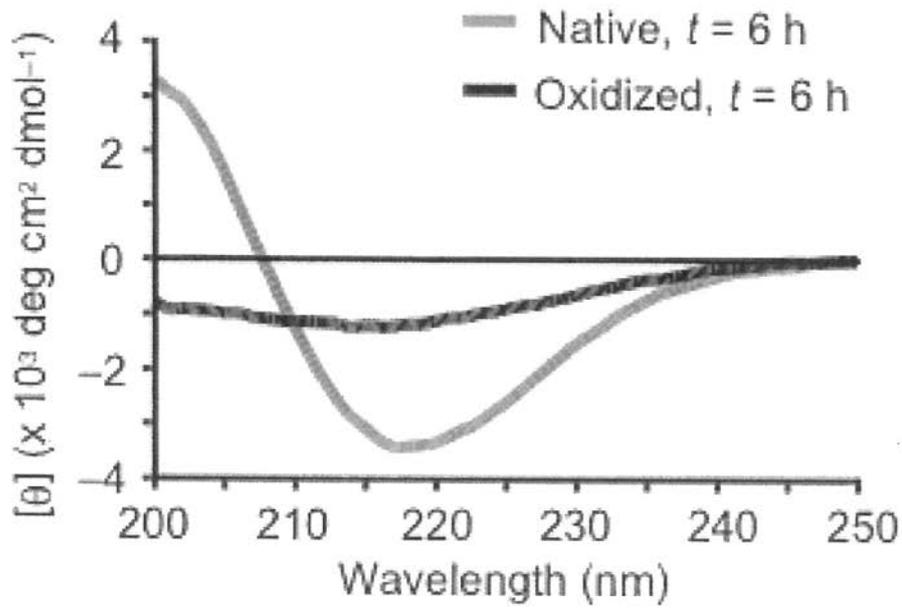
【 図 1 1 】



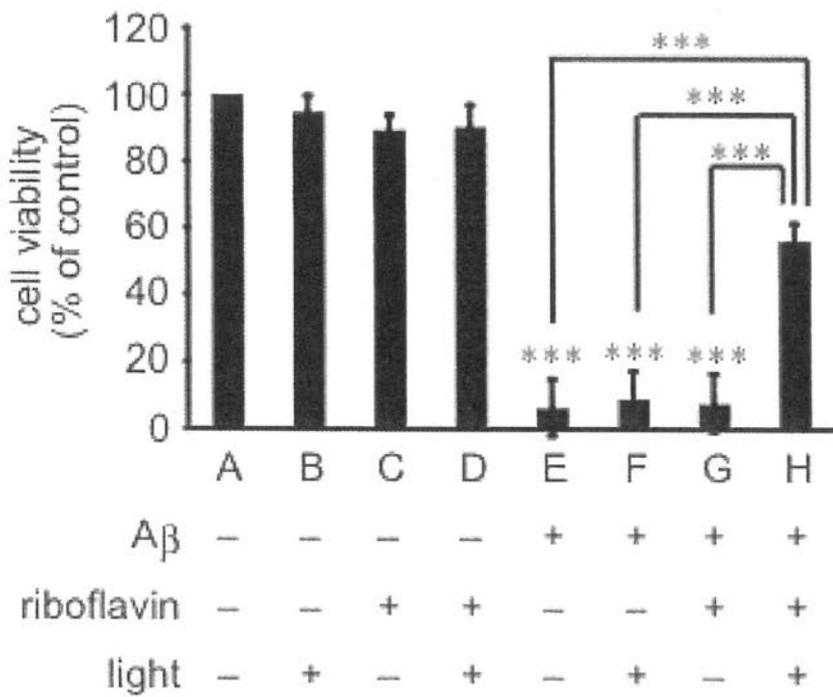
【 図 1 2 】



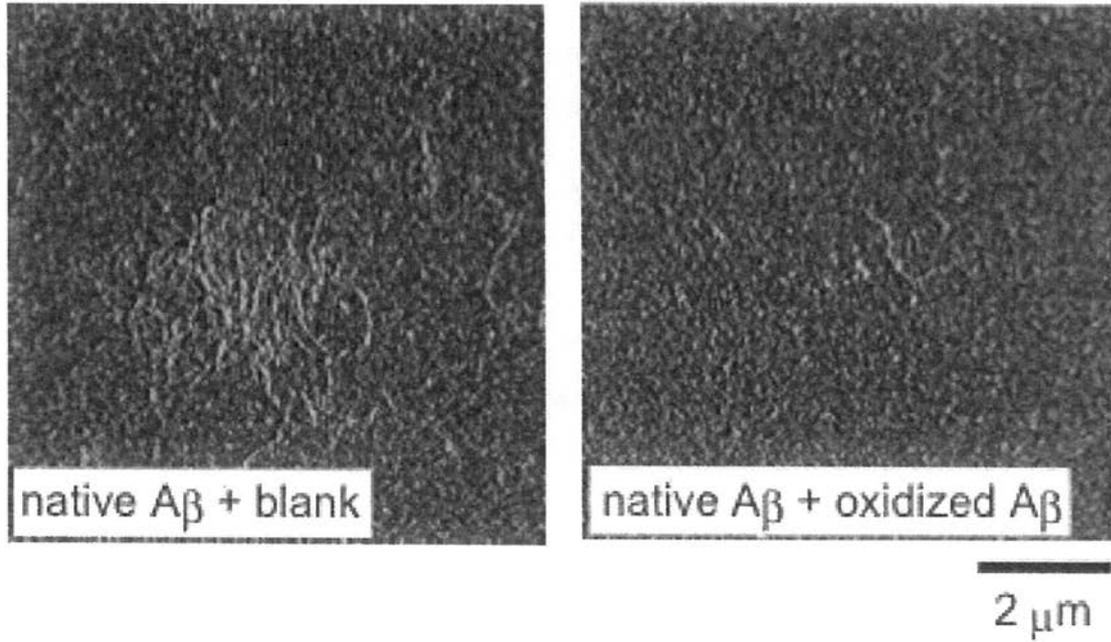
【 図 1 3 】



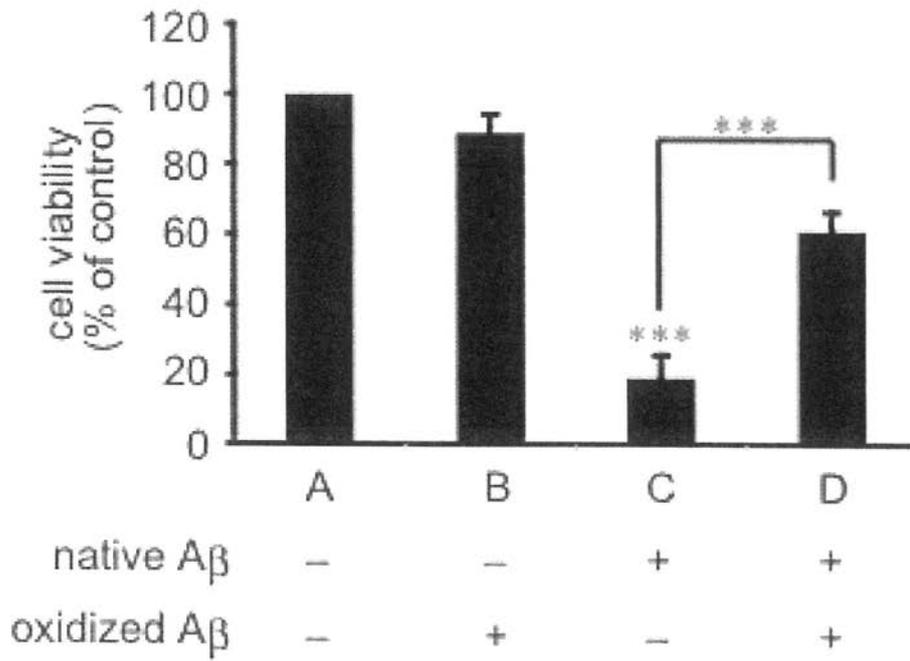
【 図 1 4 】



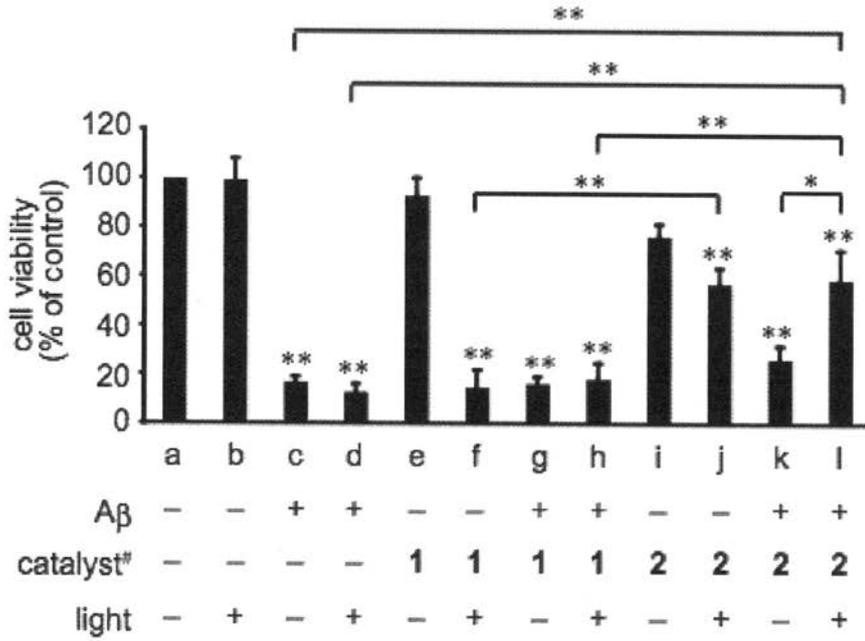
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

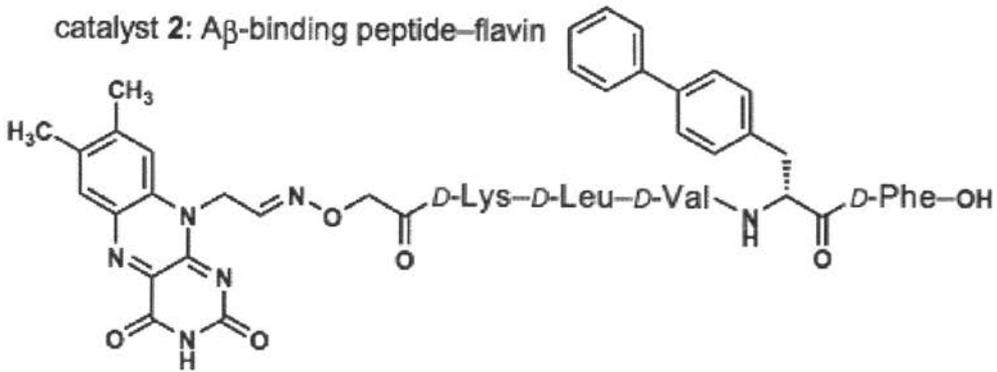


【 図 1 7 】



# catalyst 1: riboflavin

catalyst 2: Aβ-binding peptide-flavin



【 配 列 表 】

2015017082000001.app

---

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 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA06 AA07 AA17 BA01 BA08 BA19 BA31 CA18 CA28  
CA59 NA14 ZA16  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 FA52 FA65