

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7012658号

(P7012658)

(45)発行日 令和4年2月14日(2022.2.14)

(24)登録日 令和4年1月20日(2022.1.20)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/203 (2006.01)

A 6 1 K 31/203

A 6 1 K 31/07 (2006.01)

A 6 1 K 31/07

A 6 1 K 31/192 (2006.01)

A 6 1 K 31/192

A 6 1 P 25/28 (2006.01)

A 6 1 P 25/28

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 12 (全28頁)

(21)出願番号 特願2018-549168(P2018-549168)

(86)(22)出願日 平成29年3月10日(2017.3.10)

(65)公表番号 特表2019-512507(P2019-512507  
A)

(43)公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/021799

(87)国際公開番号 WO2017/160629

(87)国際公開日 平成29年9月21日(2017.9.21)

審査請求日 令和2年3月9日(2020.3.9)

(31)優先権主張番号 62/308,374

(32)優先日 平成28年3月15日(2016.3.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 517318218

ラッシュ ユニヴァーシティ メディカル  
センター

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 6 1 2

シカゴ ウェスト コンGRESS パークウ

エイ 1 6 5 3

(74)代理人 100094569

弁理士 田中 伸一郎

(74)代理人 100088694

弁理士 弟子丸 健

(74)代理人 100103610

弁理士 吉 田 和彦

(74)代理人 100084663

箱田 篤

(74)代理人 100093300

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミロイド タンパク質の排出を刺激する組成物及び方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対象の脳内のアミロイド タンパク質集合体を低減するための組成物であって、治療効果量のビタミンA又はレチノイン酸と増殖因子活性化受容体（「PPAR」）のアゴニストの組合せを含み、前記PPARのアゴニストがゲムフィブロジルであり、前記治療効果量がアストロサイトによるアミロイド タンパク質の取り込みを刺激し、かつアストロサイトにおけるアミロイド タンパク質の分解を刺激する量である、組成物。

## 【請求項2】

前記組成物がレチノイン酸を含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項3】

前記組成物が少なくとも1つの薬学的に許容される担体を更に含む、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項4】

前記組成物が経口投与されるための組成物である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項5】

前記組成物が、皮下、関節内、皮内、静脈内、腹腔内及び筋肉内経路から成る群より選択される経路によって投与されるための組成物である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項6】

前記組成物が、直接対象の中樞神経系に投与されるための組成物である、請求項1に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記対象が、アルツハイマー病の症状を示す対象である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 8】

対象の脳内のアミロイド タンパク質集合体を低減するための組成物であって、治療効果量のレチノイン酸とグムフィブロジルの組合せを含み、前記治療効果量がアストロサイトによるアミロイド タンパク質の取り込みを刺激し、アストロサイトにおけるアミロイド タンパク質の分解を刺激し、かつ対象の脳内のアミロイド タンパク質集合体を低減する量であり、前記組成物が少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体を更に含む、組成物。

## 【請求項 9】

前記組成物が経口投与される、請求項 8 に記載の組成物。

10

## 【請求項 10】

前記組成物が、皮下、関節内、皮内、静脈内、腹腔内及び筋肉内経路から成る群より選択される経路によって投与される、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 11】

前記組成物が、直接対象の中樞神経系に投与される、請求項 8 に記載の組成物。

## 【請求項 12】

前記対象が、アルツハイマー病の症状を示す対象である、請求項 8 に記載の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

20

(関連出願との相互参照)

本特許出願は、2016年3月15日に出願された米国仮特許出願第62/308,374号の出願日の利益を請求するものであり、参照によりその内容を本明細書に援用する。本発明は、一般的に、アミロイド タンパク質集合体のアストログリアによる取り込み及び分解を刺激するための組成物及び方法に関連する。本発明の一態様は、臨床的に効果のある量のビタミンA又はその誘導体と増殖因子活性化受容体(「PPAR」)のアゴニストの組合せを、そのような治療を必要とするヒト又は獣医学的対象に投与することを含む、アルツハイマー病を予防又は治療する方法を提供する。

## 【背景技術】

## 【0002】

30

アルツハイマー病は、古典的な記憶障害と認知障害を伴う進行性の神経変性疾患である。アルツハイマー病の病理学的特徴は、アミロイド オリゴマー(A<sub>40/42</sub>)で構成される老人斑(SP)の存在、及び神経原繊維濃縮体(NFT)の形成であり、脳の皮質及び海馬中でのタウの異常リン酸化に起源がある(1, 2)。A<sub>40/42</sub>の異常蓄積及びNFTの形成は、神経炎症及びそれに伴うニューロン損傷を誘発し、アルツハイマー病の主要な原因となる(3)。

集合傾向のあるA<sub>40/42</sub>断片は、アミロイド先駆タンパク質(APP)上のβ-及びγ-セクレターゼの連続的な活動により生成され、β-セクレターゼの活動は、集合傾向にはない溶解性APP(sAPP)断片を産生する(4, 5)。β-セクレターゼは主として形質膜に結合するが、多くのβ-セクレターゼは、エンドソーム-リソソームコンパートメントに存在する(6, 7)。加えて、いくつかのカテプシン(D及びE)は、β-及びγ-セクレターゼ類似の活動を示すことができた(8)。APPの処理は分泌経路又はエンドソーム-リソソーム経路のいずれかで起こり得る。新たに合成されたAPPは、形質膜に運ばれ、そこで主にβ-セクレターゼによって処理されるか(分泌経路)、時にはAPPはエンドサイトーシスによってエンドソームにリサイクルされ、そこでβ-及びγ-セクレターゼによって処理され(エンドソーム-リソソーム経路)、A<sub>40/42</sub>断片を生成するかのいずれかが可能である(9, 10)。

40

通常条件下では、リソソーム中の他のプロテアーゼ(主にカテプシンB)による更なる切断がA<sub>40/42</sub>断片をさらに小さな無害な断片に分解し、それはリサイクル又は細胞から抹消される(11)。また、インビトロ、インビボの両方の条件で、細胞外A<sub>40/42</sub>はまたエンドサ

50

イトーシスされ、リソソーム中で分解されることができた(12)。老化又はその他の病的状況によるリソソーム機能の低下は、リソソーム内でのAβ断片の異常蓄積及びリソソーム負荷の増加をもたらす。これが、リソソーム膜の破裂につながる可能性があり、それにより毒性のAβが細胞基質に放出されるのみならず、ネクローシス性又はアポトーシス性の細胞死を開始することができるリソソーム膜透過性(LMP)を誘発する(13)。したがって、リソソーム機能の向上が、アルツハイマー病におけるAβ排出の可能性ある治療機構となり得る、ということが肝要である。

#### 【発明の概要】

##### 【0003】

##### (好ましい実施形態の概要)

ある態様において、本発明は、そのような治療を必要とする対象に、治療効果量の増殖因子活性化受容体(「PPAR」)のアゴニストとビタミンA又はその誘導体の組合せを含む組成物を投与することを含む対象の脳内におけるアミロイドタンパク質集合体を低減させる方法を提供する。ある実施形態において、前記アゴニストは、両親媒性のカルボン酸である。別の実施形態では、アゴニストは、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、シプロフィブラート、ベザフィブラート、クリノフィブラート又はフェノフィブラートである。前記組成物はまた少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含むことができる。別の実施形態では、治療効果量は脳内に存在するアストロサイトによるアミロイドタンパク質の取り込みを刺激する量である。また別の実施形態において、治療効果量は、そのようなアストロサイトによるアミロイドタンパク質の分解を刺激する量である。

##### 【0004】

対象はヒト、例えば、アルツハイマー病の症状を提示するヒト対象であってよい。前記組成物は経口投与されてよい。代替的に、前記組成物は、皮下、関節内、皮内、静脈内、腹腔内又は筋肉内経路で投与される。別の実施形態では、前記組成物は、直接中枢神経系に投与される。

本発明の別の態様は、治療効果量の増殖因子活性化受容体(「PPAR」)のアゴニストを含む組成物を対象に投与することを含む、対象の脳の脳内アミロイドタンパク質集合体を低減するための方法を提供する。特定の実施形態では、前記アゴニストは、両親媒性カルボン酸である。前記アゴニストは、例えば、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、シプロフィブラート、ベザフィブラート、クリノフィブラート又はフェノフィブラートであってよい。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0005】

【図1A-B】図1(A-B)は、GFBとRA処置が、マウス初代アストロサイトにおけるAβ取り込みを向上させることを示す。図1(A)において、マウス初代アストロサイトを、24時間、GFBとRAで処置し、続いて、500nMのFAM-タグ付加Aオリゴマー(1-42)とともに、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、8時間インキュベートした。Aβ取り込みアッセイは本明細書に記載の方法で実施した。データはDMSO処置対照との比較によるパーセンテージ変化で示す。図1(B)は、マウス初代アストロサイトをGFB及びRAで処置し、500nMのHF-A(1-42)及び75nMのLysoTracker Redとともに観察前にインキュベートしたものの顕微鏡写真を示す。スケールバー=20μM。p\* < 0.05、DMSO処置対照に対して。全てのデータは3つの独立した実験の平均±標準誤差を表す。

【図2A-D】図2(A-C)は、HSPG、TFEB及びLDLRの、マウス初代アストロサイトにおけるGFB及びRA仲介Aβ取り込みにおける効果を示す。図2(A)：マウス初代アストロサイトをDMSO又はGFB-R Aで処置し、続いてヘパリン希釈物(100μg/ml)で処置し、更に500nMのFAM-Aβ中で4時間インキュベートした。Aβ取り込みアッセイを実施し、データを非処置対照に対するパーセンテージ変化で表す。図2(B)：マウス初代アストロサイトにスクランブルsiRNA、Tfeb siRNA又はLDLR siRNAを形質移入し、GFB-R Aで処置し、続いて50

10

20

30

40

50

0 nMのFAM-A 中で4時間インキュベートした。A 取り込みアッセイからのデータは、DMSO及びスクランブルs iRNA処置対照に対するパーセンテージ変化で表す。図2C：定量RT-PCRを実施し、s iRNAによるLDLRサイレンシングの有効性及びPPAR (-/-)細胞のLDLRレベルを測定した。図2(D)：定量RT-PCRを実施し、s iRNAによる、TFEBサイレンシングの効果を測定した。p\* < 0.05、対象に対して；ns - 有意差なし。全てのデータは3つの独立した実験の平均±標準誤差を表す。

【図3A-D】図3(A-D)は、GFB及びRA処置が、マウス初代アストロサイト中のA 分解を向上させることを示す。図3(A)：マウス初代アストロサイトを24時間GFB及びRA処置し、続いて500 nMのFAM-タグ付加A オリゴマー(1-42)とともに4時間インキュベートし、A を含まない培地で15分、30分、1時間、2時間、4時間、6時間及び8時間成長させた。A 分解アッセイを方法セクションに記載のとおり実施した。データは、非洗浄対照との比較によるパーセンテージ変化で表した。図3(B)：GFB及びRA処置したマウス初代アストロサイトを、500 nMのHF-A (1-42)とともにインキュベートし、4時間及び6時間洗浄して、更に75 nMのLysoTracker Redとともにインキュベートし、顕微鏡下で観察した。スケールバー = 20 µm。p\* < 0.05、非洗浄対照に対して。図3(C)：マウス初代アストロサイトをGFB及びRAで24時間処置し、続いて100 nMのパフィロマイシンA1とともに45分間処置して、500 nMのFAM-A とともにインキュベートし、A を含まない培地で6時間洗浄し、分解アッセイを実施した。データは、非洗浄対照に対するパーセンテージ変化で表す。図3(D)：DMSO又はGFB-RAとともに処置する前に、スクランブルs iRNA又はTfeb s iRNAのいずれかを形質移入したマウス初代アストロサイトでA 分解アッセイを行った。データは、DMSO処置し、スクランブルs iRNAを形質移入した対照と比較する。p\* < 0.05、対照に対して：ns - 有意差なし。全てのデータは3つの独立した実験の平均±標準誤差を表す。全てのデータは3つの独立した実験の平均±標準誤差を表す。

【図4A-E】図4(A-E)は、マウス初代アストロサイト中のA 取り込み及び分解におけるPPAR 及びPPAR の役割を示す。図4(A)：PPAR (-/-)、PPAR (-/-)及びWT動物から単離したマウス初代アストロサイトを単離し、GFB-RA又はDMSOで処置し、続いて500 nMのFAM-A とともにインキュベートし、A 取り込みアッセイに供した。データをDMSO処置したWT対照と比較し、パーセンテージ変化で表した。p\* < 0.05、対照に対して：ns - 有意差なし。図4(B)：PPAR (-/-)、PPAR (-/-)及びWT動物から単離したマウス初代アストロサイトを単離し、GFB-RAで処置し、続いて500 nMのFAM-A で4時間インキュベートし、A を含まない培地で6時間洗浄し、A 分解アッセイに供した。データの分析は「議論」の箇所で詳細に記載する。p\* < 0.05、対照に対して：ns - 有意差なし。WT(図4(C))、PPAR (-/-)(図4(D))及びPPAR (-/-)(図4(E))動物から単離されたマウス初代アストロサイトを単離し、DMSOで処置し、続いて500 nMのHF-647-A とともに4時間、75 nMのLysoTrackerで45分間インキュベートし(第1パネル)、GFB-RAで処置し、続いて500 nMのHF-647-A とともに4時間、75 nMのLysoTrackerで45分間インキュベートし(第2パネル)、GFB-RAで処置し、続いて500 nMのHF-647-A とともに4時間インキュベートし、A を含まない培地で6時間洗浄して、75 nMのLysoTracker中で45分間インキュベートし(第3パネル)、顕微鏡下で観察した。スケールバー = 20 µm。全てのデータは3つの独立した実験の平均±標準誤差を表す。

【図5A-F】図5(A-F)は、GFB-RA処置がリソソーム活動をオートファジーフラックスと同様増加させたことを示す。図5(A-B)マウス初代アストロサイトを、形質移入しないか、スクランブルs iRNA又はTfeb s iRNAを形質移入して、DMSO又はGFB-RAで処置した。全細胞抽出を調製し、CtsB(A)及びCts

10

20

30

40

50

D ( B ) のためカテプシンアッセイ ( 本明細書に詳細記載する ) に供した。図 5 ( B ) D M S O 又は G F B - R A で処置した細胞からの全細胞抽出を用いて C t s B 及び C t s D のレベルについてイムノプロットを実施した。図 5 ( D ) イムノプロットの濃度測定分析、 $\alpha$ -アクチンで正規化。図 5 ( E ) 1 0 0 n M パフィロマイシン A 1 又は 5 0 0 n M A オリゴマーの存在若しくは非存在下で、マウス初代アストロサイトを D M S O 又は G F B - R A 処置した。全細胞抽出を L C 3 及び p 6 2 のレベルのためにイムノプロットに供した。図 5 ( F ) イムノプロットの濃度測定分析、 $\alpha$ -アクチンで正規化。  $p^* < 0.05$ 、対照に対して； n s - 有意差なし。全てのデータは 3 つの独立した実験の平均  $\pm$  標準誤差を表す。

【図 6】図 6 は、異なる I F チャンネル中の漏れ込みシグナルについての試験を示す。マウス初代アストロサイトを D M E M / F 1 2 培地で培養し、別々に L y s o T r a c k e r R e d ( 上部パネル ) 及び H F 6 4 7 - A ( 下部パネル ) で染色した。D a p i を核の染色に用いた。I F 顕微鏡下で、D A P I、C y 2、C y 3 及び C y 5 チャンネル中で細胞を観察した。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 0 6 】

( 好ましい実施形態の詳細な説明 )

( 定義 )

別途定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が関連する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。争いが生じる場合は、本文書が、定義を含めて、支配権を有するであろう。好ましい方法及び物質は以下に記載されるが、本明細書に記載されたものと同様または同等の方法及び物質を、本発明の実施又は試験において、用いることができる。

「 1 つの ( a ) 」、「 1 つの ( a n ) 」、「その ( t h e ) 」という用語の使用及び発明を記述する文脈 ( 特に以下の特許請求の範囲の文脈 ) における類似の引用は、別途本明細書に示される、あるいは明らかに文脈的に矛盾しない限り、単数及び複数の両方を含むものと解釈される。本明細書における値の範囲の列挙は、別途本明細書に示されない限り、単に当該範囲に入るそれぞれ別個の値を個別に参照することの略式の方法として用いることを意図したものであり、それぞれの別個の値は、あたかも個別に本明細書に列挙されたかのように明細書に編入される。本明細書に記述された全ての方法は、別途本明細書に示される、または明確に文脈的に矛盾しない限り、いずれか適切な順番で実施することができる。本明細書で提供される、任意の及び全ての例または例示的な言葉 ( 例えば「などの」、「たとえば」 ) の使用は、単に本発明をよりよく解明することを意図したものであり、別途請求されていない限り、本発明の対象範囲に限界を付すものではない。本明細書の文言は、任意の請求されていない要素が本発明の実施にとって本質的であることを示していると解釈されるべきでない。

「治療効果」という用語は、本明細書で用いられる場合、病理症状、病勢進行、または、例えば、ヒトまたは動物の対象の脳内におけるアミロイド タンパク質の集合のような不調に屈服することに関係した生理的状态又は抵抗することについて、好転、またはその他の点での改善を誘発する効果を意味する。「治療効果のある量」という用語は、薬について用いられる場合、ヒトまたは動物の患者に治療効果を与える薬の量を意味する。

【 0 0 0 7 】

( アミロイド タンパク質の排出を刺激する方法 )

アルツハイマー病は最も一般的なヒト神経変性疾患であり、進行性のニューロン死と記憶喪失をもたらす。神経病理学的にこの病気は、アミロイド ( A ) タンパク質の集合体、4 0 - 4 3 アミノ酸タンパク質分解断片の構成する神経原繊維変化と老人斑の両方の存在によって特徴づけられる。アルツハイマー病の脳において、ニューロンが死ぬ一方で、アストロサイトやミクログリアのようなグリア細胞は死なない。アストロサイトは脳内の主要な細胞タイプであり、進行したアルツハイマー病においてさえ、アミロイド斑を破砕するために用いられている可能性がある。

10

20

30

40

50

治療効果量の増殖因子活性化受容体（「PPAR」）のアゴニストを含む組成物の投与はアストロサイト中のアミロイド（A）の取り込み及び分解を刺激する。前記組成物はまた、ビタミンA又はその誘導体を含んでよい。前記アゴニストは、両親媒性カルボン酸であることができる。ある特定の実施形態では、前記アゴニストは、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、シプロフィブラート、ベザフィブラート、クリノフィブラート又はフェノフィブラートである。ある好ましい実施形態において、前記組成物は、ゲムフィブロジルとレチノイン酸の組合せを含む。

#### 【0008】

FDAに承認された脂質低下剤であるゲムフィブロジル及びビタミンA誘導体レチノイン酸はアミロイド（A）のアストロサイト中での取り込み及び分解を刺激する。低密度リポタンパク質受容体（LDLR）は、前記取り込みにおいて重要な役割を果たし、TFEBが仲介するリソソーム活動の誘発が前記分解に決定的に重要である。ゲムフィブロジルとレチノイン酸処置はまた、アストロサイト中でオートファジーフラックス及びリソソーム活動を増加し、LC3-11形成の増加及びカテプシン（B/D）活性の増加からそれぞれ観察された。

10

さらに、ゲムフィブロジルとレチノイン酸のA取り込み/分解に与える効果は、ゲムフィブロジル-レチノイン酸が仲介するTFEBの誘導に重要な役割を果たすペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（「PPAR」）の不存在にあっては停止する。これらの結果は、PPARが、リソソームA（3排出の向上を通じて、アストログリアのA取り込み及び分解の重要な制御因子であることを明らかにし、ビタミンA誘導体レチノイン酸及びゲムフィブロジル又はその他のPPARアゴニストの組合せがアルツハイマー病患者におけるA斑負荷を低減し得ることを示唆する。

20

ゲムフィブロジル、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体（「PPAR」）のアゴニストはそれのみで、及び全てのトランスレチノイン酸（RA）と共に、脳細胞中のTFEBを向上させることができる。レチノイドX受容体（RXR）及び、PPAR及びPPARではなくPPARが、GFB-仲介TFEBの上方制御に関与している。レポーターアッセイ及びクロマチン免疫沈降調査により、Tfeb促進因子のPPAR結合サイト上での、RXR、PPAR及びPPAR共活性因子1（PGC）の補充を確認した。続いて、薬が仲介するTFEBの誘導は、細胞内での特定のリソソームタンパク質の増加及びリソソーム増殖を引き起こした（14）。これらの発見はまた、TFEB促進因子上のPGC1の補充によるTFEBの転写制御を示した別の研究と整合した（15, 16）。

30

#### 【0009】

マウスアストロサイトによるA取り込み及び分解におけるリソソーム活動の向上は、インビトロA取り込み及び分解アッセイを用いて評価され、細胞内A負荷の顕微鏡観察によって支持された。GFB-RAで刺激した場合、Aの取り込み及び分解の両方の著しい増加が、WT及びPPAR（-/-）細胞で観察されたが、PPAR（-/-）細胞では観察されなかった。LDLRsiRNAによるLDLRのサイレンシングは、A取り込み率を低減したが、TFEBの遺伝子サイレンシングは、分解率を低減した。さらに、GFB-RA処置により仲介することができたオートファジーフラックス及びリソソーム活動において、著しい変化が、カテプシンB/D（CtsB/D）、LC3-I/II及びp62のレベルをモニターすることによって観察された。我々のデータは、PPAR:RXR:PGC1活性によるTFEB上方制御（及び生物発生リソソームの増加）が、A取り込みの増加、及びこれに続くマウス初代アストロサイト中のリソソーム中におけるエンドサイトースされたAの分解を導くことを示す。

40

#### 【0010】

（医薬組成物）

本発明の別の態様は、増殖因子活性化受容体（「PPAR」）又はPPARのアゴニストである薬剤を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、前記アゴニストは、両親媒性カルボン酸である。例えば、前記アゴニストは、クロフィブラート、ゲムフィブ

50

ロジル、シプロフィブラート、ベザフィブラート、クリノフィブラート又はフェノフィブラートであってよい。また別の本発明の態様は、増殖因子活性化受容体（「PPAR」）又はPPARのアゴニストとビタミンA又はその誘導体である薬剤の組合せを含む医薬組成物を提供する。ある好ましい実施形態では、前記医薬組成物は、ゲムフィプロジルとレチノイン酸を含む。

前記医薬組成物は、例えば、錠剤、ピル、糖衣錠、硬及び軟ゲルカプセル、顆粒、ペレット、水性、脂質、油性またはその他の溶液、水中油型乳剤のような乳剤、リポソーム、水性あるいは油性懸濁液、シロップ、エリキシール（elixiers）、固体乳剤、固体分散剤、または分散性パウダーの形状を取ることができる。経口投与のための医薬組成物中では、該薬剤は、一般的に知られ、使用されているアジュバント及び賦形剤、例えば、アラビアゴム、滑石、デンプン、糖（例えば、マンニトース、メチルセルロース、ラクトース）、ゼラチン、界面活性剤、ステアリン酸マグネシウム、水溶性または非水溶性溶媒、パラフィン誘導体、架橋剤、分散剤、乳化剤、潤滑剤、保存料、香味料（例えば、精油）、溶解性向上剤（例えば、ベンジルベンゾエートまたはベンジルアルコール）または生物学的利用能向上剤（例えばGELUCIRE）と混合してもよい。医薬組成物中で、該薬剤はまた、微小粒子、例えばナノ粒子組成物中に分散されてもよい。

10

非経口投与のため、該薬剤または該薬剤の医薬組成物は、生理的に許容される希釈剤、例えば、水、バッファー、溶解剤と共に、あるいは抜き油、界面活性剤、分散剤または乳化剤に溶解または懸濁させることができる。油としては、例えば、オリーブオイル、ピーナッツオイル、綿実油、大豆油、ひまし油及びごま油が用いられ得るがこれらに限定するものではない。より一般的には、非経口投与のため、該薬剤または該薬剤の医薬組成物は、水性、脂質、油性またはその他の種類の溶液または懸濁液の形状であってもよく、あるいはリポソームまたはナノ懸濁液の形状で投与されてさえよい。

20

#### 【0011】

##### （投与方法）

前記医薬組成物は、治療効果量の該薬剤を対象に送達することを可能とするいかなる方法によって投与されてもよい。投与方法としては、経口、局所、経皮及び非経口経路が、組織への直接注入やカテーテルによる送達と同様に挙げられるが、これらに限られるわけではない。非経口経路としては、皮下、皮内、関節内、静脈内、腹腔内及び筋肉内の経路が挙げられるが、これに限られるわけではない。ある実施形態では、投与経路は局所または経皮投与であり、例えば、ローション、クリーム、パッチ、注射、体内埋め込み装置、移植装置またはその他の制御された放出担体による。投与経路には、いかなる非経口経路も含め、組成物を大循環に直接送達するいかなる経路（例えば、注射）も含まれる。あるいは、投与は、中枢神経系への直接の送達によってもよい。

30

本発明による方法の一つの実施形態は、前記組成物を、アルツハイマー病の発達を阻害若しくはその程度を小さくするために十分な用量、濃度及び時間、投与することを含む。別の実施形態は、本発明は、前記組成物を対象の脳内のアミロイドタンパク質集合体を低減するために十分な用量、濃度及び時間、投与することを含む。また別の実施形態において、本発明は、前記組成物を、対象の脳内のアストロサイトによるアミロイドタンパク質集合体の取り込みを刺激するために十分な用量、濃度及び時間、投与することを含む。別の実施形態では、本発明は前記組成物を、対象の脳内のアストロサイトによるアミロイドタンパク質集合体の分解を刺激するために十分な用量、濃度及び時間、投与することを含む。

40

#### 【0012】

特定の実施形態は、前記組成物を、対象の体重1Kgあたり約0.1µgと約100mgの間の量、対象の体重1Kgあたり約0.1µgと約10mgの間の量、対象の体重1Kgあたり約0.1µgと約1mgの間の量、全身的に投与することを含む。該方法を実施するにあたっては、前記組成物は、一日1回の用量または一日複数回の用量で投与することができる。この治療方法は、長期間にわたる投与を必要とする場合がある。投与された一回分の服用量または全体の投与量は、医師によって定められ、患者の体重、年齢、患者

50

の一般的健康状態及び組成物に対する患者の耐久力といった要因に依存するであろう。本発明の実施形態は、下記実施例によってさらに説明されるが、それは特許請求の範囲に記載された本発明の範囲を限定するものではない。

#### 【実施例】

##### 【0013】

#### 実施例1 - 初代マウスアストログリアの単離

アストログリアを記載のとおり(17, 18) Giulian及びBaker(19)の手続きに従って混合グリア培養物から単離した。簡潔に述べると、第9日に、混合グリア培養物をダルベッコ改変イーグル培地/F-12で3回洗浄し、240rpmで2時間、37℃でロータリーシェーカー上で振とうしてマイクログリアを除去した。2日後、オリゴデンドログリアを除去するため24時間、振とうを繰り返し、全ての非アストログリア細胞の完全な除去を確実にした。付着した細胞を、更なる研究のため、新しいプレートに播種した。

10

##### 【0014】

#### 実施例2 - 半定量的な逆転写酵素結合ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

全RNAをマウス初代アストロサイト及びヒト初代アストロサイトから、RNA-Easy Qiagenキットを用いて、製造者のプロトコルに従って単離した。先に記載のとおり(20)、プライマーとしてオリゴ(dT)12-18、及びモロニ マウス白血病逆転写酵素(MMLV-RT、イントロジェン)を20µl反応混合物中で用いて、半定量的RT-PCRを実施した。結果として得られたcDNAを、Promega Master Mixとマウス遺伝子のためのプライマーを用いて適切に増幅した。Tfebプライマー：フォワード：5'-aacaaaggcaccatccctcaa-3' 配列番号：1；リバーズ：5'-cagctcggccatatctcacac-3' 配列番号：2。Ldlrプライマーをサンタクルズバイオテクノロジー(Cat.No.sc-35803-PR)から購入した。増幅生成物を2%アガロースゲル上で電気泳動させ、臭化エチジウムで染色して可視化した。グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(Gapdh)mRNAを負荷コントロールとして、等量のcDNAが各サンプルから合成されることを確認するため用いた。

20

##### 【0015】

#### 実施例3 定量的リアルタイムPCR

mRNAの定量を、ABI-Prism7700配列検出システムでSYBR Select master mixを用いて行った。標的遺伝子のmRNA発現は、Gapdh mRNAのレベルに正規化され、データはABI配列検出システム1.6ソフトウェアで処理した。

30

##### 【0016】

#### 実施例4 - イムノブロットイング

ウェスタンブロット法を先述(21, 22)のとおり修正しつつ行った。簡潔に述べると、細胞を1X RIPA緩衝液中で掻き取り、Bradford試薬を用いてタンパク質を測定し、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)緩衝液を添加して、NuPAGE(登録商標)Novex(登録商標)4-12%ビスートリスゲル(インビトロジェン)上で電気泳動させ、Thermo-Pierce高速セミドライ式プロッターを用いて、ニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad)上にタンパク質を移した。前記メンブレンをTBSTプラス Tween 20(TBST)で15分間洗浄し、BSAを含有するTBST中で1時間ブロックした。次にメンブレンを一晚4℃で振とう条件下で以下の1°抗原とともにインキュベートした；CtsB(Cell Signalling Technology, 1:1000)、CtsD(Cell Signalling Technology, 1:1000)、LC3(Novus, 1:500)、p62(Abcam, 1:500)及びβ-actin(Abcam, 1:1000)。翌日、メンブレンをTBST中で1時間洗浄し、2°抗原中で1°抗原ホストに対して(全て1:10,000；Jackson ImmunoResearch)室温で1時間インキュベートし、更に1時間洗浄し、Odyssey(登録商標)Infrared Imaging System

40

50



(Li-COR, Lincoln, NE)の下で可視化した。

【0017】

実施例5 - アミロイド 取り込みアッセイ

マウス初代アストロサイトを黒色96ウェルプレートに載せた。適切な処置の後、前記ウェルを37で500nM FAM-タグ付加A オリゴマー(1-42)で適当な時間インキュベートした。最終的に、A 含有培地を除去し、ウェルを優しく通常の培地で洗浄し、続いて細胞外A を100μlのPBS中0.2%トリパンブルーとともに2分間冷却した。吸引後、蛍光をVictor X2マイクロプレートリーダー(Perkin Elmer)中、Ex./Em. 485/535で測定した。前記ウェルは更に100μlのPBS中50μg/mlヘキスト 33342色素とともに30分間インキュベートし、蛍光をEx./Em. 360/465nmで測定した(23)。A 蛍光は、細胞数の変化性がもしあれば、それを説明するためヘキスト蛍光で正規化した。

10

【0018】

実施例6 - アミロイド 分解アッセイ

マウス初代アストロサイトを載せて、処置して、次いでFAM-タグ付加A (1-42)とともに、4時間インキュベートした。インキュベート後、A 含有培地を除去し、優しく1回洗浄した後、プレートを通常の培地とともに、37で異なる時間インキュベートした。A の測定及びヘキスト蛍光は上述のとおり測定した。

【0019】

実施例7 - アミロイド 取り込み/分解のための免疫細胞化学

マウス初代アストロサイトを6ウェルプレートに置かれた正方形のカバースリップ上で培養した。処置後、細胞を500nMのHF-647タグ付加A オリゴマー(1-42)とともにインキュベートした。分解研究のため、細胞は、A 含有培地を除去した後、通常の培地中で更に成長させた。インキュベート後、75nMのLysoTracker Red DND99を含有する培地中で細胞を更に30分間インキュベートした。続いて細胞を洗浄し、ガラススライド上に固定し、BX41蛍光顕微鏡下で観察した(23)。

20

【0020】

実施例8 - カテプシンアッセイ

マウス初代アストロサイトを培養し、処置し、2.5mMのEDTA、0.01%のTriton-X100及び2.5mMのDTTを伴う100mM酢酸ナトリウム、pH5.5中で溶解した。

30

カテプシンBアッセイのため、上清を30分間、pH6.0で、100μMのZ-Arg-Arg-AMC、7-アミノ-4-メチルクマリリンとともにインキュベートし、AMCを標準として用いた。蛍光をVictor X2マイクロプレートリーダー中、Ex./Em. 355/460nmで測定した。

カテプシンDアッセイのため、上清を10μMの基質7-メトキシクマリリン-4-アセチル-(Mca)-Gly-Lys-Pro-Ile-Leu-Phe-Phe-Arg-Leu-Lys-2,4-ニトロフェニル(Dnp)-D-Arg-NH<sub>2</sub>、pH4.0で30分間インキュベートした。Mca-Pro-Leu-OHを標準として用いた。蛍光は、Ex./Em. 320/420nmで測定した。

40

サンプルの蛍光読み取り値をそれぞれの標準と比較して、得られた生成物の量を測定した。カテプシン活性(単位)を細胞抽出物のmgあたりで計算し、37で、1時間あたり、1単位の酵素活性が1nモルの生成物を放出するものと考えた(24, 25)。

【0021】

実施例9 - 濃度測定分析

タンパク質プロットをImageJ(NIH, Bethesda, MD)を用いて解析し、バンドをそれぞれの - アクチン負荷対照で正規化した。免疫蛍光定量データは、1条件当たり少なくとも25の異なるイメージについて3つの独立した一連の実験からの、それぞれの対照に対する平均倍変化で表したものである。

【0022】

50

### 実施例 10 - 統計解析

値を、少なくとも 3 つの独立した実験の平均  $\pm$  標準誤差で表す。差についての統計解析をスチューデントの  $t$  検定を経て行った。この統計的有意差についての基準は、 $p < 0.05$  であった。

#### 【0023】

実施例 11 - GFB 及び RA 処置によるマウス初代アストロサイトにおける A 取り込みの向上

リソソーム活動は、アルツハイマー病脳内の A の排出に不可欠である。したがって、我々は、マウス初代アストロサイトによる細胞外 A の取り込みにおいてリソソーム生物発生を向上させる GFB - RA の効果を探索した。我々は、細胞による取り込みの A レベルの変化を測定するため、定量的インビトロアッセイ及び定性的顕微鏡解析の両方を行った。

インビトロアッセイは、細胞内からの FAM - タグ付加 A (1 - 42) のシグナル強度を定量的に測定することができる堅調な技術である。細胞は、GFB - RA で処置し、FAM - A (1 - 42) とともに様々な時間 (15 分間、30 分間、45 分間、1 時間、2 時間、4 時間、及び 8 時間) 更にインキュベートした。A のシグナル強度を、各ウェルにおける細胞数の変化性がもしあれば、それを説明するため、最初そのヘキストに対して正規化した。次に、GFB - RA 処置サンプルの正規化した A シグナルを、その対応する DMSO 処置したものと比較し、各時間における A シグナルのパーセンテージ変化を計算した。

#### 【0024】

A 含有培地中で 2 時間インキュベートした後に、GFB - RA 処置細胞内の A 量は、DMSO 処置細胞に比較して  $\sim 60\%$  多かった。4 時間で、処置細胞中の A シグナルは、対照よりも約  $\sim 80\%$  高かった (図 1A)。しかしながら、更に 8 時間までインキュベートしても、処置細胞中の A 含有量の更なる増加は得られず、4 時間のインキュベーションがアッセイのために最適な時間であろうことを示した。したがって、更なる取り込みアッセイでは、この時間が A のインキュベーションに選択された。

細胞を HF - 647 - タグ付加 A (1 - 42) とともに 2 時間インキュベートし、続いて LysoTracker Red とともに 4 時間インキュベートして、蛍光顕微鏡検査を行った。我々は 2 時間、及び 4 時間インキュベートされた GFB - RA 処置細胞中の HF - 647 - A の点状シグナルが DMSO 対照に対して増加したことを観察した。更に、A シグナルは、LysoTracker シグナルと共存し、細胞により取り込まれた A は細胞内の酸性小胞 (後期エンドソーム又はリソソーム) 内に存在することを示した (図 1B)。A シグナルのパターン及び LysoTracker シグナルのパターンは類似すると予想されることから、我々は細胞を別々に LysoTracker 及び HF - 647 - A とインキュベートし、任意の蛍光の漏れ込み (bleed through signal) を全てのチャンネルについて試験した。予想通り、LysoTracker のみが CY2 及び CY3 チャンネルの間でわずかなシグナルの重複を示したが、HF - 647 - A についての他のいかなるチャンネルにおいても、その真のシグナルである CY5 チャンネル以外からの有意な漏れ込みはなかった (図 6)。

#### 【0025】

実施例 12 - GFB - RA が媒介する A 取り込みにおける LDLR 及び TFE $\beta$  の効果 A は、ヘパリン硫酸プロテオグリカン (HSPG) に補助される微飲作用を通じて取り込まれることができた (26)。したがって、GFB - RA が仲介する A 取り込みの向上のメカニズムを明瞭にするため、我々は A 取り込みアッセイをヘパリン (HSPG の阻害因子) の存在下でまず行った。ヘパリン存在下で GFB - RA で処置した細胞は、A 取り込みにおいて  $\sim 40\%$  の増加を示したのに対し、ヘパリン不存在の下で GFB - RA 処置した細胞は  $\sim 80\%$  の増加を示した (図 2A)。しかしながら、この取り込みレベルの低減は統計的に優位であったが、まだ約  $40\%$  の取り込みがヘパリン存在下で行われており、このことは別の因子が取り込みプロセスの原因となっている可能性を示す。我々

は細胞に *Tfeb* *siRNA* を形質移入し、*Tfeb* *siRNA* 形質移入細胞中の *A* の取り込みレベルに、スクランブル *siRNA* 形質移入細胞に比べてわずかな減少（統計的に優位ではなく、 $p = 0.59$ ）を観察した（図 2 B）。*TFEB* サイレンシングの有効性を図 2 D に示す。これらのデータは、*HSPG* も *TFEB* もそれだけが *A* の取り込み向上の原因であるわけではないという考えを更に強めることとなった。最近の報告は、*LDLR* 及び *LRP1* のようなリポタンパク質受容体がまたグリア細胞における *A* のインターナリゼーションを促進していることを示唆している。興味深いことに、*LDLR* の肝臓発現が、*Akt* リン酸化及び *SREBP2* の転写活動が関与する *PPAR* に依存したメカニズムによるフェノフィブラート（*FF*）によって誘発されるとの報告がある（27, 28）。したがって、我々はさらに細胞に *Ldlr* *siRNA* を形質移入し、*GFB* - *RA* の *A* の取り込みへの効果が *LDLR* の不存在にあって減じることを観察した（図 2 B）。*LDLR* サイレンシングの効率は、図 2 C から明らかである。また、*GFB* で処置すると、フィブラートは、*RA* とともに *WT* アストロサイト中で *LDLR* の発現を誘発したが、*PPAR*（-/-）細胞中ではしなかった（図 2 C）。これらを考え合わせると、この一連のデータは、*GFB* - *RA* が、*LDLR* 仲介エンドサイトーシスを経由して、アストロサイト中の *A* の取り込みを促すことを示している。

#### 【0026】

実施例 13 - *GFB* 及び *RA* 処置がマウス初代アストロサイト中の *A* の分解を向上させる我々は *A* と *Lysotracker*（リソソーム色素）の共存を観察した（図 1 B）。したがって、オルガネラが適切に機能すれば、リソソーム内部で *A* の分解があるであろうことは必然である。我々は、*TFEB* の誘発（及びそれに続くリソソーム遺伝子及びリソソーム生物発生の誘発）がリソソーム中の *A* 分解プロセスを加速できたか否かを観察したかった。我々は同じインビトロアッセイを細胞内 *A* 含有量のために手配したが、今回は、*A* とともに 4 時間インキュベートした後、該細胞を *A* を含まない培地中で異なる時間（15 分、30 分、1 時間、2 時間、4 時間、6 時間、及び 8 時間）成長させた。*DMSO* 処置細胞及び *GFB* - *RA* 処置細胞の正規化された *A* シグナル（ヘキストシグナルに対して正規化されたもの）を、*A* を含まない培地で成長させなかったそれぞれの対応物（「0 分洗浄」と呼ぶ）と比較した。予想通り、*A* のリソソーム処理の基底レベルは、細胞内 *A* のシグナル強度を、6 ~ 8 時間の間で、0 分洗浄細胞に比べて、~ 20 % 低減させた。一方で、*GFB* - *RA* で処置された細胞は、加速された排出速度を示し、6 ~ 8 時間の間で、~ 40 % シグナルを低減させた（図 3 A）。データは最適な分解が 6 時間であることを示し、その時間が更なる分解アッセイに用いられた（「6 時間洗浄」と呼ぶ）。我々はまた、6 時間洗浄後の *HF* - 647 - *A* の点の減少を顕微鏡下で可視化した（図 3 B）。*A* シグナルの喪失がリソソーム処理のためであるか否かを決定するため、我々は、リソソームの酸性化を阻害しそれによってその活性を低減するバフィロマイシン A1（*BafA1*）とともに細胞をインキュベートした。*BafA1* の存在は、*GFB* - *RA* で処置された細胞中で観察された *A* の喪失の加速化を阻み、*BafA1* 存在下では、*A* 分解速度は、*DMSO* 措置細胞と *GFB* - *RA* 処置細胞の両方でほぼ同じとなった（図 3 C）。更に、*Tfeb* *siRNA* の細胞への形質移入はまた、*GFB* - *RA* が仲介する、*A* の加速化したリソソーム分解を減じた（図 3 D）。まとめると、これらのデータは、*GFB* - *RA* 処置が仲介するリソソーム生物発生の誘発は、リソソームによる *A* 分解のプロセスを加速化することができたことを示す。

#### 【0027】

実施例 14 - *PPAR* 及び *PPAR* の *GFB* - *RA* 仲介 *A* の取り込み及び分解における役割

*PPAR* は *TFEB* の転写活性化の仲介、及びそれに続く、リソソーム生物発生の向上において重要な役割を果たす。我々は、*PPAR* 及び *PPAR* の不存在が、マウス初代アストロサイト中の *A* の取り込み及び分解の制御に影響を与えることを試験した。*WT*、*PPAR*（-/-）及び *PPAR*（-/-）動物から単離された細胞を *GFB* 及び *RA* で処置し、更に *FAM-A*（1-42）（インビトロアッセイのため）及び *HF* -

647-A とともに、LysoTracker Red (顕微鏡のため) と併せてインキュベートした。以前同様、A シグナルは、細胞数の任意の変化性を説明するため、ヘキストシグナルで正規化した。

A 取り込みアッセイは、A とともに4時間インキュベート後、細胞内のA 含有量の顕著な増加 (FAM-A シグナル強度で測定) を、WT及びPPAR (-/-) 細胞の両方で示したが、PPAR (-/-) 細胞では示さなかった (図4A)。全ての細胞のシグナル強度をDMSO処置WT対照と比較した。GFB-RA処置されたPPAR (-/-) 細胞中のA レベルにわずかな増加 (~20%) があつたが、GFB-RA処置されたWT及びPPAR (-/-) 細胞中のそれぞれ~80%及び70%の増加に比べれば著しくはなかった (図4A)。PPARのA 分解における役割を評価するため、WT及びノックアウト動物からの細胞を処置し、A でインキュベートし、更にA を含まない培地で6時間成長させた。GFB-RA処置されたアストロサイトの各細胞タイプについて、6時間洗浄を行ったあるいは行わないものの正規化されたA シグナルを、最初にそれらの対応するDMSO処置対照と比較した。そして、6時間洗浄GFB-RA処置細胞の細胞内A シグナルのパーセンテージ変化 (先にそれらのDMSO処置対照に対して正規化したもの) を0分洗浄GFB-RA処置細胞 (先にそれらのDMSO処置対照に対して正規化したもの) と各細胞タイプについて計算した。我々は、WT及びPPAR (-/-) 細胞の両方についてA レベルの~60%低減を観察したが、PPAR (-/-) の場合は30~35%のシグナル喪失に過ぎなかった (図4B)。初期に観察された通り、A はこれら3つの細胞タイプで差別的に取り込まれたが、A 含有量についてのパーセンテージ変化を6時間洗浄前と後で比較すると (派生物については詳細に議論の場所で記述する)、A 取り込みの変化性を説明し、A 分解の絶対尺度を提供した。

#### 【0028】

更に、顕微鏡観察から、PPAR (-/-) 細胞中で、PPAR (-/-) 及びWT細胞に比べて、A とLysoTrackerの両方のシグナル強度の低減が明らかになった (図4C、4D及び4E)。これは、PPAR の不存在はGFB-RA仲介リソソーム増殖の向上を、A 取り込みの鍵となる成分であるLDLRの発現の減少と同様に停止するという我々の先の発見と合致した。

顕微鏡解析はまた、6時間洗浄後のWT及びPPAR (-/-) 中で、HF-647-A の点は減少するが、PPAR (-/-) 細胞中では著しい変化は認められないことを明らかにした (図4C、4D及び4E)。まとめると、これらのデータは、PPAR は二重の役割を有することを示している。すなわち、LDLR発現を制御することによって、それはA の取り込みを促進することが可能であり、また、TFEBを介してリソソーム生物発生を向上させることにより、それはリソソーム中でのA 分解の加速化を誘発する。

#### 【0029】

実施例15 - GFB及びRA処置がリソソーム活性及びオートファジーフラックスを向上させた

A のリソソーム分解の向上のため、我々はリソソーム活性とオートファジーのためのマーカーを調査した。我々は、リソソーム中のA 断片の分解に関わる2つの重要なカテプシンである、カテプシンB (CtsB) 及びカテプシンD (CtsD) におけるGFB-RA処置を評価した。カテプシン活性アッセイを、Tfeb siRNAの存在又は不在の両方についてGFB-RA処置細胞において、物質及び方法に記載のとおり実施し、GFB-RA処置による活性の任意の変化が、TFEBを介して仲介されるか否かを決定した。我々のデータは、GFB-RA処置により両方のカテプシンの活性の増加を示す。siRNAによるTFEBのサイレンシングは、カテプシン活性への薬剤の効果を停止した (図5A及び5B)。両カテプシンのタンパク質レベルは、GFB-RA処置細胞で約2~3倍増加することが認められた (図5C及び5D)。これは、CtsB及びCtsDがTFEBの直接のターゲットであること及びTFEB活性の向上が、続いてカテプシンのレベル及び活性を同様に誘発するという発見と整合する。

## 【 0 0 3 0 】

オートファジー又はオートファジー経路のブロックの欠如は、細胞内のオートファジー液胞における A の異常な蓄積をもたらし、A に誘発される神経細胞毒性の主な原因の一つであることが報告されている ( 9 )。したがって、我々は、G F B - R A 処置細胞中のオートファジーフラックスの変化を、L C 3 ( L C 3 - I / L C 3 - I I ) 及び p 6 2 / S Q S T M 1 のレベルをモニタリングすることによって観察した。G F B - R A 処置は、L C 3 - I のホスファチジルエタノールアミン接合形である、L C 3 - I I のレベルを増加させた ( 図 5 E 及び 5 F )。L C 3 - I から L C 3 - I I への変換は、オートファジー誘発の特徴である。我々は更にリソソーム活性を B a f A 1 を用いてブロックし、L C 3 - I I の更なる蓄積を観察した ( 図 5 E 及び 5 F )。以前の研究と整合的に、我々はまた、L C 3 - I I の蓄積がある条件での p 6 2 のレベルの低減が、オートファジーフラックスの向上を更に強化することを観察した ( 図 5 E 及び 5 F )。

これらを考えあわせると、これらのデータは、T F E B を介し、G F B - R A に仲介され、P P A R に依存する形でリソソーム生物発生の増加は、マウス初代アストロサイトによるリソソーム中での A 取り込み及びそれに続く分解を誘発することができるという、我々の仮説を確認するものである。

## 【 0 0 3 1 】

## 実施例 1 6 - 実験プロトコルについての議論

A 産生におけるリソソーム活動の役割である、取り込み及び排出については、過去数年の間によく確立されてきた ( 1 , 2 , 7 , 1 1 , 2 3 )。ここで、我々は、G F B - R A によるリソソーム生物発生の向上をマウス初代アストロサイトによる A 取り込み及び分解において観察した。F A M - タグ付加 A ( 1 - 4 2 ) を用いたインビトロアッセイを 9 6 ウェルマイクロプレートで行い、同時に複数のサンプル / 処置の評価を可能とした。細胞外シグナルと死細胞からのシグナルをトリパンブルーを用いて抑制することで、生存細胞からの細胞内 A シグナルのみが、4 8 5 / 5 3 5 n m ( E x . / E m . ) で検出された。更に、同じウェルからの A シグナルをヘキスト 3 3 3 4 2 シグナルで 3 6 0 / 4 6 5 n m で正規化することで、細胞数の変化性を説明する。

実験のタイプによって、データを適切な対照と比較し、A 取り込み / 分解の倍数変化又はパーセンテージ変化で表した。W T 及び P P A R ( - / - ) 細胞が、処置に伴い、A 取り込みの著しい増加を示す一方、P P A R ( - / - ) 細胞はそれほどの増加を示さなかった。H F - 6 4 7 - A シグナルと L y s o T r a c k e r の共存が顕微鏡下で観察され、インターナライズされた A が実際にリソソームの中で最後を迎えたことを示した。ヘパリン及び L D L R s i R N A 存在下での細胞内 A シグナルの低減は、アストロサイトによる細胞外 A のエンドサイトーシス及び微飲作用における H S P G と L D L R の役割を示した。P P A R 又は T F E B 活性と微飲作用との間の関連は十分わかっていないが、リソソーム生物発生の増加は、飲作用胞のターンオーバーを向上させ、それにより H S P G が仲介する A の取り込みを増加させるように思われる。

## 【 0 0 3 2 】

L D L R の A の取り込み及び分解における役割は十分確立されている。先の研究は L D L R の過剰発現が A の沈着を防ぎ、細胞外 A の排出を向上させたことを示した ( 2 9 )。前記効果は、アルツハイマー病の最も強い遺伝子リスク因子の 1 つである、アポリポタンパク質 E ( A p o E ) の関与あり又はなしで仲介することができた ( 2 7 - 2 9 )。更に、L D L R 過剰発現はまた大脳 A の脳から血液への輸送率を促進することが示され、それにより、病理的な A の脳からの排出を向上させる ( 3 0 )。また、L D L R がアルツハイマー病の 5 X F A D マウスモデル ( 5 X F A D / L D L R - / - ) から除かれた場合、アミロイド の蓄積の増加とグリア細胞の炎症反応の低減の証拠があり、このことは、神経膠症と A 排出における A p o E から独立した L D L R の役割を示す ( 3 1 )。興味深いことに、A 取り込みの別の候補である L D L R の発現は、また P P A R の活性化により S R E B P 2 を介して制御される。ゲムフィブロジルと同じクラスに属する別のフィブラートであるフェノフィブラート ( F F ) は、P P A R - S R E B P 2 仲介経

路における肝臓 LDLR を上方制御することが示されている (32)。我々の研究においても、PPAR の活性因子としてよく知られている GFB での処置は、WT 細胞において LDLR 発現を増加させたが、PPAR ( - / - ) 細胞中では増加させなかった。また、アストロサイト中の LDLR ノックダウンは、A 取り込みの向上を減じた。このデータに基づき、我々は、インビトロでマウス初代アストロサイト中での A 取り込みを LDLR に依存するやり方で促進する場合の PPAR の新しい役割 (その活性化因子、GFB も同様に) を明らかにした。

#### 【0033】

分解アッセイもまた同様のやり方で行った。この場合、細胞を、A を含まない培地で、シグナルを計測する前に、様々な時間、成長させた。BafA1 によるリソソーム活動の阻害又は TFE のサイレンシングは、A 分解の低減を示し、A 分解におけるリソソームの役割を強めた (1-42)。しかしながら、我々が A 分解を WT、PPAR ( - / - ) 及び PPAR ( - / - ) 細胞中でアッセイした場合、計算はより複雑であった。この場合、我々は 3 つの異なる細胞タイプ (WT、PPAR ( - / - ) 及び PPAR ( - / - )) を有しており、それらは GFB - RA 処置に A 取り込みにおいて差別的な反応を示すものである。したがって、適切な分解評価のため、6 時間洗浄後の A のレベルを、洗浄前の A (0 分洗浄) との倍率変化で、個別に、それぞれのタイプの GFB - RA 処置細胞について、比較しなければならなかった。

#### 第 1 段階の導出

ヘキストシグナルで正規化した A シグナル =  $A_{norm}$  (全ての条件について)

#### 第 2 段階の導出

$A_{norm}(DMSO, 0 \text{ 分洗浄})$  に対して正規化した  $A_{norm}(Tx, 0 \text{ 分洗浄}) = A_{fold}(Tx, 0 \text{ 分洗浄})$

$A_{norm}(DMSO, 6 \text{ 時間洗浄})$  に対して正規化した  $A_{norm}(Tx, 6 \text{ 時間洗浄}) = A_{fold}(Tx, 6 \text{ 時間洗浄})$

#### 第 3 段階の導出

$\{A_{fold}(Tx, 6 \text{ 時間洗浄}) / A_{fold}(Tx, 0 \text{ 分洗浄})\} * 100 = \% \text{ 変化}$   
この A シグナルの第 3 段階の導出により、同じ細胞による洗浄前の A の純取り込み量と比較した細胞内の A 含有量の純減の間で比較することが可能となった。

#### 【0034】

最終的に、リソソーム活動を、2 つの加水分解酵素、カテプシン B 及び D の活性をモニタリングすることによって計測した。CtsB 及び CtsD は、2 つの公知の TFE の直接のターゲットであり、予期される通り、我々はこれら酵素の活性及びレベルの増加を観察した。A 産生のエンドソーム - リソソーム経路において、リソソーム加水分解酵素によって生成した アミロイド断片は、続いてカテプシンによって分解される (CtsB 及び D) (8)。カテプシンの阻害は、A 断片の急速な蓄積を引き起こし、その一方で増加したカテプシン活性は、A の効果的な分解及び A 斑の低減をもたらすことが示されている (33)。また、オートファジー向上は、A のリソソーム分解を結果としてもたらし、ニューロンを A に誘発される神経毒性から守ることが示されている (34)。

オートファジープロセスによる異常な又は不適切な A の処理はまた、細胞外スペースへの有毒な A 断片の分泌を引き起こし、オートファジーの欠陥は、リソソーム中での A の蓄積をもたらし、それにより LMP を引き起こす (13)。したがって、我々はまた、オートファジーフラックスの変化を、LC3 - I から LC3 - II への転換及びそれと結合したタンパク質 p62 をモニタリングすることによって確認した。微小管結合タンパク質 1 (MAP1) 軽鎖 3 (MAP - LC3 又は単に LC3) は自由な溶解性形状 (LC3 - I) で存在し、それは Atg4 の酵素反応によってホスファチジルエタノールアミンと共有結合する (LC3 - II) (35, 36)。オートファジーの誘導を導くシグナルは、転換のきっかけとなる。LC3 - II はオートファゴソーム膜に結合したままであり、このことは新たなオートファジー液胞の産生に不可欠である (37, 38)。LC3 - I / II のレベルの変化をモニタリングすることは、オートファジー誘導をモニターするため

のシンプルかつ効果的な方法であると考えられている(10)。しかしながら、LC3-IILレベルの単なる増加は必ずしも完全なオートファジーを示すものではない。LC3-IIL自身がオートファジー分解の後半段階で分解し、そのことがLC3イムノプロット結果の解釈をより複雑なものとする。

#### 【0035】

したがって、LC3-IILレベルをオートファジー活性化因子と阻害因子の両方の存在下でモニタリングすることが、データを解釈するためにより良い方法であると提案されている(39, 40)。リソソーム阻害条件下でのLC3-IILの蓄積増加は、オートファジフラックスの持続的な増加のためであるが、リソソーム分解によるLC3-IILの排出を低減した。一方、別のオートファジーマーカーであるp62は、またセクエストソーム1(SQSTM1)としても知られ、LC3-IILをオートファゴソームに運び、大多数のp62はオートファゴソーム形成の初期段階で分解される(39-42)。p62とLC3の負の相関が予期され、他のグループ同様我々のデータに認められたように、GFB-RA処置細胞中のオートファジフラックスの増加を示した。

#### 【0036】

APP処理、A $\beta$ 産生及び分解におけるオートファジーの役割は広範囲にわたって研究されている。APP処理のエンドソーム-リソソーム経路が、先に議論された通り、病理的A $\beta$ 断片の生成を制御するうえで著しく貢献する(7, 9)。APPはリソソーム中で処理されるため、リソソーム機能の遮断は、A $\beta$ 分解及び分泌の抑制と同様に、リソソーム内及び外におけるA $\beta$ の蓄積をもたらす(43, 44)。神経芽細胞腫細胞系では、N2a、グリコゲン合成酵素キナーゼ3(GSK3)の阻害は、リソソーム生物発生を促し、リソソーム中でのA $\beta$ 分解を促進する(45)。また、LDLR-関連タンパク質1(LPR1)は、ニューロン内でのA $\beta$ インターナリゼーション及び分解を仲介する(46, 47)。多数の受容体、例えば、補体受容体1(CR1)、スカベンジャー受容体(SR-A)、CD36、終末糖化産物受容体(RAGE)、Toll様受容体(TLRs)、トランスフォーミング増殖因子1(TGF- $\beta$ 1)、ミエロイド細胞上に発現した誘発性受容体(TREM2)等は、細胞外A $\beta$ と相互作用し、A $\beta$ 取り込み及び分解を導くシグナリングメカニズムを誘発するマイクログリアの表面上で確認されている(48-51)。A $\beta$ 排出及び分解におけるアストロサイトの役割は、アストロサイトはApoe-A $\beta$ 複合体を細胞外のスペースからインターナリゼーションし、引き続いてそれらを分解又は血管周囲腔に分泌するため、利益になるものと考えられている(52-54)。アストロサイトはまた、A $\beta$ をNEP、マトリックスメタロプロテアーゼ9(MMP-9)又はインシュリン分解酵素(IDE)の酵素反応によって分解することが可能である(55-60)。しかしながら、長時間病理的なA $\beta$ に曝されることは、アストロサイトがそのような大量のA $\beta$ カーゴを取扱うことを不可能とし、アストロサイト中でのA $\beta$ 蓄積をもたらす(61, 62)。過去数年間、リソソーム生物発生の向上は、A $\beta$ インターナリゼーション及び分解に決定的な役割を果たすことが示されてきた。グリア繊維酸性タンパク質(GFAP)プロモーター又はCMV-プロモーターに動かされた、TFEB遺伝子を有するアデノ随伴ウイルス(AAV)が、定位的注入により、APP/PS1マウスの海馬に投与され、これは特にアストロサイト又はニューロンをそれぞれターゲットとしたものである。TFEB過剰発現はリソソーム生物発生の誘導を導き、最終的には、間質液からのアストロサイトによるA $\beta$ の取り込み及び排出の向上及びニューロンによるAPP処理の向上をもたらし、それはA $\beta$ 産生を低減する(23, 63)。これらの研究は、アルツハイマー病におけるアストロサイトのA $\beta$ 排出の重要性を明確にするが、薬が仲介するリソソーム生物発生の誘発によるA $\beta$ 排出の向上はこれまで十分に研究されてこなかった。

要約すると、フィブラートによるPPAR $\gamma$ の活性化は、マウス初代アストロサイトによるA $\beta$ 取り込み及び排出の向上を導く。この研究の結果は、これまで知られていなかったPPAR $\gamma$ の性質に脚光を当て、リソソーム貯蔵疾患同様、アルツハイマー病に新しい治療オプションを提供し、TFEBによるより動態的な制御を明らかにするものである。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

( 参考文献 )

1. Takahashi, R. H., Capetillo-Zarate, E., Lin, M. T., Milner, T. A., and Gouras, G. K. Co-occurrence of Alzheimer's disease ss-amyloid and tau pathologies at synapses. *Neurobiol Aging* **31**, 1145-1152

2. Li, M., Chen, L., Lee, D. H., Yu, L. C., and Zhang, Y. (2007) The role of intracellular amyloid beta in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* **83**, 131-139

10

3. Citron, M., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995) Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* **14**, 661-670

4. Okochi, M., Eimer, S., Bottcher, A., Baumeister, R., Romig, H., Walter, J., Capell, A., Steiner, H., and Haass, C. (2000) A loss of function mutant of the presenilin homologue SEL-12 undergoes aberrant endoproteolysis in *Caenorhabditis elegans* and increases abeta 42 generation in human cells. *J Biol Chem* **275**, 40925-40932

20

5. Capell, A., Steiner, H., Willem, M., Kaiser, H., Meyer, C., Walter, J., Lammich, S., Multhaup, G., and Haass, C. (2000) Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *J Biol Chem* **275**, 30849-30854

6. Vetrivel, K. S., Zhang, Y. W., Xu, H., and Thinakaran, G. (2006) Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener* **1**, 4

7. Vetrivel, K. S., and Thinakaran, G. (2006) Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* **66**, S69-73

30

40

50



8. Bagnoli, S., Nacmias, B., Tedde, A., Guarnieri, B. M., Cellini, E., Ciantelli, M., Petrucci, C., Bartoli, A., Ortenzi, L., Serio, A., and Sorbi, S. (2002) Cathepsin D polymorphism in Italian sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* **328**, 273-276

9. Nixon, R. A. (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* **120**, 4081-4091

10. Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., Brunk, U. T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L. S., Choi, A., Chu, C. T., Chung, J., Clarke, P. G., Clark, R. S., Clarke, S. G., Clave, C., Cleveland, J. L., Codogno, P., Colombo, M. I., Coto-Montes, A., Cregg, J. M., Cuervo, A. M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P. B., Dennis, P. A., Deretic, V., Devenish, R. J., Di Sano, F., Dice, J. F., Difiglia, M., Dinesh-Kumar, S., Distelhorst, C. W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F. C., Droge, W., Dron, M., Dunn, W. A., Jr., Duszenko, M., Eissa, N. T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E. L., Fesus, L., Finley, K. D., Fuentes, J. M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F. B., Gewirtz, D. A., Gibson, S. B., Gohla, A., Goldberg, A. L., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gorski, S., Gottlieb, R. A., Haussinger, D., He, Y. W., Heidenreich, K., Hill, J. A., Hoyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W. P., Iwasaki, A., Jaattela, M., Jackson, W. T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J. U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D. H., Kiel, J. A., Kim, H. P., Kimchi, A., Kinsella, T. J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., Komatsu, M., Kominami, E., Kondo, S., Kovacs, A. L., Kroemer, G., Kuan, C. Y., Kumar, R., Kundu, M., Landry, J., Laporte, M., Le, W., Lei, H. Y., Lenardo, M. J., Levine, B., Lieberman, A., Lim, K. L., Lin, F. C., Liou, W., Liu, L. F., Lopez-Berestein, G., Lopez-Otin, C., Lu, B., Macleod, K. F., Malorni, W., Martinet, W., Matsuoka, K., Mautner, J., Meijer, A. J., Melendez, A., Michels, P., Miotto, G., Mistiaen, W. P., Mizushima, N., Mograbi, B., Monastyrska, I., Moore, M. N., Moreira, P. I., Moriyasu, Y., Motyl, T., Munz, C., Murphy, L. O., Naqvi, N. I., Neufeld, T. P.,

10

20

30

40

50

- Nishino, I., Nixon, R. A., Noda, T., Nurnberg, B., Ogawa, M., Oleinick, N. L., Olsen, L. J., Ozpolat, B., Paglin, S., Palmer, G. E., Papassideri, I., Parkes, M., Perlmutter, D. H., Perry, G., Piacentini, M., Pinkas-Kramarski, R., Prescott, M., Proikas-Cezanne, T., Raben, N., Rami, A., Reggiori, F., Rohrer, B., Rubinsztein, D. C., Ryan, K. M., Sadoshima, J., Sakagami, H., Sakai, Y., Sandri, M., Sasakawa, C., Sass, M., Schneider, C., Seglen, P. O., Seleverstov, O., Settleman, J., Shacka, J. J., Shapiro, I. M., Sibirny, A., Silva-Zacarin, E. C., Simon, H. U., Simone, C., Simonsen, A., Smith, M. A., Spanel-Borowski, K., Srinivas, V., Steeves, M., Stenmark, H., Stromhaug, P. E., Subauste, C. S., Sugimoto, S., Sulzer, D., Suzuki, T., Swanson, M. S., Tabas, I., Takeshita, F., Talbot, N. J., Talloczy, Z., Tanaka, K., Tanida, I., Taylor, G. S., Taylor, J. P., Terman, A., Tettamanti, G., Thompson, C. B., Thumm, M., Tolkovsky, A. M., Tooze, S. A., Truant, R., Tumanovska, L. V., Uchiyama, Y., Ueno, T., Uzcategui, N. L., van der Klei, I., Vaquero, E. C., Vellai, T., Vogel, M. W., Wang, H. G., Webster, P., Wiley, J. W., Xi, Z., Xiao, G., Yahalom, J., Yang, J. M., Yap, G., Yin, X. M., Yoshimori, T., Yu, L., Yue, Z., Yuzaki, M., Zabimyk, O., Zheng, X., Zhu, X., and Deter, R. L. (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151-175
11. Mueller-Stainer, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E. D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L., and Gan, L. (2006) Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* **51**, 703-714
12. Zhang, L., Sheng, R., and Qin, Z. (2009) The lysosome and neurodegenerative diseases. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**, 437-445
13. Ditaranto, K., Tekirian, T. L., and Yang, A. J. (2001) Lysosomal membrane damage in soluble Aβ-mediated cell death in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **8**, 19-31
14. Ghosh, A., Jana, M., Modi, K., Gonzalez, F. J., Sims, K. B., Berry-Kravis, E., and Pahan, K. Activation of peroxisome proliferator-activated

10

20

30

40

50

receptor alpha induces lysosomal biogenesis in brain cells: implications for lysosomal storage disorders. *J Biol Chem* **290**, 10309-10324

15. Tsunemi, T., and La Spada, A. R. PGC-1alpha at the intersection of bioenergetics regulation and neuron function: from Huntington's disease to Parkinson's disease and beyond. *Prog Neurobiol* **97**, 142-151

16. Tsunemi, T., Ashe, T. D., Morrison, B. E., Soriano, K. R., Au, J., Roque, R. A., Lazarowski, E. R., Damian, V. A., Masliah, E., and La Spada, A. R. (2012) PGC-1alpha rescues Huntington's disease proteotoxicity by preventing oxidative stress and promoting TFEB function. *Sci Transl Med* **4**, 142ra197

17. Brahmachari, S., and Pahan, K. (2007) Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies T cells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* **179**, 275-283

18. Saha, R. N., and Pahan, K. (2007) Differential regulation of Mn-superoxide dismutase in neurons and astroglia by HIV-1 gp120: Implications for HIV-associated dementia. *Free Radic Biol Med* **42**, 1866-1878

19. Giulian, D., and Baker, T. J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci* **6**, 2163-2178

20. Khasnavis, S., Jana, A., Roy, A., Wood, T., Ghosh, S., Watson, R., and Pahan, K. Suppression of nuclear factor-kappa B activation and inflammation in microglia by a physically-modified saline. *J Biol Chem*

21. Corbett, G. T., Roy, A., and Pahan, K. Gemfibrozil, a Lipid-Lowering Drug, Upregulates IL-1 Receptor Antagonist in Mouse Cortical Neurons: Implications for Neuronal Self-Defense. *J Immunol* **189**, 1002-1013

22. Saha, R. N., Liu, X., and Pahan, K. (2006) Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol* **1**, 212-222

23. Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Burchett, J. M., Schuler, D. R., Cirrito, J. R., Diwan, A., and Lee, J. M.

10

20

30

40

50

Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates Abeta clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**, 9607-9620

24. Bond, J. S., and Barrett, A. J. (1980) Degradation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase by cathepsin B. *Biochem J* **189**, 17-25

25. Barrett, A. J. (1980) Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* **187**, 909-912

26. van Horssen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L. P., de Waal, R. M., and Verbeek, M. M. (2003) Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol* **2**, 482-492

27. Basak, J. M., Verghese, P. B., Yoon, H., Kim, J., and Holtzman, D. M. Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of Abeta uptake and degradation by astrocytes. *J Biol Chem* **287**, 13959-13971

28. Basak, J. M., Kim, J., Pyatkovskyy, Y., Wildsmith, K. R., Jiang, H., Parsadanian, M., Patterson, B. W., Bateman, R. J., and Holtzman, D. M. Measurement of apolipoprotein E and amyloid beta clearance rates in the mouse brain using bolus stable isotope labeling. *Mol Neurodegener* **7**, 14

29. Kim, J., Castellano, J. M., Jiang, H., Basak, J. M., Parsadanian, M., Pham, V., Mason, S. M., Paul, S. M., and Holtzman, D. M. (2009) Overexpression of low-density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* **64**, 632-644

30. Castellano, J. M., Deane, R., Gottesdiener, A. J., Verghese, P. B., Stewart, F. R., West, T., Paoletti, A. C., Kasper, T. R., DeMattos, R. B., Zlokovic, B. V., and Holtzman, D. M. Low-density lipoprotein receptor overexpression enhances the rate of brain-to-blood Abeta clearance in a mouse model of beta-amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15502-15507

31. Katsouri, L., and Georgopoulos, S. Lack of LDL receptor enhances amyloid deposition and decreases glial response in an Alzheimer's disease mouse model. *PLoS One* **6**, e21880

10

20

30

40

50

32. Huang, Z., Zhou, X., Nicholson, A. C., Gotto, A. M., Jr., Hajjar, D. P., and Han, J. (2008) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  in mice induces expression of the hepatic low-density lipoprotein receptor. *Br J Pharmacol* **155**, 596-605

33. Bahr, B. A., Abai, B., Gall, C. M., Vanderklish, P. W., Hoffman, K. B., and Lynch, G. (1994) Induction of beta-amyloid-containing polypeptides in hippocampus: evidence for a concomitant loss of synaptic proteins and interactions with an excitotoxin. *Exp Neurol* **129**, 81-94

10

34. Nixon, R. A., and Yang, D. S. Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**

35. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004) Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* **279**, 47704-47710

36. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2503-2518

20

37. Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2007) ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* **17**, 422-427

38. Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**, 1749-1760

39. Tanida, I., Yamaji, T., Ueno, T., Ishiura, S., Kominami, E., and Hanada, K. (2008) Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. *Autophagy* **4**, 131-134

30

40. Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542-545

41. Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2008) LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol* **445**, 77-88

42. Kuma, A., Matsui, M., and Mizushima, N. (2007) LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates

40

independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization.

*Autophagy* **3**, 323-328

43. Zheng, L., Cedazo-Minguez, A., Hallbeck, M., Jerhammar, F., Marcusson, J., and Terman, A. Intracellular distribution of amyloid beta peptide and its relationship to the lysosomal system. *Transl Neurodegener* **1**, 19

44. Orr, M. E., and Oddo, S. Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* **5**, 53

10

45. Parr, C., Carzaniga, R., Gentleman, S. M., Van Leuven, F., Walter, J., and Sastre, M. Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid-beta precursor protein. *Mol Cell Biol* **32**, 4410-4418

46. Kanekiyo, T., Cirrito, J. R., Liu, C. C., Shinohara, M., Li, J., Schuler, D. R., Holtzman, D. M., and Bu, G. Neuronal clearance of amyloid-beta by endocytic receptor LRP1. *J Neurosci* **33**, 19276-19283

47. Kanekiyo, T., Liu, C. C., Shinohara, M., Li, J., and Bu, G. LRP1 in brain vascular smooth muscle cells mediates local clearance of Alzheimer's amyloid-beta. *J Neurosci* **32**, 16458-16465

20

48. Doens, D., and Fernandez, P. L. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid beta for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* **11**, 48

49. Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G. Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E., and Mucke, L. (2001) TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* **7**, 612-618

30

50. Masliah, E., Ho, G., and Wyss-Coray, T. (2001) Functional role of TGF beta in Alzheimer's disease microvascular injury: lessons from transgenic mice. *Neurochem Int* **39**, 393-400

51. Rivest, S. TREM2 enables amyloid beta clearance by microglia. *Cell Res* **25**, 535-536

52. Harris, F. M., Teseur, I., Brecht, W. J., Xu, Q., Mullendorff, K., Chang, S., Wyss-Coray, T., Mahley, R. W., and Huang, Y. (2004) Astroglial

40

regulation of apolipoprotein E expression in neuronal cells. Implications for Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **279**, 3862-3868

53. Wyss-Coray, T., Loike, J. D., Brionne, T. C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S. C., and Husemann, J. (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* **9**, 453-457

54. Rolyan, H., Feike, A. C., Upadhaya, A. R., Waha, A., Van Dooren, T., Haass, C., Birkenmeier, G., Pietrzik, C. U., Van Leuven, F., and Thal, D. R. Amyloid-beta protein modulates the perivascular clearance of neuronal apolipoprotein E in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)* **118**, 699-712

10

55. Carpentier, M., Robitaille, Y., DesGroseillers, L., Boileau, G., and Marcinkiewicz, M. (2002) Declining expression of neprilysin in Alzheimer disease vasculature: possible involvement in cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 849-856

56. Dorfman, V. B., Pasquini, L., Riudavets, M., Lopez-Costa, J. J., Villegas, A., Troncoso, J. C., Lopera, F., Castano, E. M., and Morelli, L. Differential cerebral deposition of IDE and NEP in sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **31**, 1743-1757

20

57. Leissring, M. A., Farris, W., Chang, A. Y., Walsh, D. M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M. P., and Selkoe, D. J. (2003) Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* **40**, 1087-1093

58. Farris, W., Mansourian, S., Chang, Y., Lindsley, L., Eckman, E. A., Frosch, M. P., Eckman, C. B., Tanzi, R. E., Selkoe, D. J., and Guenette, S. (2003) Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4162-4167

30

59. Yin, K. J., Cirrito, J. R., Yan, P., Hu, X., Xiao, Q., Pan, X., Bateman, R., Song, H., Hsu, F. F., Turk, J., Xu, J., Hsu, C. Y., Mills, J. C., Holtzman, D. M., and Lee, J. M. (2006) Matrix metalloproteinases expressed by

40

astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism. *J Neurosci* **26**, 10939-10948

60. Yan, P., Hu, X., Song, H., Yin, K., Bateman, R. J., Cirrito, J. R., Xiao, Q., Hsu, F. F., Turk, J. W., Xu, J., Hsu, C. Y., Holtzman, D. M., and Lee, J. M. (2006) Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-beta fibrils in vitro and compact plaques in situ. *J Biol Chem* **281**, 24566-24574

61. Utter, S., Tamboli, I. Y., Walter, J., Upadhaya, A. R., Birkenmeier, G., Pietrzik, C. U., Ghebremedhin, E., and Thal, D. R. (2008) Cerebral small vessel disease-induced apolipoprotein E leakage is associated with Alzheimer disease and the accumulation of amyloid beta-protein in perivascular astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 842-856

62. Thal, D. R., Larionov, S., Abramowski, D., Wiederhold, K. H., Van Dooren, T., Yamaguchi, H., Haass, C., Van Leuven, F., Staufenbiel, M., and Capetillo-Zarate, E. (2007) Occurrence and co-localization of amyloid beta-protein and apolipoprotein E in perivascular drainage channels of wild-type and APP-transgenic mice. *Neurobiol Aging* **28**, 1221-1230

63. Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Tripoli, D. L., Czerniewski, L., Ballabio, A., Cirrito, J. R., Diwan, A., and Lee, J. M. Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing Abeta Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis. *J Neurosci* **35**, 12137-12151

#### 【 0 0 3 8 】

本発明はその特定の例示的な実施形態を参照して説明及び例証されているが、該発明がそれら例示的な実施形態に限られることを意図するものではない。下記特許請求の範囲に規定されている本発明の真の範囲及び趣旨から逸脱することなく、変形や修正を施すことは可能であることを当業者であれば認識するであろう。したがって、本発明のすべてのそのような変形及び修正は、添付された特許請求の範囲及びそれと均等な範囲内に含まれることを意図している。

本発明のまた別の態様は、以下のとおりであってもよい。

〔 1 〕 対象の脳内のアミロイド タンパク質集合体を低減するための方法であって、そのような治療を必要とする対象に治療効果量のビタミン A 又はその誘導体と増殖因子活性化受容体 (「 P P A R 」) のアゴニストの組合せを含む組成物を投与するステップを含む、前記方法。

〔 2 〕 治療効果量がアストロサイトによるアミロイド タンパク質の取り込みを刺激する量である、前記〔 1 〕に記載の方法。

〔 3 〕 治療効果量が、アストロサイトによるアミロイド タンパク質の分解を刺激する量である、前記〔 1 〕に記載の方法。

〔 4 〕 前記アゴニストが、両親媒性カルボン酸である、前記〔 1 〕に記載の方法。

〔 5 〕 前記アゴニストが、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、シプロフィブラート、



ベザフィブラート、クリノフィブラート及びフェノフィブラートから成る群より選択される、前記〔４〕に記載の方法。

〔６〕前記アゴニストが、ゲムフィブロジルである、前記〔５〕に記載の方法。

〔７〕前記組成物がレチノイン酸を含む、前記〔１〕に記載の方法。

〔８〕前記組成物が少なくとも１つの薬学的に許容される担体を更に含む、前記〔１〕に記載の方法。

〔９〕前記組成物が経口投与される、前記〔１〕に記載の方法。

〔１０〕前記組成物が、皮下、関節内、皮内、静脈内、腹腔内及び筋肉内経路から成る群より選択される経路によって投与される、前記〔１〕に記載の方法。

〔１１〕前記組成物が、直接対象の中枢神経系に投与される、前記〔１〕に記載の方法。

〔１２〕前記対象が、アルツハイマー病の症状を示す対象である、前記〔１〕に記載の方法。

〔１３〕前記対象がヒト対象である、前記〔１〕に記載の方法。

〔１４〕対象の脳内のアミロイド タンパク質集合体を低減するための方法であって、治療効果量の増殖因子活性化受容体（「PPAR」）のアゴニストを含む組成物を対象に投与するステップを含む、前記方法。

〔１５〕PPAR のアゴニストを投与することを含み、前記アゴニストが両親媒性カルボン酸である、前記〔１４〕に記載の方法。

〔１６〕前記アゴニストが、クロフィブラート、ゲムフィブロジル、シプロフィブラート、ベザフィブラート、クリノフィブラート及びフェノフィブラートから成る群より選択される、前記〔１５〕に記載の方法。

〔１７〕前記アゴニストが、ゲムフィブロジルである、前記〔１６〕に記載の方法。

〔１８〕前記組成物が、ビタミンＡ又はその誘導体を更に含む、前記〔１４〕に記載の方法。

〔１９〕前記組成物がレチノイン酸を更に含む、前記〔１４〕に記載の方法。

〔２０〕前記組成物が少なくとも１つの薬学的に許容される担体を更に含む、前記〔１９〕に記載の方法。

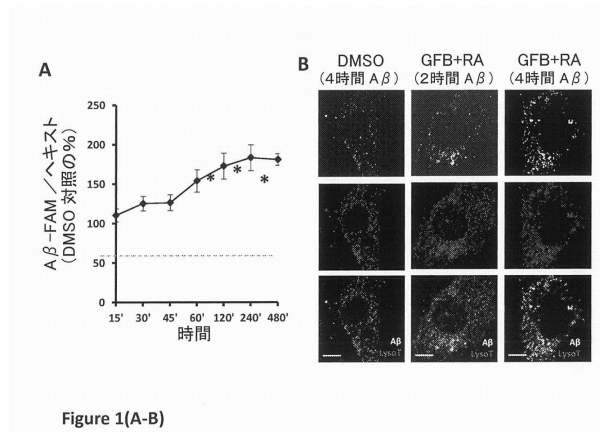
〔２１〕前記対象がヒト対象である、前記〔１４〕に記載の方法。

〔２２〕ビタミンＡ又はその誘導体、増殖因子活性化受容体（「PPAR」）のアゴニスト及び少なくとも１つの薬学的に許容される担体を含む、組成物。

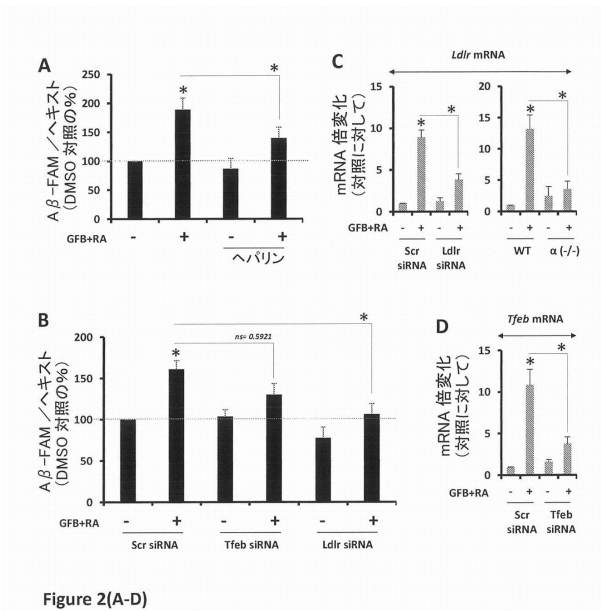
〔２３〕前記増殖因子活性化受容体（「PPAR」）のアゴニストがゲムフィブロジルであり、ビタミンＡ誘導体がレチノイン酸である、前記〔２２〕に記載の組成物。

【図面】

【図１Ａ－Ｂ】



【図２Ａ－Ｄ】



10

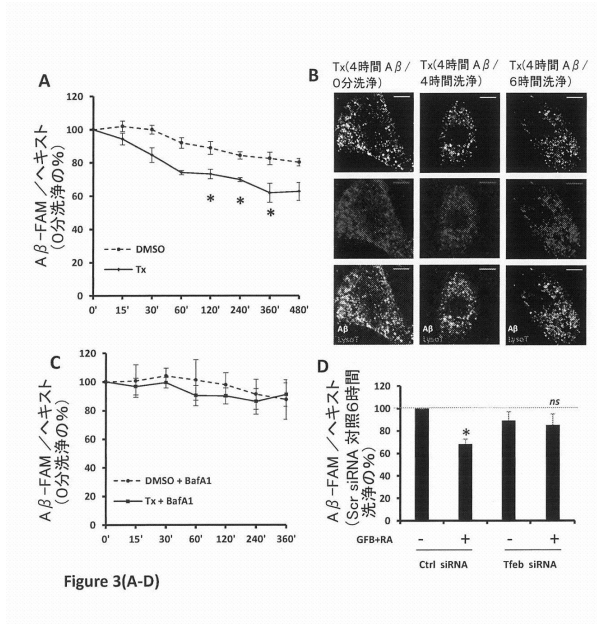
20

30

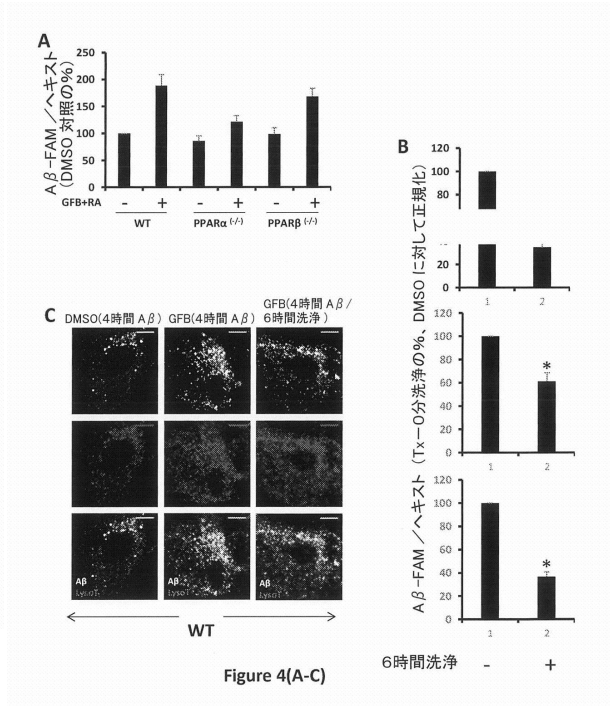
40

50

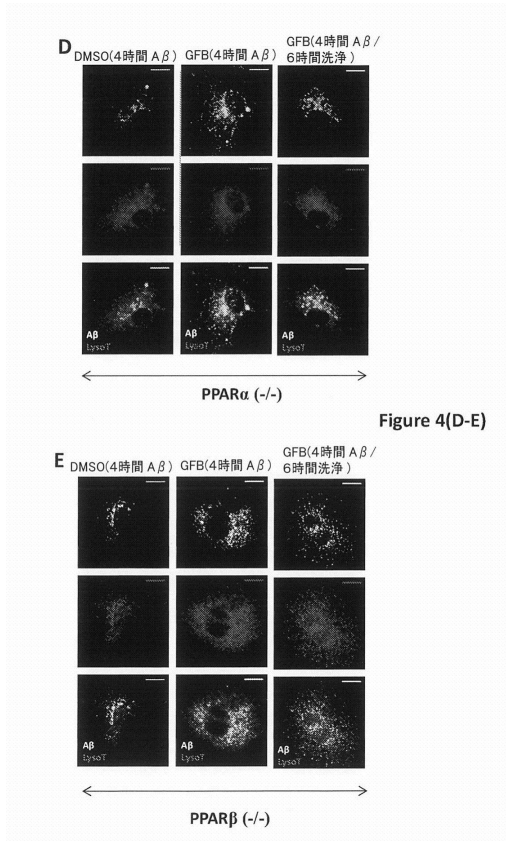
【図 3 A - D】



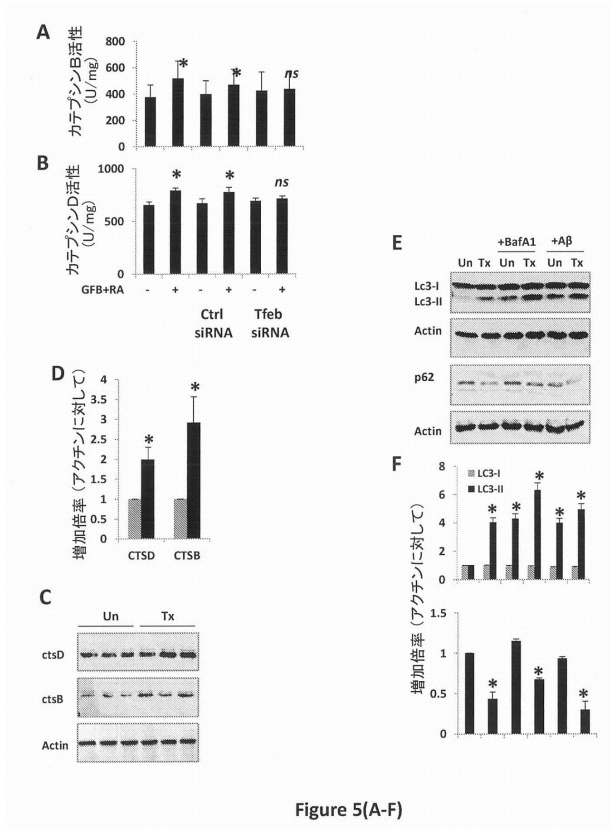
【図 4 A - C】



【図 4 D - E】



【図 5 A - F】



10

20

30

40

50

【 図 6 】

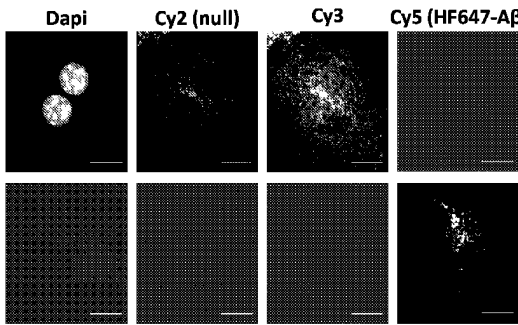


Figure 6

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

- 弁理士 浅井 賢治  
(74)代理人 100119013  
弁理士 山崎 一夫  
(74)代理人 100123777  
弁理士 市川 さつき  
(74)代理人 100111796  
弁理士 服部 博信  
(74)代理人 100212509  
弁理士 太田 知子  
(72)発明者 パハン カリパダ  
アメリカ合衆国 イリノイ州 60612 シカゴ ウェスト コンgress パークウェイ 1653  
ラッシュ ユニヴァーシティ メディカル センター内  
(72)発明者 ゴーシュ アルナヴァ  
アメリカ合衆国 イリノイ州 60612 シカゴ ウェスト コンgress パークウェイ 1653  
ラッシュ ユニヴァーシティ メディカル センター内  
審査官 今村 明子  
(56)参考文献 米国特許出願公開第2015/0313863 (US, A1)  
The Journal of Biological Chemistry, 2015年, Vol.290, No.16, pp.10309-10324  
The Journal of Neuroscience, 2014年, Vol.34, No.29, pp.9607-9620  
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
A61K 31/00 - 33/44  
A61K 45/00 - 45/08  
A61P 1/00 - 43/00  
CAPLUS / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)