

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4855268号
(P4855268)

(45) 発行日 平成24年1月18日(2012.1.18)

(24) 登録日 平成23年11月4日(2011.11.4)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/15 (2006.01)

GO 1 N 33/15 Z

GO 1 N 33/50 (2006.01)

GO 1 N 33/50 Z

請求項の数 6 (全 27 頁)

(21) 出願番号 特願2006-546716 (P2006-546716)
 (86) (22) 出願日 平成17年11月30日(2005.11.30)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2005/022406
 (87) 国際公開番号 W02006/059777
 (87) 国際公開日 平成18年6月8日(2006.6.8)
 審査請求日 平成20年11月19日(2008.11.19)
 (31) 優先権主張番号 特願2004-347861 (P2004-347861)
 (32) 優先日 平成16年11月30日(2004.11.30)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 500409323
 アンジェスMG株式会社
 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (72) 発明者 林 真一郎
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
 人大阪大学内
 (72) 発明者 里 直行
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
 人大阪大学内
 (72) 発明者 竹内 大亮
 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法
 人大阪大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルツハイマー治療剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験物質の存在下および非存在下に、 β -アミロイド1-40を血管内皮前駆細胞と接触させ、両条件下における該細胞の分化の程度を比較することを含む、 β -アミロイド1-40の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法。

【請求項2】

被験物質の存在下および非存在下に、 β -アミロイド1-40を幹細胞と接触させ、両条件下における該細胞の内皮前駆体への分化の程度を比較することを含む、 β -アミロイド1-40の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法。

【請求項3】

被験物質の存在下および非存在下に、 β -アミロイド1-40をプロテインキナーゼB活性を発現し得る細胞と接触させ、両条件下におけるプロテインキナーゼBの活性を比較することを含む、 β -アミロイド1-40のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法。

【請求項4】

下記工程を含む、 β -アミロイド1-40の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法：

(1) 被験物質の存在下、 β -アミロイド1-40を血管内皮前駆細胞と接触させる工程
 (2) 上記(1)で接触させた細胞における分化の程度を測定し、被験物質の非存在下で

β - アミロイド 1 - 4 0 と接触させた対照細胞における分化の程度と比較する工程

(3) 上記 (2) の比較結果に基づいて、β - アミロイド 1 - 4 0 の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害した被験物質を選択する工程。

【請求項 5】

下記工程を含む、β - アミロイド 1 - 4 0 の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法：

(a) 被験物質の存在下、β - アミロイド 1 - 4 0 を幹細胞と接触させる工程

(b) 上記 (a) で接触させた細胞における内皮前駆体への分化の程度を測定し、被験物質の非存在下でβ - アミロイド 1 - 4 0 と接触させた対照細胞における分化の程度と比較する工程

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、β - アミロイド 1 - 4 0 の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害した被験物質を選択する工程。

【請求項 6】

下記工程を含む、β - アミロイド 1 - 4 0 のプロテインキナーゼ B 活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法：

(i) 被験物質の存在下、β - アミロイド 1 - 4 0 をプロテインキナーゼ B の活性を発現し得る細胞と接触させる工程

(i i) 上記 (i) で接触させた細胞におけるプロテインキナーゼ B の活性を測定し、被験物質の非存在下でβ - アミロイド 1 - 4 0 と接触させた対照細胞におけるプロテインキナーゼ B の活性と比較する工程

(i i i) 上記 (i i) の比較結果に基づいて、β - アミロイド 1 - 4 0 のプロテインキナーゼ B 活性抑制作用を阻害する被験物質を選択する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、β - アミロイド 1 - 4 0 (以下、A β 1 - 4 0 と称す) の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および / もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに / または血管新生を促進する物質を有効成分とする、アルツハイマー病の予防・治療剤に関する。また、本発明は、A β 1 - 4 0 のプロテインキナーゼ B (以下、A k t / P K B と称す) 活性抑制作用を阻害する物質を有効成分とする、アルツハイマー病の予防・治療剤に関する。さらに本発明は、アルツハイマー病の予防・治療剤となり得る、A β 1 - 4 0 の、血管内皮前駆細胞の分化抑制作用を阻害する物質、A β 1 - 4 0 の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質、および A β 1 - 4 0 の A k t / P K B 活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

アルツハイマー病は老年性痴呆症の代表とされる脳の変性疾患であり、その患者の数は増加の一途をたどっている。アルツハイマー病患者の脳神経機能低下に伴う生活の質 (Q u a l i t y o f L i f e) の低下は、患者本人に加え家族など周囲に多大な影響を与え、高齢化社会の抱える深刻な問題となっている。アルツハイマー病の研究は精力的に進められているが、まだ発症機構の全貌も明らかではなく、その根治薬はいまだ開発されていないのが現状である。

アルツハイマー病は多様な症候群とされているが、多数の病理学的な所見により、脳における神経変性および β - アミロイド (以下、A β と称す) 産生 / 蓄積が重要な要因であることがわかっている。A β は、アルツハイマー病の主要な神経病理学的変化の 1 つである老人斑を構成する主要成分であり、アミロイド前駆体タンパク質 (A P P) が 2 種の (β - 及び γ -) セクレターゼで切断されることにより産生される。その主要な分子種として、4 0 アミノ酸残基からなる A β 1 - 4 0 と C 末端側がさらに 2 残基長い A β 1 - 4 2 がある。A β は神経細胞に対して細胞毒性を示すが、この作用は単一分子よりも A β が凝集した状態、さらに線維化した状態でより顕著となる。A β の凝集速度は C 末端部分の長さによって異なり、A β 1 - 4 0 よりも A β 1 - 4 2 でより凝集・線維化しやすい。従って、細胞外に分泌される A β の約 9 0 % が A β 1 - 4 0 であるにもかかわらず、脳実質

10

20

30

40

50

に蓄積するA β の主要な分子種はA β 1 - 4 2である。また、 γ -セクレターゼ活性を担うプレセニリン(P S)に見出されるすべての病原性突然変異はA β 1 - 4 0に対するA β 1 - 4 2の相対的産生量を増大させることが知られている。従って、アルツハイマー病の発症・進展においてA β 1 - 4 2が極めて重要であることは間違いない。

A β 1 - 4 2が老人斑に主に局在し、脳血管にほとんど存在しないのに対し、A β 1 - 4 0は老人斑よりもむしろ脳血管に主に局在する(Stephen A.ら、J. Biol. Chem., 270(13):7013-16, 1995年参照)。また、A β 1 - 4 0の産生がA β 1 - 4 2に対して相対的に優勢になると、A β 1 - 4 0の血管壁細胞への沈着が促進され、脳アミロイド血管症(CAA)を引き起こすとの知見に基づき、A β 1 - 4 0阻害剤を用いてCAAを治療する方法が記載されている(特表2003-532656号公報参照)。しかしながら、A β 1 - 4 0がアルツハイマー病発症の引き金を引くことを示す明確な証拠はこれまでに見出されていない。

10

最近の研究より、神経発生と血管発生とは密接に関連し合っていることが示されている。しかしながら、従来のアルツハイマー病の研究においては、A β の産生/蓄積や神経原線維化(異常リン酸化タウ蛋白質の蓄積による)等の神経変性に焦点が当てられてきた。例えば、アルツハイマー病の予防および処置として、A β に対する免疫応答を利用したワクチン療法(特表2002-502802号公報参照)や、 β -セクレターゼまたは γ -セクレターゼを阻害してA β の産生を阻止する方法などが報告されている。

近年、脳アテローム硬化による進行性の血流低下および代謝低下がアルツハイマー病の最初期段階を引き起こす(Rafael H.ら、Stroke 34(8):e106, Epub, 2003年参照)、脳虚血は血液脳関門を損傷し、脳内APPおよびApoEをアップレギュレーションすることにより、A β の沈着を加速させる(Sadowski, Pankiewiczら、Neurochemical Research, vol. 29, No. 6, 2004年、参照)などの報告にみられるように、アルツハイマー病における血管障害の側面が注目を浴び始めている。しかしながら、血管障害がアルツハイマー病の発症や進展にどのように関連するのかについては、未だほとんど解明されていないのが現状である。

20

したがって、本発明が解決しようとする課題は、アルツハイマー病の発症・進展と血管障害との関連を明らかにし、当該関連性を利用した新規のアルツハイマー病の予防・治療剤を提供することである。また本発明の別の課題は、上記の新規作用機序に基づくアルツハイマー病の予防・治療物質をスクリーニングする方法を提供することである。

30

【発明の開示】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、血管中に局在していることが知られているA β 1 - 4 0が、血管内皮細胞の分化、増殖、遊走、および管形成を阻害すること、および幹細胞からの内皮前駆体分化抑制を阻害すること、並びに血管の発生・成熟を阻害することを見出した。さらに本発明者らは、A β 1 - 4 0の上記作用が、VEGF刺激により活性化されるAkt/PKB経路の阻害に基づくことを見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

40

(1) β -アミロイド1 - 4 0の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに/または血管新生を促進する物質を有効成分とする、アルツハイマー病の予防・治療剤、

(2) β -アミロイド1 - 4 0の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに/または血管新生を促進する物質がサイトカインである、(1)に記載の剤、

(3) β -アミロイド1 - 4 0の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害するサイトカインが、肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インスリン様増殖因子(IGF)および神経成長因子(NGF)からなる群よ

50

り選ばれる１種以上である、(２)に記載の剤、

(４)血管新生を促進するサイトカインが、肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、チミジンホスホリラーゼ(TdRPase)、血小板由来内皮細胞増殖因子(PD-ECGF)、インスリン様増殖因子(IGF)および神経成長因子(NGF)からなる群より選ばれる１種以上である、(２)に記載の剤、

(５)β-アミロイド１-４０の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および／もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する蛋白質ならびに／または血管新生を促進する蛋白質をコードする核酸を含んでなる、アルツハイマー病の予防・治療剤、

(６)被験物質の存在下および非存在下に、β-アミロイド１-４０を血管内皮前駆細胞と接触させ、両条件下における該細胞の分化の程度を比較することを含む、β-アミロイド１-４０の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法、

(７)被験物質の存在下および非存在下に、β-アミロイド１-４０を幹細胞と接触させ、両条件下における該細胞の内皮前駆体への分化の程度を比較することを含む、β-アミロイド１-４０の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法、

(８)アルツハイマー病の予防・治療物質のスクリーニング方法である、(６)または(７)に記載の方法、

(９)被験物質の存在下および非存在下に血管新生が誘導され得る細胞を培養し、両条件下における該細胞における血管新生の程度を比較することを含む、アルツハイマー病の予防・治療物質のスクリーニング方法、

(１０)β-アミロイド１-４０のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質および／またはプロテインキナーゼBの活性を促進する物質を有効成分とする、アルツハイマー病の予防・治療剤、

(１１)β-アミロイド１-４０のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質および／またはプロテインキナーゼBの活性を促進する物質がサイトカインである、(１０)に記載の剤、

(１２)サイトカインが、肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、神経成長因子(NGF)、血小板由来増殖因子(PDGF)、チミジンホスホリラーゼ(TdRPase)、血小板由来内皮細胞増殖因子(PD-ECGF)、インスリン様増殖因子(IGF)および神経成長因子(NGF)からなる群より選ばれる１種以上である、(１１)に記載の剤、

(１３)β-アミロイド１-４０のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する蛋白質および／またはプロテインキナーゼBの活性を促進する物質をコードする核酸を含んでなる、アルツハイマー病の予防・治療剤、

(１４)被験物質の存在下および非存在下に、β-アミロイド１-４０をプロテインキナーゼB活性を発現し得る細胞と接触させ、両条件下におけるプロテインキナーゼBの活性を比較することを含む、β-アミロイド１-４０のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法、

(１５)アルツハイマー病の予防・治療物質のスクリーニング方法である、(１４)に記載の方法、

(１６)被験物質の存在下および非存在下にプロテインキナーゼB活性を発現し得る細胞を培養し、両条件下における該細胞におけるプロテインキナーゼB活性を比較することを含む、アルツハイマー病の予防・治療物質のスクリーニング方法、

(１７)β-アミロイド１-４０の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および／もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに／または血管新生を促進する物質を投与することを含む、アルツハイマー病の予防・治療方法、

(１８)β-アミロイド１-４０のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質および／またはプロテインキナーゼBの活性を促進する物質を投与することを含む、アルツ

10

20

30

40

50

ハイマー病の予防・治療方法、

(19) アルツハイマー病の予防・治療剤を製造するための、 β -アミロイド1-40の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに/または血管新生を促進する物質の使用、および

(20) アルツハイマー病の予防・治療剤を製造するための、 β -アミロイド1-40のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質および/またはプロテインキナーゼBの活性を促進する物質の使用、を提供する。

【図面の簡単な説明】

図1は、実施例1の結果を示すグラフである。

図2は、実施例1の結果を示す顕微鏡写真である。

図3は、実施例2の結果を示すグラフである。

図4は、実施例2の結果を示す顕微鏡写真である。

図5は、実施例3の結果を示すグラフである。

図6は、実施例4の結果(血管密度)を示すグラフである。

図7は、実施例4の結果(ヘモグロビン含有量)を示すグラフである。

図8は、実施例5の結果を示すグラフである。

図9は、実施例6の結果(Akt)を示す電気泳動像である。

図10は、実施例6の結果を示すグラフである。

図11は、実施例6の結果(Phospho-ERK, +VEGF)を示す電気泳動像である。

図12は、実施例6の結果(Phospho-ERK, +VEGF + $A\beta$ 1-40)を示す電気泳動像である。

図13は、実施例7の結果を示す顕微鏡写真である。

図14は、試験例1(水飲み場探し試験)においてヒトHGF遺伝子を導入した際の効果を示したグラフである。

図15は、試験例2(Y-Maze試験)においてヒトHGF遺伝子を導入した際の効果を示したグラフである。

発明の詳細な説明

以下に本発明の実施の形態について説明する。

本発明における「予防・治療剤」とは、疾患患者の病状を予防および治療するために用いられるものであり、ここでいう治療とは、症状の改善、病状ないし症状の進展(悪化)防止をも含む概念である。

本発明の予防・治療剤は、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒト等)に対して効果を有し、アルツハイマー病に対して有用である。

本発明においてアルツハイマー病とは、脳の神経細胞が変性・脱落する病気であり、そのことにより引き起こされる病態の総称である。その程度、症状は様々であるが、いずれも本願の発明の予防および治療剤の対象となる。

本発明の予防・治療剤は、有効成分として $A\beta$ 1-40の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに/または血管新生を促進する物質を含有する。

$A\beta$ 1-40の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質、血管新生を促進する物質は当該作用を示すものであれば特に限定されないが、例えばサイトカイン等が挙げられる。ここで、サイトカインの語は、当該技術分野で普通に用いられている意味、内容を表すものとして使用している。

$A\beta$ 1-40の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害するサイトカインとしては、例えば、種々の間葉系細胞によって産生される肝細胞増殖因子(HGF)、マクロファージ・平滑筋細胞・腫瘍細胞などの細胞で産生される血管内皮増殖因子(VEGF)、内皮を含む様々な細胞から分泌される線維芽細胞増殖因子(FGF)、唾液中や尿中に比較的多く存在することが知られている上

10

20

30

40

50

皮細胞増殖因子 (EGF)、様々な種類の細胞の増殖を促進するインスリン様増殖因子 (IGF)、神経栄養因子の1種である神経成長因子 (NGF) などが挙げられるが、好ましくは HGF、VEGF、FGF および EGF であり、さらに好ましくは HGF、VEGF および FGF である。

また、血管新生を促進するサイトカインとしては、例えば肝細胞増殖因子 (HGF)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、上皮細胞増殖因子 (EGF)、血清中に存在する血小板由来増殖因子 (PDGF)、インスリン様増殖因子 (IGF)、神経成長因子 (NGF) の他に、ピリミジンヌクレオシド代謝に関与する酵素であるチミジンホスホリラーゼ (TdRase) および血小板から精製される血小板由来内皮細胞増殖因子 (PD-ECGF) などが挙げられるが、好ましくは HGF、VEGF、FGF および EGF である。

10

本発明におけるサイトカインは、温血動物 (例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど) の細胞 [例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞 (例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など] もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織 [例えば、脳、脳の各部位 (例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管 (例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、脂肪組織、骨格筋] などに由来する蛋白質であってよく、また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で合成された蛋白質であってもよい。あるいは当該蛋白質をコードする塩基配列を含有する核酸を導入された形質転換体から産生された組換え蛋白質であってもよい。

20

該サイトカインは、C末端がカルボキシル基 ($-COOH$)、カルボキシレート ($-COO^-$)、アミド ($-CONH_2$) またはエステル ($-COOR$) の何れであってもよい。

30

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基；例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基；例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基；例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基； α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基；ピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

サイトカインがC末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のサイトカインに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

40

さらに、サイトカインには、N末端のアミノ酸残基 (例、メチオニン残基) のアミノ基が保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイルなどの C_{1-6} アシル基など) で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基 (例えば、 $-OH$ 、 $-SH$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など) が適当な保護基 (例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など) で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

また、該サイトカインは、酸または塩基との生理学的に許容される塩であってもよく、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機

50

酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられるが、これらに限定されない。

サイトカインを上記のような細胞・組織等から単離・精製する場合、該細胞・組織を常法に従ってホモジナイズした後、自体公知の蛋白質分離法、例えば、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などを適宜組み合わせで行うことができる。かくして得られるサイトカインが遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって該遊離体を塩に変換することができ、該蛋白質が塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

10

本発明で用いられるサイトカインは、 $\text{A}\beta 1-40$ の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害ならびに/または血管新生を促進する限り、全長蛋白質だけでなくそのフラグメント（部分ペプチド）であってもよい。

本発明で用いられるサイトカインまたはその部分ペプチドは、公知のペプチド合成法に従って製造することもできる。

20

ペプチド合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれであってもよい。サイトカインを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合し、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的とする蛋白質を製造することができる。

ここで、縮合や保護基の脱離は、自体公知の方法、例えば、以下の(1)～(5)に記載された方法に従って行われる。

(1) M. BodanszkyおよびM. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス(Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

30

(2) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

(3) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)

(4) 矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座1、蛋白質の化学IV、205、(1977年)

(5) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

このようにして得られたサイトカインまたはその部分ペプチドは、公知の精製法により単離・精製することができる。ここで、精製法としては、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶、これらの組み合わせなどが挙げられる。

40

上記方法で得られるサイトカインまたはその部分ペプチドが遊離体である場合には、該遊離体を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆にサイトカインまたはその部分ペプチドが塩として得られた場合には、該塩を公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

サイトカインの部分ペプチドまたはその塩は、全長蛋白質またはその塩を適当なペプチダーゼで切断することによっても製造することができる。

さらに、本発明のサイトカインまたはその部分ペプチドは、それをコードする核酸を含有する形質転換体を培養し、得られる培養物からサイトカインまたはその部分ペプチドを分離精製することによって製造することもできる。

サイトカインまたはその部分ペプチドをコードする核酸はDNAであってもRNAであ

50

ってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖(即ち、コード鎖)であっても、アンチセンス鎖(即ち、非コード鎖)であってもよい。

サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、ゲノムDNA、温血動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)のあらゆる細胞[例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞などや血球系の細胞]、あるいはそれらの細胞が存在するあらゆる組織[例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳梁、黒質)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など]由来のcDNA、合成DNAなどが挙げられる。サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNA画分および全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction(以下、「PCR法」と略称する)およびReverse Transcription-PCR(以下、「RT-PCR法」と略称する)によって直接増幅することもできる。あるいは、サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするゲノムDNAおよびcDNAは、上記した細胞・組織より調製したゲノムDNAおよび全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはブランクハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。

サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするDNAは、該蛋白質またはペプチドをコードする塩基配列の一部を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当な発現ベクターに組み込んだDNAを、本発明の蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを標識したものとハイブリダイゼーションすることによってクローニングすることができる。ハイブリダイゼーションは、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)第2版(前述)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、ハイブリダイゼーションは、該ライブラリーに添付された使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

DNAの塩基配列は、公知のキット、例えば、MutantTM-super Express Km(宝酒造(株))、MutantTM-K(宝酒造(株))等を用いて、OD A-LA PCR法、Gapped duplex法、Kunkel法等の自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って変換することができる。

クローン化されたDNAは、目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化するか、リンカーを付加した後に、使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することができる。

上記のサイトカインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターで

宿主を形質転換し、得られる形質転換体を培養することによって、該蛋白質またはペプチドを製造することができる。

サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含む発現ベクターは、例えば、サイトカインをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13）；枯草菌由来のプラスミド（例、pUB110、pTP5、pC194）；酵母由来プラスミド（例、pSH19、pSH15）；λファージなどのバクテリオファージ；レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス；pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNAI/Neoなどが用いられる。

プロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

例えば、宿主が動物細胞である場合、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-TKプロモーターなどが用いられる。なかでも、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが好ましい。

宿主がバチルス属菌である場合、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなどが好ましい。

宿主が酵母である場合、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。

宿主が昆虫細胞である場合、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターとしては、上記の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用い、dhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によって選択することもできる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）を、サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするDNAの5'末端側に付加してもよい。宿主がエシェリヒア属菌である場合、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが；宿主がバチルス属菌である場合、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが；宿主が酵母である場合、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列などが；宿主が動物細胞である場合、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ用いられる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシズ・リ

10

20

30

40

50

サーチ (Nucleic Acids Research), 9 巻, 309 (1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120 巻, 517 (1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41 巻, 459 (1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39 巻, 440 (1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン (Gene), 24 巻, 255 (1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95 巻, 87 (1984)] などが用いられる。

10

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンペ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスが AcNPV の場合、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf 細胞)、Trichoplusia ni の中腸由来の MG1 細胞、Trichoplusia ni の卵由来の High FiveTM 細胞、Mamestra brassicae 由来の細胞、E. stigmata acraea 由来の細胞などが用いられる。ウイルスが BmNPV の場合、昆虫細胞としては、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N 細胞; BmN 細胞) などが用いられる。該 Sf 細胞としては、例えば、Sf9 細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21 細胞 (以上、Vaughn, J. L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

20

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315 巻, 592 (1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞 COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO 細胞と略記), dhfr 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞 CHO (以下、CHO (dhfr⁻) 細胞と略記), マウス L 細胞, マウス AtT-20, マウスミエローマ細胞, ラット GH3, ヒト FL 細胞などが用いられる。

30

形質転換は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

エシェリヒア属菌は、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69 巻, 2110 (1972) やジーン (Gene), 17 巻, 107 (1982) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

バチルス属菌は、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168 巻, 111 (1979) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

酵母は、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194 巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75 巻, 1929 (1978) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

40

昆虫細胞および昆虫は、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って形質転換することができる。

動物細胞は、例えば、細胞工学別冊 8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52 巻, 456 (1973) に記載の方法に従って形質転換することができる。

形質転換体の培養は、宿主の種類に応じ、公知の方法に従って実施することができる。

50

例えば、宿主がエシェリヒア属菌またはバチルス属菌である形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては液体培地が好ましい。また、培地は、形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物などを含有することが好ましい。ここで、炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖などが；窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質が；無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがそれぞれ挙げられる。また、培地には、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは、好ましくは約5～8である。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。必要により、プロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を培地に添加してもよい。

宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体の培養は、通常約15～43で、約3～24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主がバチルス属菌である形質転換体の培養は、通常約30～40で、約6～24時間行なわれる。必要により、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が酵母である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、バークホルダー(Burkholder)最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505(1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330(1984)〕などが挙げられる。培地のpHは、好ましくは約5～8である。培養は、通常約20～35で、約24～72時間行なわれる。必要に応じて、通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えばGrace's Insect Medium(Grace, T. C. C., ネイチャー(Nature), 195, 788(1962))に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6.2～6.4である。培養は、通常約27で、約3～5日間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する場合の培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス(Science), 122巻, 501(1952)〕, DMEM培地〔ヴィロロジー(Virology), 8巻, 396(1959)〕, RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)〕, 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)〕などが用いられる。培地のpHは、好ましくは約6～8である。培養は、通常約30～40で、約15～60時間行なわれる。必要に応じて通気や攪拌を行ってもよい。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外にサイトカインまたはその部分ペプチドを生成させることができる。

前記形質転換体を培養して得られる培養物から、サイトカインまたはその部分ペプチドを自体公知の方法に従って分離精製することができる。

例えば、サイトカインまたはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出する場合、培養物から公知の方法で集めた菌体あるいは細胞を適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊した後、遠心分離やろ過により可溶性蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。該緩衝液は、尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤を含んでいてもよい。

このようにして得られた可溶性画分中に含まれるサイトカインまたはその部分ペプチドの単離精製は、自体公知の方法に従って行うことができる。このような方法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法；透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法；イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法；アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法；逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法；等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法；などが用いられる。これらの方法は、適宜組み合わせることもできる。

かくして得られるサイトカインまたはその部分ペプチドが遊離体である場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって該遊離体を塩に変換することができ、該蛋白質またはペプチドが塩として得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により該塩を遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、形質転換体が産生するサイトカインまたはその部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。該蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして得られるサイトカインまたはその部分ペプチドの存在は、それに特異的親和性を有する抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより確認することができる。

さらに、サイトカインまたはその部分ペプチドは、それをコードするDNAに対応するRNAを鋳型として、ウサギ網状赤血球ライセート、コムギ胚芽ライセート、大腸菌ライセートなどからなる無細胞蛋白質翻訳系を用いてインビトロ翻訳することによっても合成することができる。あるいは、さらにRNAポリメラーゼを含む無細胞転写/翻訳系を用いて、サイトカインまたはその部分ペプチドをコードするDNAを鋳型としても合成することができる。無細胞蛋白質(転写/翻訳)系は市販のものを用いることもできるし、それ自体既知の方法、具体的には大腸菌抽出液はPratt J. M. et al., *Transcription and Translation*, 179-209, Hames B. D. & Higgins S. J. eds., IRL Press, Oxford (1984)に記載の方法等に従って調製することもできる。市販の細胞ライセートとしては、大腸菌由来のものはE. coli S30 extract system (Promega社製)やRTS 500 Rapid Translation System (Roche社製)等が挙げられ、ウサギ網状赤血球由来のものはRabbit Reticulocyte Lysate System (Promega社製)等、さらにコムギ胚芽由来のものはPROTEIOS TM (TOYOBO社製)等が挙げられる。このうちコムギ胚芽ライセートを用いたものが好適である。コムギ胚芽ライセートの作製法としては、例えばJohnston F. B. et al., *Nature*, 179, 160-161 (1957)あるいはErickson A. H. et al., *Methods Enzymol.*, 96, 38-50 (1996)等に記載の方法を用いることができる。

蛋白質合成のためのシステムまたは装置としては、パッチ法(Pratt J. M. et al. (1984) 前述)や、アミノ酸、エネルギー源等を連続的に反応系に供給する連続式無細胞蛋白質合成システム(Spirin A. S. et al., *Science*, 242, 1162-1164 (1988))、透析法(木川等、第21回日本分子

10

20

30

40

50

生物学会、WID6)、あるいは重層法(PROTEIOSTM Wheat germ cell-free protein synthesis core kit取扱説明書:TOYOBO社製)等が挙げられる。さらには、合成反応系に、鋳型のRNA、アミノ酸、エネルギー源等を必要時に供給し、合成物や分解物を必要時に排出する方法(特開2000-333673)等を用いることができる。

また、Aβ1-40の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質、血管新生を促進する物質が、上記サイトカインまたはその部分ペプチドなどの蛋白質またはペプチドである場合には、該物質はそれをコードする核酸、特に該核酸を含む発現ベクターの形態で本発明の予防・治療剤に配合させることができる。サイトカインまたはその部分ペプチドをコードする核酸としては、該サイトカインまたはその部分ペプチドを製造するのに用いられる上記核酸が例示される。発現ベクターは、上記の核酸が、投与対象である哺乳動物の細胞内でプロモーター活性を発揮し得るプロモーターに機能的に連結されていなければならない。使用されるプロモーターは、投与対象である哺乳動物で機能し得るものであれば特に制限はないが、例えば、SV40由来初期プロモーター、サイトメガロウイルスLTR、マウス肉腫ウイルスLTR、MoMuLV由来LTR、アデノウイルス由来初期プロモーター等のウイルスプロモーター、並びにβ-アクチン遺伝子プロモーター、PGK遺伝子プロモーター、トランスフェリン遺伝子プロモーター等の哺乳動物の構成タンパク質遺伝子プロモーターなどが挙げられる。

発現ベクターは、好ましくは上記の核酸の下流に転写終結シグナル、すなわちターミネーター領域を含有する。さらに、形質転換細胞選択のための選択マーカー遺伝子(テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、ハイグロマイシン、ホスフィノスリシン等の薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子、栄養要求性変異を相補する遺伝子等)をさらに含有することもできる。

発現ベクターとして使用される基本骨格のベクターは特に制限されないが、ヒト等の哺乳動物への投与に好適なベクターとしては、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンドビスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクターが挙げられる。

サイトカインまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターの投与は、治療対象動物自身の細胞を体外に取り出し、培養してから導入を行って体内に戻す*ex vivo*法と、投与対象の体内に直接ベクターを投与して導入を行う*in vivo*法のいずれかで行われる。*ex vivo*法の場合、標的細胞へのベクターの導入は、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム共沈殿法、PEG法、エレクトロポレーション法等により行うことができる。*in vivo*法の場合、ウイルスベクターは、注射剤等の形態で静脈内、動脈内、皮下、皮内、筋肉内、腹腔内等に投与される。あるいは、静脈内注射などによりベクターを投与すると、ウイルスベクターに対する中和抗体の産生が問題となるが、標的細胞の存在する部位に局所的にベクターを注入すれば(*in situ*法)、抗体の存在による悪影響を軽減することができる。

また、サイトカインまたはその部分ペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターとして非ウイルスベクターを使用する場合、該発現ベクターの導入は、ポリ-L-リジン-核酸複合体などの高分子キャリアを用いるか、リボソームに被包して行うことができる。あるいは、パーティクルガン法を用いてベクターを標的細胞に直接導入することもできる。

本発明の予防・治療剤は、Aβ1-40の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質ならびに/または血管新生を促進する物質に加え、任意の担体、例えば医薬上許容され得る担体を含むことができる。

医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウ

10

20

30

40

50

ム - グリコール - スターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白蠟等のベースワックスなどが挙げられるが、それらに限定されるものではない。

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量の物質を溶解させた液剤、有効量の物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッ

10

シエ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の物質を懸濁させた懸濁液剤、有効量の物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化させた乳剤等である。

非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容され得る担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

20

本発明の予防・治療剤の投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約 $1 \mu\text{g}$ ~ 約 1000mg 、好ましくは約 $10 \mu\text{g}$ ~ 約 500mg 、さらに好ましくは約 $100 \mu\text{g}$ ~ 約 100mg である。これを1回または数回に分けて投与する。

本発明の予防・治療剤は、 $\text{A}\beta 1 - 40$ の、血管内皮前駆細胞分化抑制作用および/もしくは幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質、または血管新生を促進する物質のいずれか1種が有効成分として含有されていればよく、或いは両方が含有されていてもよい。また、両方の作用を有する物質を単独で使用することもできる。さらに、 $\text{A}\beta 1 - 40$ の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害する物質および血管新生を促進する物質

30

のいずれか一方、あるいは両方がそれぞれ2種以上含有されていてもよい。本発明薬剤の投与方法は、経口投与、または点滴投与、注射投与（経静脈投与）等の非経口投与（摂取）でも良く、特に限定しないが、有効成分がタンパク質あるいはそれをコードする核酸の場合、筋肉注射、皮下投与などの局所投与が好ましい。

本発明の有効成分である物質は、それぞれが単独で、若しくは任意の組み合わせで製剤化されてもよく、又は全てを含有する製剤としてもよい。別々に製剤化して投与する場合、それらの投与経路、投与剤形は同一であっても異なってもよく、また各々を投与するタイミングも、同時であっても別々であってもよい。併用する薬剤の種類や効果によって適宜決定する。

40

本発明はまた、被験物質の存在下および非存在下に、 $\text{A}\beta 1 - 40$ を血管内皮前駆細胞と接触させ、両条件下における該細胞の分化の程度を比較することを含む、 $\text{A}\beta 1 - 40$ の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法により得られる物質、および当該物質を含有してなるアルツハイマー病の予防・治療剤を提供する。

本スクリーニング方法に供される被験物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

一実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、下記の工程（I）、（II）及び（

50

ⅠⅠⅠ)を含む：(Ⅰ)被験物質の存在下、 $A\beta 1-40$ を血管内皮前駆細胞と接触させる工程、

(ⅠⅠ)上記(Ⅰ)で接触させた細胞における分化の程度を測定し、被験物質の非存在下で $A\beta 1-40$ と接触させた対照細胞における分化の程度と比較する工程、

(ⅠⅠⅠ)上記(ⅠⅠ)の比較結果に基づいて、 $A\beta 1-40$ の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害した被験物質を選択する工程。

上記方法の工程(Ⅰ)では、被験物質の存在下、 $A\beta 1-40$ を血管内皮前駆細胞と接触させる。該接触は、培養培地中で行われ得る。細胞は、動物由来の血管内皮前駆細胞、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒト等の哺乳動物由来の血管内皮前駆細胞であり得る。血管内皮細胞は、例えば、ヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC)、ヒト臍動脈内皮細胞(HUAEC)、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)などが市販されており、これらを購入して利用することができる。

$A\beta 1-40$ を血管内皮前駆細胞と接触させる培養培地は、用いられる細胞の種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、約5～20%のウシ胎仔血清を含む最少必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、RPMI 1640培地、199培地などである。該培地には、内皮細胞への分化を誘導し得る成分、培養条件もまた、用いられる細胞の種類などに応じて適宜決定されるが、例えば、培地のpHは約6～約8であり、培養温度は通常約30～約40であり、培養時間は約12～約72時間である。(J. Clin. Invest., 1973 Nov; 52(11): 2745-56. 参照)

上記方法の工程(ⅠⅠ)では、まず、 $A\beta 1-40$ を接触させた細胞における細胞の分化抑制の程度が測定される。該測定は、用いた細胞の種類などを考慮し、自体公知の方法により行われ得る。

例えば、日本ベクトン・ディキンソン社製、BDバイオコートTMアンジオジェネシスシステム等のキットを用いて評価することができる。(http://www.bdj.co.jp/pdf/35-284-288.pdf)

次いで、被験物質の存在下で接触させた細胞における細胞の分化抑制の程度が、被験物質の非存在下で接触させた細胞における細胞の分化抑制の程度と比較される。分化の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行われる。被験物質の非存在下で接触させた対照細胞における分化の程度は、被験物質の存在下で接触させた細胞における分化の程度の測定に対し、事前に測定した分化の程度であっても、同時に測定した分化の程度であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した分化の程度であることが好ましい。

上記方法の工程(ⅠⅠⅠ)では、 $A\beta 1-40$ の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害した被験物質、即ち、対照細胞よりも細胞の分化を促進した被験物質が選択される。

本発明はまた、被験物質の存在下および非存在下に、 $A\beta 1-40$ を幹細胞と接触させ、両条件下における該細胞の内皮前駆体への分化の程度を比較することを含む、 $A\beta 1-40$ の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法により得られる物質、および当該物質を含有してなるアルツハイマー病の予防・治療剤を提供する。

本スクリーニング方法に供される被験物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

一実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、下記の工程(Ⅰ')、(ⅠⅠ')及び(ⅠⅠⅠ')を含む：(Ⅰ')被験物質の存在下、 $A\beta 1-40$ を幹細胞と接触させる工程、

(ⅠⅠ')上記(Ⅰ')で接触させた細胞における内皮前駆体への分化の程度を測定し、被験物質の非存在下で $A\beta 1-40$ と接触させた対照細胞における分化の程度と比較する

工程、

(I I I ') 上記 (I I ') の比較結果に基づいて、 $A\beta 1-40$ の幹細胞からの内皮前駆体分化抑制作用を阻害した被験物質を選択する工程。 培養条件、測定方法などは、上記のスクリーニング方法の工程 (I) 、 (I I) 及び (I I I) と同様に行う。

本発明はさらに、被験物質の存在下および非存在下に血管新生が誘導され得る細胞を培養し、両条件下における該細胞における血管新生の程度を比較することを含む、アルツハイマー病の予防・治療物質のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法により得られる物質、および当該物質を含有してなるアルツハイマー病の予防・治療剤を提供する。

本スクリーニング方法に供される被験物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

一実施形態では、本スクリーニング方法は、下記の工程 (a) 、 (b) 及び (c) を含む： (a) 被験物質と血管新生が誘導され得る細胞を接触させる工程、

(b) 上記 (a) で接触させた細胞における血管新生の程度を測定し、被験物質と接触させない対照細胞における血管新生の程度と比較する工程、

(c) 上記 (b) の比較結果に基づいて、血管新生を促進する被験物質を選択する工程。

上記方法の工程 (a) では、被験物質を血管新生が誘導され得る細胞と接触させる。該接触は、培養培地中で行われ得る。細胞は、動物由来の血管内皮細胞、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒト等の哺乳動物由来の血管内皮細胞、あるいは血管組織等であり得る。

被験物質を血管新生が誘導され得る細胞と接触させる培養培地は、用いられる細胞の種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、約 5 ~ 20 % のウシ胎仔血清を含む最少必須培地 (MEM) 、ダルベッコ改変最少必須培地 (DMEM) 、RPMI 1640 培地、199 培地などである。培養条件もまた、用いられる細胞の種類などに応じて適宜決定されるが、例えば、培地の pH は約 6 ~ 約 8 であり、培養温度は通常約 30 ~ 約 40 であり、培養時間は約 12 ~ 約 72 時間である。

上記方法の工程 (b) では、まず、被験物質を接触させた細胞における血管新生の促進の程度が測定される。該測定は、用いた細胞の種類などを考慮し、自体公知の方法により行われ得る。

例えば、日本ベクトン・ディキンソン社製、BD バイオコート™ アンジオジェネシスシステム等のキットを用いて評価することができる。(<http://www.bdjc.co.jp/pdf/35-284-288.pdf>)

次いで、被験物質を接触させた細胞における血管新生の促進の程度が、被験物質を接触させない対照細胞における血管新生の促進の程度と比較される。血管新生の促進の程度の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被験物質を接触させない対照細胞における血管新生の促進の程度は、被験物質を接触させた細胞における血管新生の促進の程度の測定に対し、事前に測定しても、同時に測定してもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した血管新生の促進の程度であることが好ましい。

上記方法の工程 (c) では、血管新生を促進する被験物質が選択される。

本発明のスクリーニング方法における被験物質と血管新生が誘導され得る細胞との接触はまた、被験物質の動物への投与により行われ得る。該動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル等の非ヒト哺乳動物等が挙げられる。この場合、「細胞を培養し」とは、該動物を適当な飼育条件下で飼育することを意味する。

本発明のスクリーニング方法は、血管新生を促進する物質のスクリーニングを可能とする。従って、本発明のスクリーニング方法は、アルツハイマーの予防・治療剤、並びに該疾患の研究用試薬の開発などに有用である。

また、本発明の予防・治療剤の別の有効成分は、 $A\beta 1-40$ の Akt / PKB 活性抑

10

20

30

40

50

制作用を阻害する物質および/またはA k t / P K B 活性を促進する物質でありうる。

A k t / P K B を活性抑制するのを阻害する物質および/またはA k t / P K B 活性を促進する物質としては、肝細胞増殖因子 (H G F)、血管内皮増殖因子 (V E G F)、線維芽細胞増殖因子 (F G F)、上皮細胞増殖因子 (E G F)、インスリン様増殖因子 (I G F)、神経成長因子 (N G F)、血小板由来増殖因子 (P D G F)、チミジンホスホリラーゼ (T d R P a s e)、血小板由来内皮細胞増殖因子 (P D - E C G F)、インスリン様増殖因子 (I G F) および神経成長因子 (N G F) などのサイトカインが挙げられるが、好ましくはH G F、V E G F、F G F およびE G F であり、さらに好ましくはH G F、V E G F およびF G F である。これらのサイトカインは、上記A β 1 - 4 0 の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害するサイトカインおよび/または血管新生を促進し得るサイトカインと同様の方法により製造することが出来る。

10

また、A β 1 - 4 0 のA k t / P K B 活性抑制作用を阻害する物質および/またはA k t / P K B 活性を促進する物質が、上記サイトカインまたはその部分ペプチドなどの蛋白質またはペプチドである場合には、該物質はそれをコードする核酸、特に該核酸を含む発現ベクターの形態で本発明の予防・治療剤に配合させることができる。この場合も、上記A β 1 - 4 0 の血管内皮前駆細胞分化抑制作用を阻害するサイトカインおよび/または血管新生を促進し得るサイトカインをコードする核酸と同様にして調製することができ、同様に医薬上許容される担体とともに製剤化して、ヒトなどの哺乳動物に投与することができる。

本発明の予防・治療剤の投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約1 μ g ~ 約1 0 0 0 m g、好ましくは約1 0 μ g ~ 約5 0 0 m g、さらに好ましく約1 0 0 μ g ~ 約1 0 0 m g である。これを1回または数回に分けて投与する。

20

本発明はまた、被験物質の存在下および非存在下に、A β 1 - 4 0 をプロテインキナーゼB 活性を発現し得る細胞と接触させ、両条件下におけるプロテインキナーゼB の活性を比較することを含む、A β 1 - 4 0 のプロテインキナーゼB 活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法、当該スクリーニング方法により得られる物質、および当該物質を含有してなるアルツハイマー病の予防・治療剤を提供する。

本スクリーニング方法に供される被験物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

30

一実施形態では、上記のスクリーニング方法は、下記の工程 (i)、(i i) 及び (i i i) を含む：(i) 被験物質の存在下、A β 1 - 4 0 をA k t / P K B の活性を発現し得る細胞と接触させる工程、

(i i) 上記 (i) で接触させた細胞におけるA k t / P K B の活性を測定し、被験物質の非存在下でA β 1 - 4 0 と接触させた対照細胞におけるA k t / P K B の活性と比較する工程、

40

(i i i) 上記 (i i) の比較結果に基づいて、A β 1 - 4 0 のA k t / P K B 活性抑制作用を阻害する被験物質を選択する工程。

上記方法の工程 (i) では、被験物質の存在下、A β 1 - 4 0 をA k t / P K B の活性が測定可能な細胞と接触させる。該接触は、培養培地中で行われ得る。細胞は、動物細胞、例えばマウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル、ヒト等の哺乳動物由来の細胞 (例えば、血管内皮細胞) 等であり得る。

A β 1 - 4 0 をA k t / P K B の活性を発現し得る細胞と接触させる培養培地は、用いられる細胞の種類などに応じて適宜選択されるが、例えば、約5 ~ 2 0 % のウシ胎仔血清を含む最少必須培地 (M E M)、ダルベッコ改良イーグル培地 (D M E M)、R P M I 1 6 4 0 培地、1 9 9 培地などである。培養条件もまた、用いられる細胞の種類などに応じ

50

て適宜決定されるが、例えば、培地のpHは約6～約8であり、培養温度は通常約30～約40℃であり、培養時間は約12～約72時間である。

上記方法の工程(i i)では、先ず、A β 1-40を接触させた細胞における細胞のAkt/PKBの活性が測定される。該測定は、用いた細胞の種類などを考慮し、自体公知のリン酸化を検出する方法により行われ得る。

例えば、リン酸Aktに対する抗体を用いたAkt/PKBの自己リン酸化の検出、質量分析などを用いて行うことができる。あるいは、日本ベクトン・ディキンソン社製、BDバイオコートTMアンジオジェネシスシステム等のキットを用いて間接的に評価することができる。(http://www.bdj.co.jp/pdf/35-284-288.pdf)

10

次いで、被験物質の存在下で接触させた細胞における細胞の活性が、被験物質の非存在下で接触させた細胞における細胞の活性と比較される。活性の比較は、好ましくは、有意差の有無に基づいて行なわれる。被験物質の非存在下で接触させた対照細胞における活性は、被験物質の存在下で接触させた細胞における活性の測定に対し、事前に測定した活性であっても、同時に測定した活性であってもよいが、実験の精度、再現性の観点から同時に測定した活性であることが好ましい。

上記方法の工程(i i i)では、A β 1-40のAkt/PKB活性抑制作用を阻害する被験物質が選択される。

本発明のスクリーニング方法はまた、被験物質の動物への投与により行われ得る。該動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、サル等の非ヒト哺乳動物が挙げられる。

20

本発明のスクリーニング方法は、A β 1-40のAkt/PKB活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニングを可能とする。従って、本発明のスクリーニング方法は、アルツハイマーの予防・治療剤、並びに該疾患の研究用試薬の開発などに有用である。

本発明はまた、被験物質の存在下および非存在下にプロテインキナーゼB活性を発現し得る細胞を培養し、両条件下における該細胞におけるプロテインキナーゼB活性を比較することを含む、アルツハイマー病の予防・治療物質のスクリーニング方法を提供する。本スクリーニング方法は、上記A β 1-40のプロテインキナーゼB活性抑制作用を阻害する物質のスクリーニング方法において、A β 1-40を添加しないこと以外は全く同様にして行うことができ、被験物質の存在下で、非存在下に比べてプロテインキナーゼB活性が増大した被験物質が、アルツハイマー病の予防・治療物質の候補として選択される。

30

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に例示するが、本発明はこれに限定されるものではない。

(細胞培養)

ヒト脳微小血管内皮細胞(HBMEC)、ヒト臍動脈内皮細胞(HUAEC)、ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)およびヒト大動脈平滑筋細胞(HSMC)をApplied Cell Biology Research Instituteから得た。細胞を、2%または10%FBSを補充した改変MCDB131培地で培養し、継代数3から6のものを以下の実験で用いた。

40

(実施例1)

上述の方法で、12ウェルにおいて培養したヒト脳微小血管内皮細胞(動脈および静脈)を、A β 1-40(0.05 μ M、0.5 μ Mおよび5 μ M)、A β 1-42(0.5 μ M)、A β 40-1(0.5 μ M)、およびコントロール(A β 誘導体無添加)で72時間刺激した。A β 40-1は、A β 1-40に対する逆順のシーケンスを有する。これをコントロールペプチドとして用いた。ついで細胞数を、血球計数器を用いて手動で数えた。

この実験の結果を表1、図1および図2に示す。

【表 1】

表 1.

動脈内皮細胞		静脈内皮細胞	
A β 1-40(0.05 μ m)	78 $\pm$ 9.481	A β 1-40(0.05 μ m)	80 $\pm$ 18.987
A β 1-40(0.5 μ m)	75 $\pm$ 8.011	A β 1-40(0.5 μ m)	73 $\pm$ 11.392
A β 1-40(5 μ m)	73 $\pm$ 11.699	A β 1-40(5 μ m)	70 $\pm$ 5.968
A β 40-1(0.5 μ m)	97 $\pm$ 8.934	A β 40-1(0.5 μ m)	99 $\pm$ 6.288

*細胞数 (コントロールを100とする)

A β 1-40はヒト脳微小血管内皮細胞の増殖を抑制するが、A β 40-1は抑制しないことがわかった。これは動脈においてより顕著であった。(図1)

また、A β 1-42で刺激した細胞においては壊死細胞が観察されたので、A β 1-42は内皮細胞に対して毒性効果を有していることがわかった。(図2)
(実施例2)

ヒト臍動脈内皮細胞およびヒト臍静脈内皮細胞をA β 1-40(0.5 μ Mおよび5 μ M)、A β 40-1(0.5 μ M)、およびコントロール(A β 誘導体無添加)で72時間刺激して、80%confluenceに達した内皮細胞を次いでPBSで洗浄し、トリプシン処理し、マトリゲル基底膜マトリックス(Becton Dickinson Labware)でコートした6ウェル培養プレート上で18時間培養した。マトリゲル上の細胞を写真撮影し、NIHイメージ分析器によって全体の長さを測定した。

結果を表2および表3に示す。ただし、単位はピクセル(pixel)とする。

【表 2】

表 2.

動脈内皮細胞

	列数	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール	6	11530.333	492.232	200.953
A β 1-40(0.5 μ m)	6	8719.333	1401.024	571.966
A β 1-40(5 μ m)	6	7951.167	634.222	258.920
A β 40-1(0.5 μ m)	6	11863.677	894.591	365.215

【表 3】

表 3.

静脈内皮細胞

	列数	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール	6	10875.500	844.251	344.664
A β 1-40(0.5 μ m)	6	10599.000	453.972	185.333
A β 1-40(5 μ m)	6	9884.333	978.441	399.447
A β 40-1(0.5 μ m)	6	10875.500	1376.358	561.896

表2および3ともに、基本統計：列2、効果：列4とする。この結果により、A β 1-40がマトリゲル上のECの管形成を抑制することがわかった。(図3および4)

(実施例3)

次いで内皮細胞遊走を、Boydenチャンバーアッセイを用いて調べた。簡略には、VEGF(10ng/ml)、A β 1-40(0.5 μ Mおよび5 μ M)+VEGF(10ng/ml)、A β 40-1(0.5 μ M)+VEGF(10ng/ml)、10%FBSまたはコントロール(A β 誘導体無添加)を有するEBM-2培地をチャンバーの下方の区画に置いた。5 $\times$ 10⁴内皮細胞(0.5%ウシ血清アルブミンを補充した50 μ LのEBM-2中)をチャンバーの上方の区画に蒔いた。細胞遊走を、4つの高倍率視野

10

20

30

40

50

($\times 40$)で細胞を数えることによって測定した。すべてのグループにつき3回実験をした。(平均 $\pm$ 標準偏差： $P < 0.05$)

結果を表4に示す。ただし、単位は細胞数/視野とする。

【表4】

表4.

	列数	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール	4	21.080	1.225	0.612
VEGF	4	100.018	42.218	20.609
VEGF+A β 1-40	4	48.322	10.886	5.443
VEGF+A β 40-1	4	107.257	62.944	31.472
10%FBS	4	162.363	83.963	41.981

基本統計量：列3

効果：列1

これにより内皮遊走はVEGFによる脈管形成によって引き起こされたが、その効果はA β 1-40によって阻害されたことがわかった。(図5)

(実施例4)

(マトリゲルプラグ移植アッセイ)

年齢をマッチングした8週齢のオスのc57/BL6Jマウスに、50ng/mLのVEGFおよびA β 1-40(5 μ M)を含む500 μ Lのマトリゲルと37ユニットのヘパリンを皮下注射した。7日後、マトリゲルプラグを慎重に個々のマウスから回収し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄し、-20℃で冷凍保存した。冷凍プラグの切片(6mm)を氷冷したアセトンで固定し、ついでラット抗マウスCD31の1次抗体(Pharmingen)、FITC-コンジュゲートした抗 α 平滑筋アクチン抗体(Sigma)およびAlexaコンジュゲートしたヤギ抗ラット2次抗体(Molecular Probe)で染色した。

染色した切片における血管密度を、NIHイメージソフトウェアを用いて、蛍光強度によって評価した。また、それぞれのプラグのヘモグロビン含有量を、成人血管再生の指標として測定した。

結果を表5および6に示す。

【表5】

表5.

血管密度(単位：ピクセル)

	列数	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール	5	2171.800	1046.239	467.892
A β 1-40	5	825.800	474.909	212.386

基本統計量：列2

効果：列1

【表 6】

表 6.

ヘモグロビン含有量 (単位: OD 450 / tissue mg)

	列数	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール	5	0.251	0.079	0.035
A β 1-40	5	0.084	0.040	0.018

基本統計量: いくつかの列

効果: 列 4

これらの結果により、A β 1-40 が成人血管再生にインビボで抑制効果を有することがわかった。(図 6 および 7)

(実施例 5)

(ELISA アッセイ)

ヒト SMC を、10% FBS を含む MCD B 培地の 12 ウェル培養プレートで培養した。A β 1-40 刺激から 48 時間後、それぞれのウェルにおける VEGF レベルを酵素免疫アッセイ (R&D System) によって試験した。

結果を表 7 に示す。

【表 7】

表 7.

	列数	平均値	標準偏差	標準誤差
コントロール(DSF)-SMC	6	0.080	0.023	0.009
A β 1-40(DSF)	6	0.080	0.022	0.009
A β 40-1(DSF)	6	0.068	0.014	0.006

これにより、A β 1-40 は VSMC からの VEGF 分泌に直接効果を有さないことがわかった(図 8)。また、DiI アセチル化された LDL および BS-1 によって、A β 1-40 は血管幹細胞の分化に対し阻害効果を有することがわかった。

(実施例 6)

(ウェスタンブロットアッセイ)

EC が 80% confluence に達した後、培地を、FBS を含んでいない新しい培地に変えて、4 時間おいた。ついで細胞をヒト VEGF (10 ng/mL) および A β 1-40 (0.5 μ M) で最高 40 分まで刺激を与えた。ヒト内皮細胞からの全細胞タンパク質抽出物を 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲル上に分離し、ニトロセルロース膜に移した。その膜を、ヒト Akt、リン酸化 Akt およびリン酸化 ERK (Cell Signaling) に対する抗体を用いウエスタンブロットティングを行った。結果を図 9 ~ 12 に示す。

これにより、細胞内 Akt リン酸化は VEGF によって刺激を受けるが、A β 1-40 によって阻害されることがわかった(図 9)。図 10 は、A β 1-40 による Akt リン酸化の量的阻害を表すグラフである。また、A β 1-40 は VEGF によって引き起こされた ERK リン酸化には影響を与えなかった(図 11 および 12)。

(実施例 7)

(成体血管幹細胞の分化アッセイ)

簡潔には、Histopaque-1083 (Sigma, St. Louis, MO) を用いた密度遠心法によって、低密度の単核細胞を C57BL/6J マウスの脾臓から単離した。細胞を、ラットビトロネクチン (Sigma) でコートした 4 ウェルガラススライド (Nunc International) 上に蒔き、2% の熱不活性化した規定 (defined) FBS を含む培地で培養した。培地を、内皮成長補充キット、EGM-2 MV シングルアリコート (Clonetics) で補充した。

培養4日後、細胞をアセチル化したLDL (Biomedical Technologies, Stoughton, MA)を加えてインキュベートし、FITC-コンジュゲートしたグリフォニア・シンプリシフォリアレクチンI (BS1-レクチン) (Vector Laboratories)で染色した。15視野において40×倍率下、acLDL-DilおよびBS1で2重染色された細胞の数を、それぞれの試料ごとに内皮前駆体として数えた。その結果を図13に示す。

これにより、Aβ1-40が培養した血管前駆体細胞の増殖および分化を抑制したことがわかった。

(試験例)

(Aβ-注入モデル)

10

雄ddYマウス(6~8週齢)を日本クレア(株)から得た。HalleyとMcCormick (Br. J. Pharmacol. Chemother. 12(1):12-5、1957年)によって確立された手順に、少し改良(MamiyaとUkai、Br. J. Pharmacol., 134(8):1597-9、2001年)を加えて、脳室内投与を行った。マウスにイソフルランガス、キシラジンおよびケタミンで麻酔をかけ、3mmの27ゲージ針を有する100μLハミルトンシリンジで、正中線から1mm~1.5mm横かつ前頂部から0.5mm後方へ、Aβ1-40(200μmol/5μL)を5μL、マウスに脳室内注射した。

また、Sham手術を行い、Sham施行マウス(sham群)を作製した。

(HGF遺伝子の送達)

20

ヒトHGF cDNA(2.2kb)を、サイトメガロウイルス・プロモーター/エンハンサーを用いるpVAX1プラスミドへ挿入した。プラスミドはMilli-Q水で10μg/μLに調製した。ヒトHGF cDNAを含む2μLのプラスミドを1.25μLオプティソン(超音波造影剤)および1μLのTEに懸濁した。Aβ1-40を脳室内注射してから1週間後、pVAXプラスミド混合物を脳室内に、Aβ注射と同じ方法で正中線の反対側に注射した(HGF群)。注射後、個々のマウスに超音波をかけた(2.0W/cm²、10秒)。

なお、HGF挿入していないpVAXプラスミド混合物を同様にして別のマウスに注射し、それらをコントロールマウスとした(コントロール群)。

(試験例1)

30

(水飲み場探し試験)

ヒトHGF cDNAを含むプラスミドを投与した1週間後、Nabeshimaら(Brain Res., 848(1-2):167-73、1999年)の方法によって水飲み場探し試験(Water Finding Task)を行った。簡略には、装置は、50×30cmの広さで15cmの壁つきのオープンフィールドからなり、長径(50cm)側の壁の中央に10cm×10cm×10cmの小部屋がついているものである。オープンフィールドの床は、自発運動量を測定するために10cmごとにグリッドが入っている。水のボトルを、小部屋の天井に、チューブの先端が、トレーニング試行においては床から5cm、また想起試行においては床から7cmのところになるように挿入した。試験は2つの試行よりなる：トレーニング試行(1日目)および想起試行(2日目)である。トレーニング試行では、マウスを別々に小部屋の反対側のコーナーに置き、3分間自由に探索させた。その間、マウスが越えたグリッド線の数を数えることにより歩行を測定した。小部屋内の水チューブを、触れたり、嗅いだり、舐めたりする頻度(アプローチの数)も数えた。3分以内に水チューブを見つけることのできなかったマウスを試験から除いた。トレーニング試行の後、マウスを直ちにホームケージに帰し、水を探すモチベーションを高めるため、48時間水から遠ざけた。想起試行では、マウスを別々に装置の同じコーナーに置いた。メモリー習得を評価するため、飲むまでの時間(drinking latency, DL)は、コーナーを出て最初に水チューブに触れるまでの時間で測定した。加えて、配置から開始コーナーに行くまでの時間(starting latency, SL)および開始コーナーから最初に小部屋に入るまでの時間(enterin

40

50

g l a t e n c y , E L) を測定した。

(試験例 2)

(Y - M a z e 試験)

ヒト HGF c D N A を含むプラスミドを投与した 1 週間後、Y - M a z e 試験を上
述した M a m i y a a n d U k a i (上述、2 0 0 1 年) に記載の方法で行った。簡略
には、Y - M a z e は 3 つのアーム (a , b , c) からなる。それぞれのアームは長さ 4
0 c m で、その断面は上辺 1 0 c m、底辺 3 c m、高さ 1 2 c m の台形である (N a b e
s h i m a ら、上述、1 9 9 9 年) Y - M a z e 装置を実験室の床にたて、2 0 0 L u x
で照射した。マウスをそれぞれ 1 つのアームの端に置き、8 分間、Y - M a z e を探索さ
せた。自発的交代行動 (s p o n t a n e o u s a l t e r n a t i o n b e h a v i o r) による短期 / 空間のワーキングメモリーを評価するため、いずれのアームに入
ったかを記録した。胴体が完全にアームに入った場合、そのマウスが当該アームを選んだと
みなした。自発的交代行動とは、より新しい場所を好むという動物の行動に基づくもので
ある。マウスが Y - M a z e において、3 回連続して別のアーム (つまり、3 つ目のア
ームとして前に選んだ 2 つとは異なるアーム) を選んだ場合、マウスは実際の交代行動 (a
l t e r n a t i o n) を行ったとみなした。交代行動 (%) を、アームに入った全回数
から 2 を引いたものとして定義される、最大交代に対する割合として計算した。例えば、
マウスがアーム a - b - c - b - a - b - c - a - b - c の順で 1 0 回入ったとき、実際の
交代行動、および最大交代行動はそれぞれ 6 と 8 になり、交代行動は 7 5 % になる。ア
ームに入った数、排便の数、排尿の数を数えた。

(結果)

試験例 1 の結果を表 8 および図 1 4 に、試験例 2 の結果を表 9 および図 1 5 に示す。H
G F 遺伝子を導入した A β 注入モデルマウスは、水飲み場探し試験および Y - M a z e 試
験において改善がみられた。

【表 8】

表 8.

試験例 1. 水飲み場探し試験

	SL(秒)	平均 標準誤差	EL(秒)	平均 標準誤差	DL(秒)	平均 標準誤差
sham	8	9.00 0.58	38	82.50 28.77	64	135.75 31.32
sham	8		154		210	
sham	10		85		158	
sham	10		53		111	
pVAX	4	40.00 23.37	55	112.43 35.82	340	283.00 50.23
pVAX	175		280		384	
pVAX	21		32		399	
pVAX	53		191		238	
pVAX	10		80		391	
pVAX	7		20		49	
pVAX	10		129		180	
HGF	5	8.75 1.65	14	25.75 5.84	86	116.50 36.05
HGF	11		41		114	
HGF	12		28		217	
HGF	7		20		49	

【表 9】

表 9.

試験例2. Y-Maze試験

	交代行動の詳細 total alternations	交代行動 (%)	平均 標準誤差
sham	bcbababacababacbcababa	35.0	56.88 8.09
sham	abacabacbabaca	50.0	
sham	cbacbacbacbababacabcbabc	84.0	
sham	cabcacbacabacbababacabacba	62.5	
sham	acbacabacacbcabacac	52.9	
pVAX	caacabcbabca	50.0	47.94 2.35
pVAX	bcacacabacbacabacbaa	57.9	
pVAX	cbacacbacabacbabcacacababababcbac	48.6	
pVAX	cbcbabaabcabacacbacbcacacacbc	44.0	
pVAX	bababacacbabacacbcabacaba	39.1	
pVAX	acabcabacacabaccca	43.8	
pVAX	bcabcbcabacabcbcbabababa	52.2	
HGF	cbacbcacbcacbcacbacbcabcbabc	59.3	77.70 5.71
HGF	cbacbacacbcabacbcacbacbcacbacbacabc	72.7	
HGF	abcabcbcabcbcababcbabcbabcb	92.3	
HGF	bcabacbacbacbacbcacbacbc	86.4	
HGF	abcbcbcbcabcbcabcbabca	77.8	

水飲み場探し試験では（図14参照）、HGF処理したAβ注入マウスは、コントロールマウスより有意に優れていた（ $p < 0.05$ ）。Sham手術したマウスとコントロールマウスの間に有意差はなかった。しかしながら、sham手術したマウスの方がコントロールマウスよりも優れた行動をとる傾向があった（ $p = 0.07$ ）。

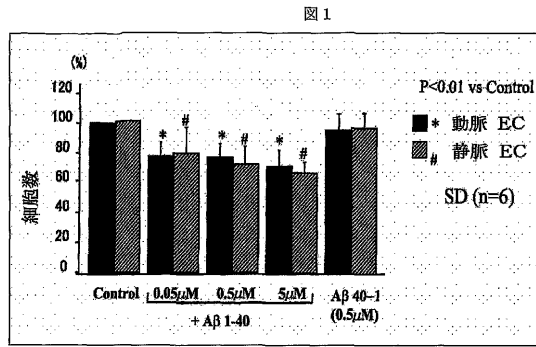
Y-Maze試験においても（図15参照）、HGF処理したAβ注入マウスは、コントロールマウスより有意に優れていた（ $p < 0.05$ ）。Sham手術したマウスとコントロールマウスの間に有意差はなかった。しかしながら、sham手術したマウスの方がコントロールマウスよりも優れた行動をとる傾向があった（ $p = 0.24$ ）。

【産業上の利用可能性】

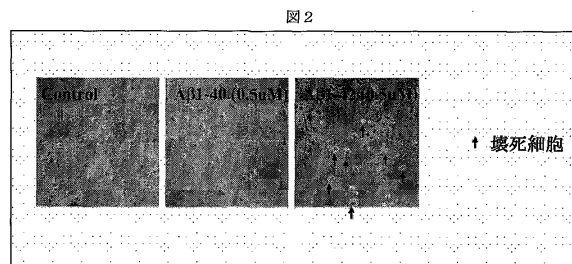
本発明により提供される予防・治療剤はアルツハイマー病に有用である。あるいは、本発明の予防・治療剤はアルツハイマー病の研究用試薬として有用である。また、本発明により提供されるスクリーニング方法は、アルツハイマー病の予防・治療薬あるいは該疾患の研究用試薬の開発に有用である。

本出願は、日本で出願された特願2004-347861を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

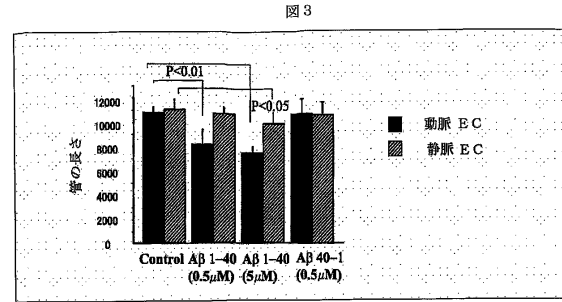
【図 1】



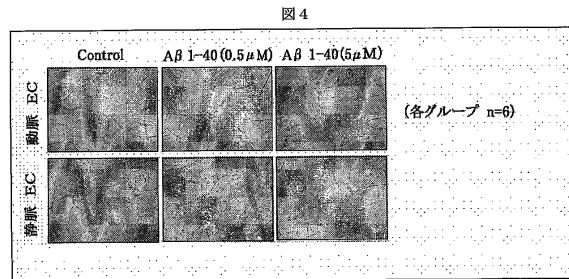
【図 2】



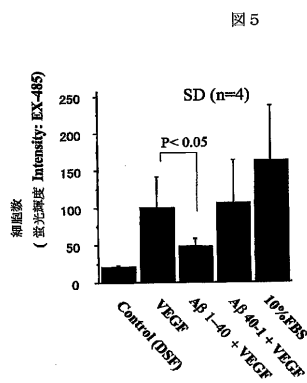
【図 3】



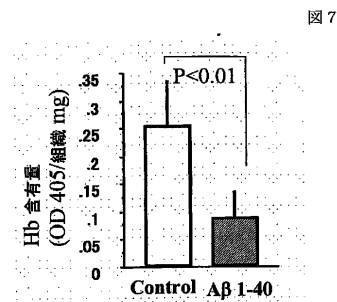
【図 4】



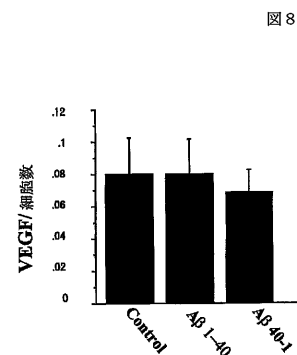
【図 5】



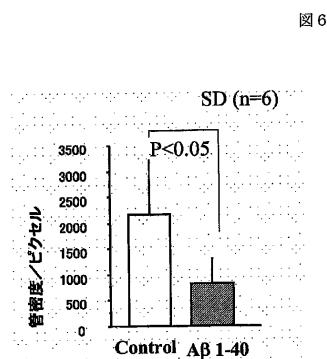
【図 7】



【図 8】

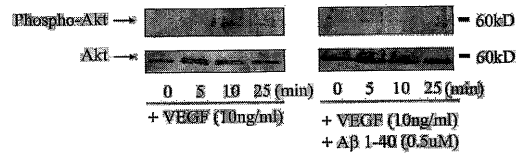


【図 6】



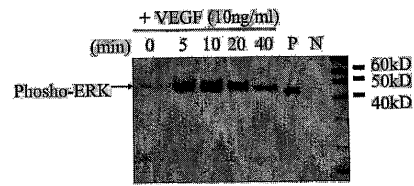
【図 9】

図 9



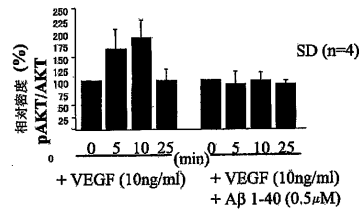
【図 11】

図 11



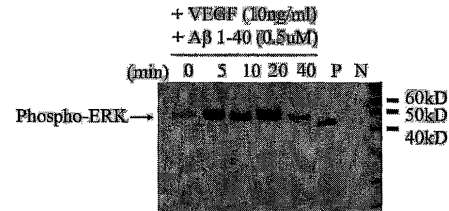
【図 10】

図 10



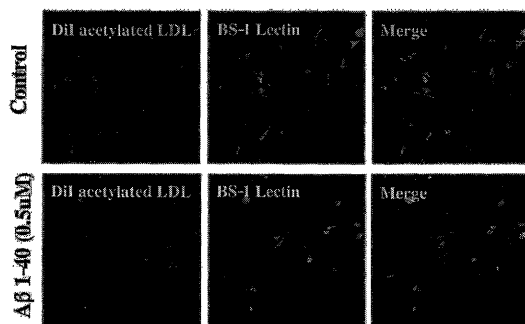
【図 12】

図 12



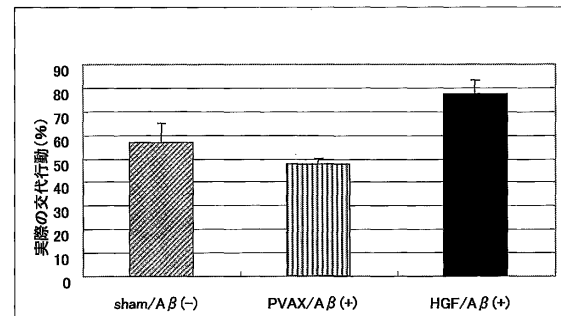
【図 13】

図 13



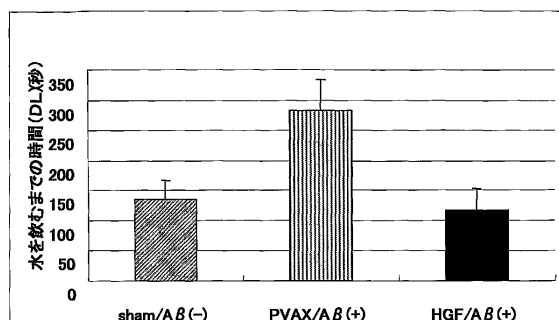
【図 15】

図 15



【図 14】

図 14



フロントページの続き

(72)発明者 森下 竜一

大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内

審査官 横井 宏理

(56)参考文献 特開平07-089869(JP, A)

米国特許出願公開第2003/0060403(US, A1)

国際公開第01/021214(WO, A1)

国際公開第03/045439(WO, A1)

特表2003-532656(JP, A)

HALLER, M.F., et al., Nerve growth factor delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 1998年 4月30日, Vol.53, p.1-6永井康雄, 他., A β 1-40及びA β 1-42による細胞死とその抑制遺伝子・タンパク, *日本薬理学雑誌*, 日本, 2004年 9月 1日, Vol.124, No.3, p.135-144HASHIMOTO, Y., et al., Molecular characterization of neurohybrid cell death induced by Alzheimer's amyloid- β peptides via p75NTR/PLAIDD, *Journal of Neurochemistry*, 2004年 8月, Vol.90, No.3, p.549-558DORE, S., et al., Insulin-like growth factor I protects and rescues hippocampal neurons against β -amyloid- and human amylin-induced toxicity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997年 4月, Vol.94, No.9, p.4772-4777中村健二, 他., 神経再生因子としての肝細胞増殖因子(HGF), *脳の科学*, 日本, 2003年, 2003年増刊号, p.108-115TSUBOI, Y. et al., Hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid in neurologic disease, *Acta. Neurol. Scand.*, 2002年, Vol.106, p.99-103TSUBOI, Y. et al., Increased hepatocyte growth factor level in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease, *Acta. Neurol. Scand.*, 2003年, Vol.107, p.81-86森 啓, アルツハイマー型痴呆におけるアミロイド沈着機序, *Dementia Japan*, 1998年, Vol.12, p.39-45

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/00-50

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)