

明 細 書

発明の名称：

アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物等に関する。

背景技術

[0002] アミロイド β （A β ）は、脳内で産生されるタンパク質の一種である。アミロイド β が凝集してオリゴマー化又は線維化すると、神経細胞毒性を示す。また、凝集したアミロイド β は脳から排出されずに蓄積し、アルツハイマー病発症の引き金になると考えられている。従って、アミロイド β の産生又は蓄積を抑制することは、例えば、アルツハイマー病の予防又は病気の進行の抑制に有効であると考えられる。

[0003] アルツハイマー病の症状を改善する医薬品として、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤が知られている。アセチルコリンエステラーゼの阻害は、脳内におけるアセチルコリン量を増加させ、認知機能低下の進行の抑制に有効である。しかしながら、アセチルコリンエステラーゼ阻害によって、アミロイド β の産生を抑制したり、蓄積したアミロイド β を除去したりすることはできない。飲食品等として日常的に摂取することができ、アミロイド β の産生又は蓄積を抑制することができる物質が求められている。

[0004] 一方、環状ジペプチドが脳機能に影響を与えることが報告されている。特許文献1には、C y c l o（G l y－P r o）を含有する、認知機能の低下抑制及び／又は改善剤が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2020-196686号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意研究した結果、環状ジペプチドであるシクロフェニルアラニルフェニルアラニン（C y c l o (P h e - P h e) ）が、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制に有効であることを見出した。

[0008] すなわち、本発明は、これに限定されるものではないが、以下のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物等に関する。

〔1〕 C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を有効成分として含む、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物。

〔2〕 β -セクレターゼを阻害することによりアミロイド β の産生及び／又は蓄積を抑制する、上記〔1〕に記載の組成物。

〔3〕 ミクログリア細胞の貪食作用を促進することによりアミロイド β の蓄積を抑制する、上記〔1〕又は〔2〕に記載の組成物。

〔4〕 上記組成物が、経口用である上記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の組成物。

〔5〕 上記組成物が、飲食品又は医薬品である上記〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の組成物。

〔6〕 上記組成物が、「認知機能を高める」、「認知機能の低下を抑える」、「認知機能を良好に保つ」、「記憶力を高める」、「記憶力の低下を抑える」、「記憶力を良好に保つ」、「記憶の精度を高める」、「記憶障害を予防する」、「記憶障害を改善する」、「認知機能の一部である記憶力を維持する」、「記憶力の低下が気になる方に適した機能」、「認知機能の一部である記憶力の精度や判断の正確さを向上させる」、「記憶の保持又は統合を改善する」、「認知機能の強化を維持する」、「遂行機能を改善する」、「注意力と集中力を促進する」、「学習能力を改善する」、「見当識を維持・

改善する」、「加齢に伴う認知機能低下を遅延する」、「短期及び長期記憶を強化する」、「言語的及び視空間記憶を促進する」及び「論理的思考力を維持・改善する」からなる群より選択される1又は2以上の機能の表示を付されたものである上記〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の組成物。

〔7〕アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物の製造における、Cyclo(Phe-Phe)又はその塩の使用。

〔8〕アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のための、Cyclo(Phe-Phe)又はその塩の使用。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物を提供することができる。本発明の組成物は、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のための飲食品、医薬品等として使用することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、Cyclo(Phe-Phe)及びCyclo(Leu-Ala)の β -セクレターゼ(BACE)阻害活性を示すグラフである。

[図2]図2は、Cyclo(Phe-Phe)で24時間前処理したSIM-A9ミクログリア(CFF)、及び、Cyclo(Phe-Phe)で処理しなかったSIM-A9ミクログリア(ビヒクルコントロール(VC))の細胞内アミロイド β モノマーの量を示すグラフである(*: $p < 0.05$ 、ビヒクルコントロールに対して)。

[図3]図3は、 $A\beta_{1-42}$ オリゴマーで処理したBV-2ミクログリア(ビヒクルコントロール(VC))、並びに、Cyclo(Phe-Phe)及び $A\beta_{1-42}$ オリゴマーで処理したBV-2ミクログリア(CFF)の顕微鏡写真である(図3A、図3B及び図3C: ビヒクルコントロール、図3D、図3E及び図3F: Cyclo(Phe-Phe)処理)。

[図4]図4は、Cyclo(Phe-Phe)で処理したBV-2ミクログリア(CFF)、及び、Cyclo(Phe-Phe)で処理しなかったBV-2ミクログリア(ビヒクルコントロール(VC))のアミロイド β オリゴ

マー貪食作用を調べた結果を示すグラフである（*： $p < 0.05$ 、ビヒクルコントロールに対して）。

[図5]図5は、スウェーデン二重変異K595N/M596Lを有するアミロイド前駆体タンパク質野生型を過剰発現するH4神経膠腫細胞（H4-hAPP細胞）の培養上清中のアミロイド β_{1-38} の濃度を示すグラフである（***： $p < 0.001$ 、ビヒクルコントロールに対して）。

[図6]図6は、H4-hAPP細胞の培養上清中のアミロイド β_{1-40} の濃度を示すグラフである（***： $p < 0.001$ 、ビヒクルコントロールに対して）。

[図7]図7は、H4-hAPP細胞の培養上清中のアミロイド β_{1-42} の濃度を示すグラフである（***： $p < 0.001$ 、ビヒクルコントロールに対して）。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物は、Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩を含む。本発明のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物は、Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩を有効成分として含むものである。本明細書中、本発明のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物を、本発明の組成物ということもある。本発明の組成物は、アミロイド β の産生を抑制するため、及び／又は、アミロイド β の蓄積を抑制するために使用されるものである。

[0012] 本発明において使用されるCyclo (Phe-Phe)（シクロフェニルアラニルフェニルアラニン）は、フェニルアラニン2分子が縮合結合した構造を有する環状ジペプチドである。本明細書中、Cyclo (Phe-Phe) を、CFFと記載することもある。

本明細書において「環状ジペプチド」とは、アミノ酸を構成単位とすることを特徴とし、N末端側アミノ酸のアミノ基とC末端側アミノ酸のカルボキシル基とが脱水縮合することにより生成したジケトピペラジン構造を有する化合物をいう。

[0013] Cyclo (Phe-Phe) の塩としては、薬理学的に許容される塩又は飲食品に許容される塩であれば特に限定されず、酸性塩及び塩基性塩のいずれであってもよい。酸性塩として、例えば、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等の無機酸塩；酢酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、コハク酸塩、フマル酸塩、プロピオン酸塩等の有機酸塩等が挙げられる。塩基性塩として、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩等が挙げられる。環状ジペプチドの塩は、当該分野で公知の任意の方法により、当業者によって容易に調製され得る。

[0014] Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩の由来及び製造方法は特に制限されない。Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、公知の方法に従って製造することができる。Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、天然物由来のものであってもよく、人工的に合成したものであってもよく、酵素法又は微生物発酵法により製造されてもよく、直鎖状ジペプチドを脱水及び環化させることによって合成されてもよい。例えば、コラーゲン加水分解物などのタンパク質加水分解物を加熱して、Cyclo (Phe-Phe) 等の環状ジペプチドを豊富に含むペプチド熱処理物を得ることができる。Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、これを含むタンパク質加水分解物又はその熱処理物を使用して組成物に配合してもよいし、タンパク質加水分解物若しくはその熱処理物の濃縮物、乾燥粉末又は精製度を高めたものを使用して組成物に配合してもよい。本発明の組成物は、例えば、タンパク質加水分解物又はその熱処理物を含有し、Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、タンパク質加水分解物又はその熱処理物の一部であってもよい。Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、市販品を使用することもできる。

[0015] アミロイド β は、アミロイド β タンパク質、アミロイド β ペプチド又は β アミロイドと呼ばれることもあるペプチドである。アミロイド β は、通常、40個前後のアミノ酸からなるペプチドであり、アミロイド β_{1-42} 、アミロイ

ド β_{1-40} 、アミロイド β_{1-38} 等が挙げられる。非会合状態のアミロイド β は、アミロイド β モノマーと呼ばれることもある。アミロイド β は、2個以上で凝集体を形成していてもよい。アミロイド β は、例えば、アミロイド β が2個以上（例えば2～50個）凝集した可溶性凝集体（アミロイド β オリゴマー）を形成していてもよい。アミロイド β オリゴマーとして、アミロイド β_{1-42} オリゴマー、アミロイド β_{1-40} オリゴマー、アミロイド β_{1-38} オリゴマー等が挙げられる。本発明におけるアミロイド β には、非会合状態のアミロイド β 、オリゴマー等の凝集体を形成しているアミロイド β が含まれる。

[0016] アミロイド β は、アミロイド β 前駆体タンパク質（APP）が、 β -セクレターゼ及び γ -セクレターゼによって2段階で切断されてアミロイド β モノマーの形態で生成する。 β -セクレターゼは、アミロイド β 産生の律速酵素であり、その切断が総アミロイド β 産生量を規定している。このため、 β -セクレターゼを阻害することによって、アミロイド β の産生を抑制することができ、アミロイド β の蓄積を抑制することができる。

[0017] Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、 β -セクレターゼ阻害作用を有する。本発明の組成物は、 β -セクレターゼを阻害することにより、アミロイド β の産生を抑制及び／又は蓄積を抑制するために使用することができる。Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、 β -セクレターゼ阻害のための有効成分として有用である。Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩を含む、 β -セクレターゼ阻害用組成物も本発明に包含される。

[0018] Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、ミクログリア細胞の貪食作用を促進する。

ミクログリア細胞は、脳内に存在する中枢神経系の細胞である。ミクログリア細胞は、脳内の環境の維持のために重要な役割を果たしており、その作用の一つに、アミロイド β 等の細胞外タンパク質、損傷を受けた細胞等の脳内老廃物の貪食がある。ミクログリア細胞の貪食作用を促進することで、アミロイド β の除去が促進される。このため、ミクログリア細胞の貪食作用の促

進は、アミロイド β の蓄積抑制に有効である。C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、ミクログリア細胞の貪食作用促進のための有効成分として有用である。

[0019] 一態様において、本発明の組成物は、ミクログリア細胞の貪食作用（貪食）を促進することにより、アミロイド β の蓄積を抑制するために使用することができる。C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を含む、ミクログリア細胞の貪食作用促進用組成物も本発明に包含される。

[0020] 本発明の組成物は、脳内におけるアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のために使用することができる。一態様において、本発明の組成物は、 β -セクレターゼを阻害することにより及び／又はミクログリア細胞の貪食作用を促進することにより、アミロイド β の産生を抑制及び／又は蓄積を抑制するために使用することができる。本発明の組成物は、1種又は2種以上のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のために使用することができる。

[0021] 一態様において、本発明の組成物は、アミロイド β の蓄積に関連する状態又は疾患、好ましくは、脳におけるアミロイド β の蓄積に関連する状態又は疾患の予防又は改善のために使用することができる。このような状態又は疾患として、アミロイド β の蓄積を伴う又はアミロイド β の蓄積に起因する状態又は疾患が挙げられる。脳におけるアミロイド β の蓄積を伴う又はアミロイド β の蓄積に起因する状態又は疾患として、例えば、アルツハイマー病（アルツハイマー型認知症を含む）、軽度認知障害等が挙げられる。

本発明の組成物は、上記の状態又は疾患を予防又は改善するために使用することができ、上記の状態又は疾患の予防に好適に使用することができる。

本明細書において、状態又は疾患の予防は、発症を防止すること、発症を遅延させること、発症率を低下させること、発症のリスクを軽減すること等を包含する。状態又は疾患の改善は、対象を状態又は疾患から回復させること、状態又は疾患の症状を軽減すること、状態又は疾患の症状を好転させること、状態又は疾患の進行を遅延させること、防止すること等を包含する。

[0022] アルツハイマー病及び軽度認知障害では、認知機能が低下することが知られている。アルツハイマー病、軽度認知障害における認知機能低下の症状として、例えば、記憶力低下、記憶障害（物忘れ）、失語（ものの名前が出にくくなる）、失行、失認（よく知っているはずの場所で道に迷う等）、見当識（場所、時間、人の名前など、自分が置かれた状況を正しく認識する能力）の低下、言語及び非言語学習能力の低下、聴覚及び視覚処理の低下、遂行機能低下、遂行機能障害（計画を立てて物事を行うことができなくなる）、集中力低下、注意力低下、判断力低下、空間認識力低下、認知柔軟性低下、情報処理速度低下等が挙げられる。アミロイド β の産生又は蓄積を抑制することによって、認知機能低下の予防又は認知機能の改善効果、例えば、上記の症状の予防又は改善効果が得られることが期待できる。

[0023] 本発明の組成物は、治療的用途（医療用途）又は非治療的用途（非医療用途）のいずれにも適用することができる。非治療的とは、医療行為、すなわち人間の手術、治療又は診断を含まない概念である。

本発明のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物は、一例として、剤の形態で提供することができるが、本形態に限定されるものではない。当該剤をそのまま組成物として、又は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。一態様において、本発明のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物は、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制剤ということもできる。 β -セクレターゼ阻害用組成物は、 β -セクレターゼ阻害剤ということもできる。ミクログリア細胞の貪食作用促進用組成物は、ミクログリア細胞の貪食作用促進剤ということもできる。

[0024] 本発明の組成物は、経口用又は非経口用のいずれであってもよい。本発明の組成物は、好ましくは経口用組成物である。本発明の組成物は、例えば、飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等の形態とすることができ、飲食品又は医薬品が好ましい。本発明の組成物は、飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等に添加して使用することもできる。本発明の組成物の形態は特に限定されず、固体状（例えば、粉末状、顆粒状、タブレット状等）、液状、ペースト状

等のいずれであってもよい。

[0025] 本発明の組成物は、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を含み、更に飲食品又は医薬品等への添加物として許容されている各種の希釈剤、酸味料、抗酸化剤、安定剤、保存料、香料、乳化剤、色素類、調味料、pH調整剤、栄養強化剤等が添加されていてもよい。

[0026] 例えば、本発明の組成物を飲食品とする場合、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩に、飲食品に使用可能な成分（例えば、食品素材、必要に応じて使用される食品添加物等）を配合して、種々の飲食品とすることができる。飲食品は特に限定されず、例えば、一般的な飲食品、健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品、健康補助食品、病者用食品等が挙げられる。上記健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品、健康補助食品等は、例えば、液剤、細粒剤、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、チュアブル剤、ドライシロップ剤、流動食等の各種製剤形態として使用することができる。

[0027] 本発明の組成物を医薬品又は医薬部外品とする場合、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩に、薬理学的に許容される担体、必要に応じて添加される添加剤等を配合して、各種剤形の医薬品又は医薬部外品とすることができる。そのような担体、添加剤等は、医薬品又は医薬部外品に使用可能な、薬理学的に許容されるものであればよく、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤等の1又は2以上が挙げられる。医薬品又は医薬部外品の投与（摂取）形態としては、経口又は非経口（経皮、経粘膜、経腸、注射等）投与の形態が挙げられる。本発明の組成物を医薬品又は医薬部外品とする場合、経口用医薬品又は経口用医薬部外品とすることが好ましい。経口投与のための剤形としては、例えば、液剤、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、懸濁液、乳剤、チュアブル剤等が挙げられる。非経口投与のための剤形としては、例えば、注射剤、点滴剤、軟膏剤、ローション剤、貼付剤、坐剤、経鼻剤、経肺剤（吸入剤）等が挙げられる。医薬品は、非ヒト動物用医薬であってもよい。

[0028] 本発明の組成物を飼料とする場合には、C y c l o (P h e - P h e) 又は

その塩を飼料に配合すればよい。飼料には飼料添加剤も含まれる。飼料としては、例えば、牛、豚、鶏、羊、馬等に用いる家畜用飼料；ウサギ、ラット、マウス等に用いる小動物用飼料；犬、猫、小鳥等に用いるペットフードなどが挙げられる。

[0029] 本発明の組成物を、例えば、飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等とする場合、その製造方法は特に限定されず、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を用いて、一般的な方法により製造することができる。

[0030] 一態様において、本発明の組成物は、液状組成物であることが好ましく、飲料であることがより好ましい。飲料は、例えば、機能性飲料であってよい。飲料の形態は特に限定されず、容器詰飲料であってよい。容器詰飲料の容器は特に限定されず、いずれの形態及び材質の容器を用いてもよく、例えば、アルミ缶、スチール缶等の金属製容器；ペットボトル等の樹脂製容器；紙パック等の紙容器；ガラス瓶等のガラス製容器；樽等の木製容器等の通常用いられる容器のいずれも用いることができる。このような容器に飲料を充填及び密閉することにより、容器詰飲料が得られる。

[0031] 本発明の組成物に含まれるC y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の含有量は特に限定されず、その形態等に応じて設定することができる。

一態様において、本発明の組成物におけるC y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の含有量は、例えば、 1×10^{-6} 重量%以上であってよく、 1×10^{-5} 重量%以上が好ましく、また、90重量%以下であってよく、 1×10^{-1} 重量%以下であってよく、 1×10^{-2} 重量%以下であってよい。一態様において、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の含有量は、例えば、本発明の組成物中に $1 \times 10^{-6} \sim 90$ 重量%であってよい。一態様において、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の含有量は、本発明の組成物中に、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$ 重量%であってよく、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2}$ 重量%が好ましく、 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2}$ 重量%がより好ましい。一態様において、本発明の組成物が飲料等の液体組成物の場合は、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の含有量は、組成物中に、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-1}$ 重

量%が好ましく、 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-2}$ 重量%がより好ましく、 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-2}$ 重量%が更に好ましい。

Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩は、例えば、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) により公知の方法で定量することが可能である。

[0032] 本発明の組成物は、経口で摂取（経口投与）されることが好ましい。本発明の組成物の投与量（摂取量ということもできる）は特に限定されない。本発明の組成物の投与量は、アミロイドβの産生抑制及び／又は蓄積抑制効果が得られるような量であればよく、投与形態、投与方法、対象の体重等に応じて適宜設定すればよい。本発明の組成物の投与量は、β-セクレターゼ阻害効果及び／又はミクログリアの貪食作用促進効果が得られるような量であることが好ましい。

[0033] 一態様において、本発明の組成物をヒト（成人）を対象に摂取させる又は投与する場合、その投与量は、Cyclo (Phe-Phe) の投与量として、1日あたり、好ましくは $1 \mu\text{g}$ 以上、より好ましくは $10 \mu\text{g}$ 以上、さらに好ましくは $150 \mu\text{g}$ 以上、また、好ましくは $1000 \mu\text{g}$ 以下、より好ましくは $500 \mu\text{g}$ 以下、さらに好ましくは $300 \mu\text{g}$ 以下である。一態様において、本発明の組成物をヒト（成人）に摂取させる又は投与する場合、Cyclo (Phe-Phe) の投与量として、1日あたり、好ましくは $1 \sim 1000 \mu\text{g}$ 、より好ましくは $10 \sim 500 \mu\text{g}$ 、さらに好ましくは $150 \sim 300 \mu\text{g}$ である。

上記量を、1日1回以上、例えば、1日1回で又は数回（例えば2～3回）に分けて、摂取又は投与することが好ましい。一態様においては、上記量のCyclo (Phe-Phe) 又はその塩を、経口で摂取させる又は投与することが好ましい。ヒト（成人）の場合、1日当たり体重 60kg 当たり上記量のCyclo (Phe-Phe) 又はその塩を摂取させる又は投与することが好ましい。一態様において、本発明の組成物は、ヒトに、体重 60kg あたり、1日あたり上記量のCyclo (Phe-Phe) 又はその塩を

摂取させる又は投与するための経口用組成物であってよい。

[0034] 本発明の組成物は、継続して摂取又は投与されるものであることが好ましい。C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を継続的に摂取させる又は投与することによって、より高い効果が得られることが期待される。一態様において、本発明の組成物は、好ましくは1週間以上、より好ましくは4週間以上、さらに好ましくは8週間以上継続して摂取又は投与されることが好ましい。

C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、飲食品などとして摂取可能であり、安全性の観点から、例えば長期摂取することにも問題が少ないと考えられる。

[0035] 本発明の組成物を摂取させる又は投与する対象（投与対象ということもできる）は、特に限定されない。好ましくはヒト又は非ヒト哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。

一態様において、本発明の組成物の投与対象として、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制を必要とする又は希望する対象、アミロイド β の蓄積に関連する状態又は疾患の予防又は改善を必要とする又は希望する対象等が挙げられる。一態様において、本発明における投与対象として、中高年者が挙げられる。中高年者は、高齢者を含む。中高年者は、例えば、40歳以上のヒトであってよい。一態様において中高年者の中でも、対象として高齢者が好ましい。高齢者は、例えば、60歳以上又は65歳以上のヒトであってよい。一態様において、本発明の組成物の投与対象は、健常者であってよい。例えば、脳内におけるアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制、脳内におけるアミロイド β の蓄積予防、アルツハイマー病又は軽度認知障害の予防等を目的として、健常者に対して使用することもできる。

[0036] 本発明の組成物には、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制により発揮される機能の表示が付されていてもよい。このような表示は機能性表示ともいう。上記表示は、特に限定されない。このような表示として、例えば、「認知機能を高める」、「認知機能の低下を抑える」、「認知機能を良好に

保つ」、「記憶力を高める」、「記憶力の低下を抑える」、「記憶力を良好に保つ」、「記憶の精度を高める」、「記憶障害を予防する」、「記憶障害を改善する」、「認知機能の一部である記憶力を維持する」、「記憶力の低下が気になる方に適した機能」、「認知機能の一部である記憶力の精度や判断の正確さを向上させる」、「記憶の保持又は統合を改善する」、「認知機能の強化を維持する」、「遂行機能を改善する」、「注意力と集中力を促進する」、「学習能力を改善する」、「見当識を維持・改善する」、「加齢に伴う認知機能低下を遅延する」、「短期及び長期記憶を強化する」、「言語的及び視空間記憶を促進する」、「論理的思考力を維持・改善する」、及び、これらと同視できる表示又は機能性表示が挙げられる。

本発明の一態様において、本発明の組成物は、上記の表示が1又は2以上付された飲食品であることが好ましい。また上記の表示は、上記の機能を得るために上記組成物を用いる旨の表示であってもよい。当該表示は、組成物自体に付されてもよいし、組成物の容器又は包装に付されていてもよい。

[0037] 本発明は、以下の方法及び使用も包含する。

C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を投与する、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制方法。

C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を投与する、 β -セクレターゼ阻害方法。

C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を投与する、ミクログリア細胞の貪食作用促進方法。

アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のための、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の使用。

β -セクレターゼを阻害するための、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の使用。

ミクログリア細胞の貪食作用促進のための、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の使用。

上記方法は、治療的な方法であってもよく、非治療的な方法であってもよい。

。上記使用は、治療的な使用であってもよく、非治療的な使用であってもよい。

C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、1種又は2種以上のアミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のために使用することができる。

[0038] 一態様において、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、 β -セクレターゼ阻害によって、アミロイド β の産生を抑制及び／又は蓄積を抑制するために使用することができる。一態様において、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、ミクログリア細胞の貪食作用を促進することによって、アミロイド β の蓄積を抑制するために使用することができる。

[0039] 上記方法及び使用においては、1日に1回以上、例えば、1日1回～数回（例えば2～3回）、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を対象に摂取させる又は投与することが好ましい。上記の使用は、好ましくはヒト又は非ヒト哺乳動物、より好ましくはヒトにおける使用である。一態様において、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、 β -セクレターゼ阻害及び／又はミクログリア細胞の貪食作用促進によって、アミロイド β の蓄積に関連する状態又は疾患を予防又は改善するために使用することができる。C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を投与する、アミロイド β の蓄積に関連する状態又は疾患の予防又は改善方法も本発明に包含される。

[0040] 上記方法及び使用においては、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制効果が得られる量（有効量ということもできる）のC y c l o (P h e - P h e) 又はその塩を使用すればよい。上記有効量は、 β -セクレターゼ阻害効果及び／又はミクログリア細胞の貪食作用促進効果が得られるような量であることが好ましい。C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の好ましい投与量、投与方法、投与対象等は上述した本発明の組成物と同じである。C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、そのまま摂取又は投与してもよく、これを含む組成物として摂取又は投与してもよい。例えば、本発明の組成物を摂取又は投与してもよい。

[0041] C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、アミロイド β の産生抑制及び

／又は蓄積抑制のために使用される飲食品、医薬品、医薬部外品、飼料等の製造のために使用することができる。一態様において、本発明は、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物の製造における、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の使用、も包含する。本発明は、 β -セクレターゼ阻害用組成物又はミクログリア細胞の貪食作用促進用組成物の製造における、C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩の使用、も包含する。

C y c l o (P h e - P h e) 又はその塩は、アミロイド β の蓄積に関連する状態又は疾患の予防又は改善用組成物の製造のために使用することができる。

- [0042] 本明細書において下限値と上限値によって表されている数値範囲、即ち「下限値～上限値」は、それら下限値及び上限値を含む。例えば、「1～2」により表される範囲は、1以上2以下を意味し、1及び2を含む。本明細書において、上限及び下限は、いずれの組み合わせによる範囲としてもよい。

実施例

- [0043] 以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、これにより本発明の範囲を限定するものではない。

- [0044] <実施例1～4及び比較例1>

(β -セクレターゼ阻害活性を有する化合物のスクリーニング)

被験化合物について、 β -セクレターゼ阻害活性を調べた。被験化合物には、環状ジペプチドであるシクロフェニルアラニルフェニルアラニン (C y c l o (P h e - P h e)) (実施例1～4) 及びシクロロイシルアラニン (C y c l o (L e u - A l a)) (比較例1) を使用した (いずれも B a c h e m 社)。

β -セクレターゼ阻害活性の評価には、市販のキット B e t a S e c r e t a s e (B A C E 1) A c t i v i t y A s s a y K i t (a b c a m) を用いた。キットに記載の方法に従って、 β -セクレターゼ酵素活性の阻害効果を評価した。

96 W e l l P l a t e (C o r n i n g) 上でサンプル液 (被験化合

物溶液)と酵素液を混合した後、37℃で10分間プレインキュベートした。その後、基質液を添加し、37℃で60分間反応させた。反応開始後0分から60分まで5分ごとに、マイクロプレートリーダー FlexStation 3 (Molecular Devices) で、反応液の蛍光強度 (RFU) ($E_x/E_m=335\text{ nm}/495\text{ nm}$) を測定した。n=2で反応を行った。評価における各被験化合物の濃度 (最終濃度) は、表1の通りとして実施した。

[0045] [表1]

	化合物	濃度($\mu\text{g/mL}$)
Control	非添加	—
実施例1	Cyclo(Phe-Phe)	4.4
実施例2	Cyclo(Phe-Phe)	2.2
実施例3	Cyclo(Phe-Phe)	1.1
実施例4	Cyclo(Phe-Phe)	0.55
比較例1	Cyclo(Leu-Ala)	20

[0046] 酵素活性の評価には反応液の Δ 蛍光強度 ((反応終了時の蛍光強度 (60分)) - (反応開始前蛍光強度 (0分))) を使用した。被験化合物非添加群をControlとした。また、陽性対照にはキットに付属の阻害剤を使用した。

[0047] 図1は、被験化合物の β -セクレターゼ (BACE) 阻害活性を示すグラフである。結果は、平均 $\pm$ 標準偏差 (n=2) で示した。図1に示すBACE活性は、ControlのBACE活性 (Controlの反応液の Δ 蛍光強度) を1とした場合の、被験化合物のBACE活性 (被験化合物を添加した反応液の Δ 蛍光強度) の相対値である。

Cyclo (Phe-Phe) について、 β -セクレターゼの酵素活性の低下が確認された。環状ジペプチドであるCyclo (Phe-Phe) が β -セクレターゼ阻害活性を有していることが明らかになった。

[0048] <実施例5>

(食食作用の測定)

目的

*in vitro*アッセイを使用して脳ミクログリアによるアミロイド β ($A\beta$)₁₋₄₂ (モノマー及びオリゴマー) 貪食作用 (ファゴサイトシス) の増強におけるCyclo (Phe-Phe) (CFF) の効果を調べた。

[0049] 材料と方法

A. 試薬

Gibco Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 Ham 1 : 1 (DMEM/F12)、ピルビン酸ナトリウム、ウシ胎児血清 (FBS)、ウマ血清 (HS)、ペニシリン/ストレプトマイシン (P/S)、ポリ-D-リジン (PDL) コート24-wellプレート、Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)、Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)、BlockAid™ Blocking Solution、IBA1ポリクローナル抗体 (IBA1) 及びHoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrateは、ThermoFischer Scientificから入手した。

β -アミロイド (1-42)、HiLyte™ Fluor 488 ($A\beta$)₁₋₄₂ 及び1% NH_4OH solutionはAnaspecから購入した。Triton (登録商標) X-100及びパラホルムアルデヒド (PFA) は、Sigma Aldrichから入手した。シクロフェニルアラニン-フェニルアラニン (Cyclo (Phe-Phe) : CFF) はBachem社から購入した。

[0050] B. $A\beta$ ₁₋₄₂ の調製

メーカー (Anaspec) の推奨に従って、 $A\beta$ ₁₋₄₂ペプチド ($A\beta$ ₁₋₄₂ モノマー) の可溶性種を調製した。凍結乾燥した $A\beta$ ₁₋₄₂ペプチドを1% NH_4OH 溶液に2 mg/mLの濃度で溶解した。ペプチド溶液をDPBSでさらに希釈し、最終濃度1 mg/mLのストック溶液にした。再構成されたペプチドをいくつかのフリーザーバイアルに分注し、-20℃で保存した。

ローダミンB標識合成 $A\beta_{1-42}$ ペプチド (GL Biochem社、上海、中国) を冷たいヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) に1 mMの濃度で溶解した。溶液を室温で1時間インキュベートし、termovapサンプル濃縮器で乾燥させた。残留物をジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して5 mMの濃度にし、さらに最小必須培地 (MEM) で最終濃度200 μ Mに希釈し、ストック溶液とした。希釈した $A\beta_{1-42}$ を4℃で24時間インキュベートして、オリゴマーの $A\beta_{1-42}$ ($A\beta_{1-42}$ オリゴマー) を得た。

[0051] C. 細胞培養及び処理

SIM-A9マウスミクログリア細胞 (ATCC CRL-3265) を、10% FBS、5% HS及び1% P/Sを添加したDMEM/F12中で保持した。貪食作用アッセイでは、SIM-A9細胞を培養フラスコから取り出し、ペレット化し、無血清DMEM/F12に再懸濁した。細胞を20000細胞/ウェルの密度でPDLコート24ウェルプレートに播種し、5% CO₂を含む加湿ガスチャンバー内で、37℃で24時間、Cyclo (Phe-Phe) で前処理した。Cyclo (Phe-Phe) の最終処理濃度は2.2 μ g/mLであった。

[0052] BV-2マウスミクログリア細胞を、10% FBS、1% ピルビン酸ナトリウム及び1% P/Sを添加したMEM中で保持した。細胞を、11.05 μ g/mLのCyclo (Phe-Phe) 及び2 μ M $A\beta_{1-42}$ オリゴマーで、5% CO₂を含む加湿ガスチャンバー内で37℃で16時間共処理した。Cyclo (Phe-Phe) は、塩酸 (HCl) に溶解させてMEMに添加した。

[0053] D. 貪食作用アッセイ

接着性のSIM-A9ミクログリアをCyclo (Phe-Phe) (2.2 μ g/mL) で24時間前処理した後、無血清DMEM/F12で1回リンスし、次いで、無血清DMEM/F12中で4.51 μ g/mLの濃度で $A\beta_{1-42}$ (モノマー) を添加し、37℃で6時間インキュベートした。インキュベーション期間の終わりに、 $A\beta_{1-42}$ 含有培地を除去し、細胞をHBS

Sで3回、DPBSで2回穏やかにリンスして、細胞外 $A\beta_{1-42}$ を除去した。次に、細胞を4%PFAで固定し、0.2%Triton（登録商標）X-100で透過処理し、BlockAid™ Blocking Solutionで、室温で1時間ブロックした。IBA1抗体を使用して細胞の形状を視覚化し、Hoechst 33342を使用して核を染色した。分析のためにウェルごとに5セットの画像を取得し、細胞内 $A\beta_{1-42}$ を含む細胞を $A\beta_{1-42}$ /IBA1/核シグナルの共局在化によって決定した。細胞内 $A\beta_{1-42}$ を含む細胞の数は、ビヒクルグループ（Cyclo（Phe-Phe）で処理していない細胞、ビヒクルコントロール）に対して正規化された貪食細胞の平均数として表す。

[0054] Cyclo（Phe-Phe）と $A\beta_{1-42}$ オリゴマーで共処理したBV-2細胞を4%PFAで固定し、顕微鏡写真を撮影した。フローサイトメトリー分析では、細胞を2%FBSで2回洗浄し、1000rpmで5分間遠心分離し、Fc-Block（BD Bioscience）で30分間ブロックした。FlowJoソフトウェア（Tree Star、Ashland、OR）を使用して蛍光データを分析した。

[0055] E. 統計分析

統計分析は、GraphPad Prism version 5.0（San Diego, California, USA）を使用して行った。結果は全て、平均±標準偏差として示す。統計分析は、Student's t-testによって実施した。P値が $p < 0.05$ の場合、データを有意であるとみなした。

[0056] （結果）

脳ミクログリア細胞によるアミロイド β_{1-42} （モノマー及びオリゴマー）貪食作用の増強におけるCyclo（Phe-Phe）の効果を評価するために、Cyclo（Phe-Phe）で処理していない細胞（ビヒクルコントロール）とCyclo（Phe-Phe）処理細胞とを比較した。

[0057] A. アミロイド β_{1-42} モノマー貪食作用の増強におけるCyclo（Phe

－Phe) の効果

図2は、Cyclo (Phe－Phe) で24時間前処理したSIM－A9ミクログリア (CFF)、及び、Cyclo (Phe－Phe) で処理しなかったSIM－A9ミクログリア (ビヒクルコントロール (VC)) の細胞内アミロイドβモノマーの量を示すグラフである。＊は、ビヒクルコントロール (VC) に対して有意差 ($p < 0.05$) があったことを示す。ミクログリア内のアミロイドβ量は、ビヒクルコントロールのアミロイドβ量を100とした相対値 (%VC) で示した (平均±SD、 $n = 3$)。

図2に示すように、Cyclo (Phe－Phe) は、未処理の細胞 (ビヒクルコントロール) と比較して、有意にアミロイドβ₁₋₄₂モノマー貪食作用を増加させた。

[0058] B. アミロイドβ₁₋₄₂オリゴマー貪食作用の増強におけるCyclo (Phe－Phe) の効果

結果を図3及び図4に示す。

図3は、Aβ₁₋₄₂オリゴマーで処理したBV－2ミクログリア (ビヒクルコントロール (VC))、並びに、Cyclo (Phe－Phe) 及びAβ₁₋₄₂オリゴマーで共処理したBV－2ミクログリア (CFF) の顕微鏡写真である (図3A、図3B及び図3C：ビヒクルコントロール (VC)、図3D、図3E及び図3F：Cyclo (Phe－Phe) 処理)。Cyclo (Phe－Phe) 処理群 (CFF) では、BV－2ミクログリアを16時間CFF及びAβ₁₋₄₂オリゴマーで処理した。図3A及び図3Dは、明視野顕微鏡で観察された細胞密度を示し、図3B及び図3Eは、ローダミンBで染色されたAβ₁₋₄₂ペプチドの存在を示し、図3C及び図3Fは、細胞に取り込まれたローダミンBで染色されたAβ₁₋₄₂ペプチドと細胞のマージ画像 (Merged) である。

[0059] 図4は、Cyclo (Phe－Phe) で処理したBV－2ミクログリア (CFF) と、Cyclo (Phe－Phe) で処理しなかったBV－2ミクログリア (ビヒクルコントロール (VC)) のアミロイドβオリゴマー貪食

作用を調べた結果を示すグラフである。縦軸は、ミクログリア当たりのアミロイド β_{1-42} 密度を示す（平均 $\pm$ SD、 $n=3$ ）。*は、ビヒクルコントロール（VC）に対して有意差（ $p<0.05$ ）があったことを示す。

[0060] CFF投与は、A β_{1-42} ペプチドオリゴマーとインキュベートしたBV-2細胞の貪食活性を有意に促進できることが分かった。これは、未処理のコントロール細胞（VC）との比較で、蛍光細胞の頻度の増加とミクログリアの平均蛍光強度（MFI）レベルの向上で特徴づけられた（図3及び図4）。

[0061] 以上のように、Cyclo（Phe-Phe）は、SIM-A9ミクログリア細胞によるアミロイド β_{1-42} モノマーの貪食及びBV-2ミクログリア細胞によるアミロイド β_{1-42} オリゴマーの貪食作用を増強した。

[0062] <実施例6>

アミロイド前駆体タンパク質（APP）過剰発現細胞アッセイ

Cyclo（Phe-Phe）（CFF）のアミロイド β 蓄積抑制効果を調べるため、*in vitro*アッセイを実施した。アッセイには、スウェーデン二重変異K595N/M596Lを有するアミロイド前駆体タンパク質野生型を過剰発現するH4神経膠腫細胞（H4-hAPP細胞）を使用した。

H4-hAPP細胞によるアミロイド β の蓄積に対するCFFの効果を評価するために、CFFで処理していない細胞（ビヒクルコントロール）とCFF処理細胞とを比較した。

[0063] 材料及び方法

A. 試薬及び細胞

試薬及び細胞は、下記のものを使用した。

Gibco Opti-MEM™ 1 Reduced Serum Medium（Opti-MEM）（細胞培養培地）、ウシ胎児血清（FCS）、ペニシリン／ストレプトマイシン（P/S）、ハイグロマイシンB及びブラストサイジンS塩酸塩は、ThermoFischer Scientific社製を用いた。

MSD (登録商標) 96-well MULTISPOT (登録商標) 6E10 Abeta Triplex Assay kit (アミロイドβ検出キット)はMeso Scale Discovery社製を用いた。

N-[N-(3, 5-ジフルオロフェナセチル-L-アラニル)]-S-フェニルグリシン-t-ブチルエステル(DAPT、γ-セクレターゼ阻害剤)は、Calbiochem社製を用いた。Cyclo(Phe-Phe)(CFF)は、Bachem社製を用いた。

H4-hAPP細胞は、ヒトH4神経膠腫細胞株に、スウェーデン二重変異K595N/M596Lを有するヒトアミロイド前駆体タンパク質695(A_β695)を含むpAG3ベクターを安定導入(stable transfection)して得た。pAG3ベクターは、融合されたCMVとニワトリβ-アクチンプロモーターの制御下に導入遺伝子を有するハイグロマイシンB耐性カセットを含む改変pcDNA3プラスミドである。

[0064] B. 細胞培養及び処理

H4-hAPP細胞は、10%FCS、1%P/S、200μg/mLのハイグロマイシンB及び2.5μg/mLのブラストサイジンS塩酸塩を添加したOpti-MEM中で維持した。細胞を、25,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種し、5%CO₂を含む加湿ガスチャンバー内で、37℃で一晩インキュベートした。翌日、22mg/mLのCFFでH4-hAPP細胞を処理した。CFF処理においては、H4-hAPP細胞の培地にCFFを22μg/mLとなるように添加し、細胞をインキュベートした。陽性対照として、CFFの代わりに、400nMのDAPTでH4-hAPP細胞を処理した。24時間処理した後、アミロイドβ(A_β)分析のために細胞培養上清を収集した。CFF処理及びDAPT処理を行わないH4-hAPP細胞を、ビヒクルコントロールとし、細胞上清を収集した。

[0065] C. アミロイドβ ELISAアッセイ

収集した細胞培養上清を1:10に希釈し、6E10 Abeta Triplex Assay kitを用いてヒトアミロイド β_{1-38} ($A\beta_{1-38}$)、ヒトアミロイド β_{1-40} ($A\beta_{1-40}$)、及びヒトアミロイド β_{1-42} ($A\beta_{1-42}$)を分析した。マルチプレックスアッセイは製造元の指示に従って実行され、プレートはSector Imager 2400 (Meso Scale Discovery社製)で読み取った。アミロイド β の濃度は、標準曲線を参照して計算した。マルチプレックスキットの感度は $<5\text{ pg/mL}$ であった。

[0066] D. 統計分析

Prismバージョン5.0 (GraphPad社製)を使用して統計分析を実施した。すべての結果は、平均±標準偏差として表した。統計分析は、分散分析 (ANOVA) と、それに続く事後Tukeyの多重比較検定により行った。p値が $p < 0.05$ の場合、データは有意であると見なした。

[0067] 結果

図5、図6及び図7に、結果を示す。図5は、H4-hAPP細胞の培養上清中のアミロイド β_{1-38} の濃度を示すグラフである。図6は、H4-hAPP細胞の培養上清中のアミロイド β_{1-40} の濃度を示すグラフである。図7は、H4-hAPP細胞の培養上清中のアミロイド β_{1-42} の濃度を示すグラフである。

図5、図6及び図7中、CFFは、CFF処理した細胞である。Controlはビヒクルコントロールであり、DAPTは陽性対照である。値は平均値±標準偏差 ($n=6$)を表す。***は、ビヒクルコントロールに対して $p < 0.001$ の有意差を示す。

[0068] CFFは、H4-hAPP細胞におけるアミロイド β_{1-38} 、アミロイド β_{1-40} 及びアミロイド β_{1-42} の蓄積を抑制した。CFFは、H4-hAPP細胞におけるアミロイド β_{1-38} 、アミロイド β_{1-40} 及びアミロイド β_{1-42} の蓄積を抑制する効果を有する。

請求の範囲

- [請求項1] Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩を有効成分として含む、アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物。
- [請求項2] β -セクレターゼを阻害することによりアミロイド β の産生及び／又は蓄積を抑制する、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] ミクログリア細胞の貪食作用を促進することによりアミロイド β の蓄積を抑制する、請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記組成物が、経口用である請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項5] 前記組成物が、飲食品又は医薬品である請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項6] 前記組成物が、「認知機能を高める」、「認知機能の低下を抑える」、「認知機能を良好に保つ」、「記憶力を高める」、「記憶力の低下を抑える」、「記憶力を良好に保つ」、「記憶の精度を高める」、「記憶障害を予防する」、「記憶障害を改善する」、「認知機能の一部である記憶力を維持する」、「記憶力の低下が気になる方に適した機能」、「認知機能の一部である記憶力の精度や判断の正確さを向上させる」、「記憶の保持又は統合を改善する」、「認知機能の強化を維持する」、「遂行機能を改善する」、「注意力と集中力を促進する」、「学習能力を改善する」、「見当識を維持・改善する」、「加齢に伴う認知機能低下を遅延する」、「短期及び長期記憶を強化する」、「言語的及び視空間記憶を促進する」及び「論理的思考力を維持・改善する」からなる群より選択される1又は2以上の機能の表示を付されたものである請求項1又は2に記載の組成物。
- [請求項7] アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制用組成物の製造における、Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩の使用。
- [請求項8] アミロイド β の産生抑制及び／又は蓄積抑制のための、Cyclo (Phe-Phe) 又はその塩の使用。