

令和元年6月4日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08328

研究課題名(和文) ミクログリアサブタイプの機能分化制御剤によるアルツハイマー病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a strategy for Alzheimer's disease therapy by agent to control function and differentiation of microglial subtypes

研究代表者

川原 浩一 (KAWAHARA, Kohichi)

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10347015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「RAR:RXR同時活性化によるアルツハイマー病治療」の早期実現をめざし、これまで用いてきたRXR作動薬(HX630)ではなく、RXR作動薬として唯一臨床導入されているベキサロテンに注目し、RAR作動薬・タミバロテン(Am80)との併用療法により、AD病態が著明に改善されるかを調べた。また、2型ミクログリア(2型MG)と機能的にも異なる1型MGのマーカー分子(9F5抗原Gpnmb)の解析を進めた。さらに、その分子がADの新たな治療標的分子となるかを調べることにより、MG亜種の機能分化制御によるAD治療法の開発をめざした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1型ミクログリアに発現するGPNMBは、AD病態の悪化に関与する可能性が初めて明らかとなった。本研究はGPNMBがアルツハイマー病の記憶障害に寄与する分子であることを初めて示唆するもので、今後より詳細な分子機序の解明や適切な治療薬の開発を検討するための第一歩である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Bexarotene, which is the only clinically introduced RXR agonist, instead of the RXR agonist (HX630) we used so far, for the early realization of "AD therapy by RAR:RXR dual agonists". Then, it was investigated whether combined treatment with RAR agonist Tamibarotene (Am80) could significantly improve AD pathology. In addition, we advanced the analysis of a marker molecule of type 1 MG (9F5 antigen, Gpnmb) that is functionally different from type 2 MG. Moreover, we aimed at the development of AD treatment by controlling the function and differentiation of MG subtypes by investigating whether the molecule becomes a novel therapeutic target molecule for AD.

研究分野：神経化学

キーワード：アルツハイマー病 記憶障害 レチノイド レチノイン酸受容体 レチノイドX受容体 肝臓X受容体
ミクログリア亜種 9F5抗原

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 治療の創薬において、現行の対症療法 (ドネペジル等) に代わる根本的治療法の開発研究が国内外で精力的に取り組まれているが、未だに有望なものはない。このような現状から新しい方法論の開発・提案が待たれているが、我々は、神経変性疾患をニューロンのみでの失調と捉えるのではなく、量的にもこれを凌駕するグリア系細胞の寄与をぬきにした中枢機能の維持は不可能との視点に立ち、また AD をアミロイドβ (Aβ) 蓄積が引き金となる炎症の加齢に伴う慢性化と捉え、この治療方策として生体に備わった抗炎症能力を誘導・賦活化すること、特に抗炎症性の神経保護型ミクログリア (2型 MG) を積極的に活用する戦略と、これを実現する薬物シーズの開発をめざしてきた。そして、ごく最近我々は、有望な化合物候補の一つとしてレチノイドを見いだすことができた (図1)。

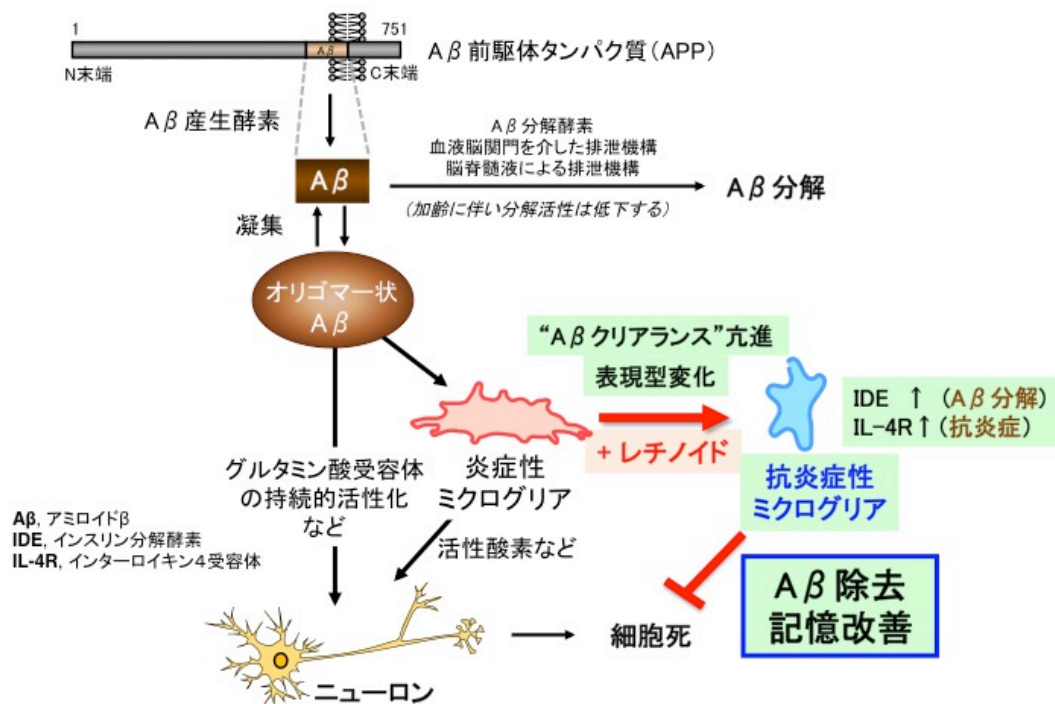


図1. レチノイド処理ミクログリアによるオリゴマー状Aβのクリアランス(概要)

最近、「レチノイドによる AD 治療」という課題で、英国の Corcoran のグループや米国の Landreth のグループは、ベンチャーを立ち上げている。Corcoran のグループは Am580 などのレチノイン酸受容体 (RAR) 作動薬に注目し、Landreth らはレチノイド X 受容体 (RXR) 作動薬のベキサロテンに注目している。また日本では、首藤紘一らによりタミバロテン (Am80) による AD 治療の臨床試験が進められている。それらに対し、著者らのアプローチは、RAR 作動薬と RXR 作動薬の併用療法である (WO/2014/199905)。上記ベキサロテンによる治療効果は、複数のグループにより追試が行われたが、再現性に乏しい (*Science*, 2013)。また、RAR 作動薬単独での効果は、著者らも検討したが、Aβ 減少作用のみであり、高次脳機能障害 (MWM 課題) は有意には改善されない。一方、Am80 と HX630 の併用経口投与は、別の記憶障害モデルであるスコポラミン誘発性健忘ラットに対しても、顕著な行動改善作用を示す。したがって、効率的な記憶改善には、RAR:RXR の同時活性化が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

この状況をふまえ、本研究では、「RAR:RXR 同時活性化によるアルツハイマー病治療」の早期実現をめざし、これまで用いてきた RXR 作動薬 (HX630) ではなく、RXR 作動薬として唯一臨床導入されているベキサロテンに注目し、RAR 作動薬・タミバロテン (Am80) との併用療法により、AD 病態が著明に改善されるかを調べた。また、2型 MG と機能的にも異なる 1型 MG のマーカー分子 (9F5 抗原 Gpnmb) の解析を進めるとともに、その分子が AD の新たな治療標的分子となるかを調べることで、MG 亜種の機能分化制御による AD 治療法の開発をめざした。

3. 研究の方法

AD 病態モデルマウスは、スウェーデン型の変異を持った Aβ 前駆体タンパク質 (APP_{SWE}) の transgenic マウス (APP23) を用いた (Matthias Staufenbiel 博士より恵与)。RAR:RXR 同時活性化による AD 治療の早期実現のために、タミバロテン (Am80, 0.5 mg/kg) とベキサロテン (Bex,

3 mg/kg) の併用療法の治療効果を調べた。すなわち、これまで著者らが示した Am80 (0.5 mg/kg/d) と HX630 (5 mg/kg/d) の併用経口投与による記憶改善作用が、Am80/Bex の併用投与によっても認められるかを、8.5 月齢 APP23 マウスを用いて調べた (18 日間経口投与)。また、老齢野生型マウスの空間認知機能に与える Am80 単独投与の影響を調べた。空間認知機能は、モリス水迷路試験で評価した。血中トリグリセリド (TG) 量は、市販のキット (トリグリセリド E-テストワコー) を用いて測定した。1 型 MG 特異的マーカー分子 9F5 抗原 (Gpnmb) の遺伝子欠損マウスは、国内の製薬企業と共同で開発した。そのマウスと APP23 マウスを交配させることで、9 月齢の APP23:Gpnmb+/+, APP23:Gpnmb+/-, Gpnmb+/-, WT マウスを作出した。

4. 研究成果

レチノイドに関して、以下の知見を得た。

(1) Am80 単独投与 (0.5 mg/kg, 18 日間経口投与) は、16 月齢野生型 (WT) マウスの記憶保持力を改善させる傾向が認められた (図 2, $P=0.093$, $N=13$)。

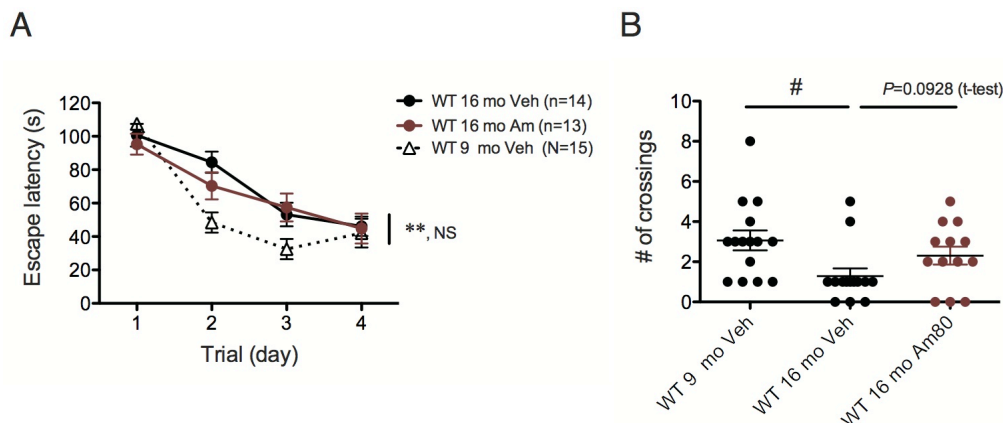


図 2. 老齢野生型 (WT) マウスの記憶形成 (A) および記憶保持力 (B) に与える Am80 単独投与 (0.5 mg/kg/d, for 18 days) の影響

(2) Am80 (0.5 mg/kg) と Bex (3 mg/kg) の併用経口投与は、9 月齢 APP23 マウスの空間記憶形成を有意に改善した ($P<0.05$, $N=24$)。このとき、Bex 単独投与 (3 mg/kg) では記憶形成障害は改善されなかった。(3) Bex (100 mg/kg, 18 日間経口投与) は、9 月齢 APP23 マウスの記憶形成障害にはほとんど影響を与えなかったが、記憶保持力の障害は、改善される傾向が認められた (図 3, $P<0.146$, $N=8$)。しかしながら、Bex (100 mg/kg) の投与により、血中 TG 量の増

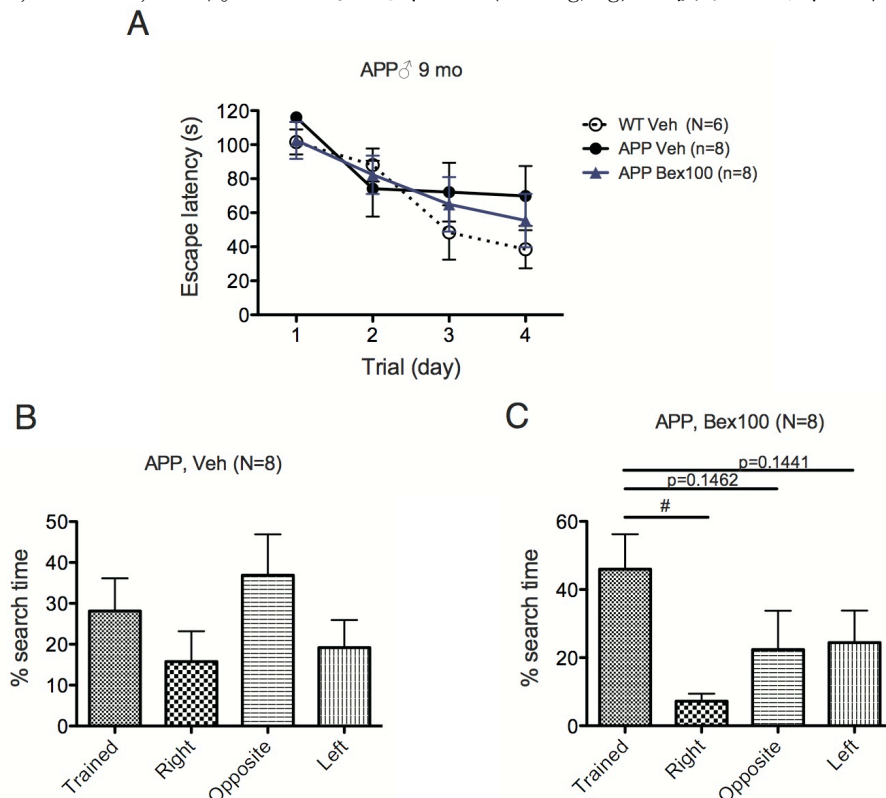


図 3. 9 月齢 APP23 マウスの記憶形成 (A) および記憶保持力 (B,C) に与える Bex 単独投与 (100 mg/kg/d, for 18 days) の影響

大や、肝肥大がみられた (図 4)。

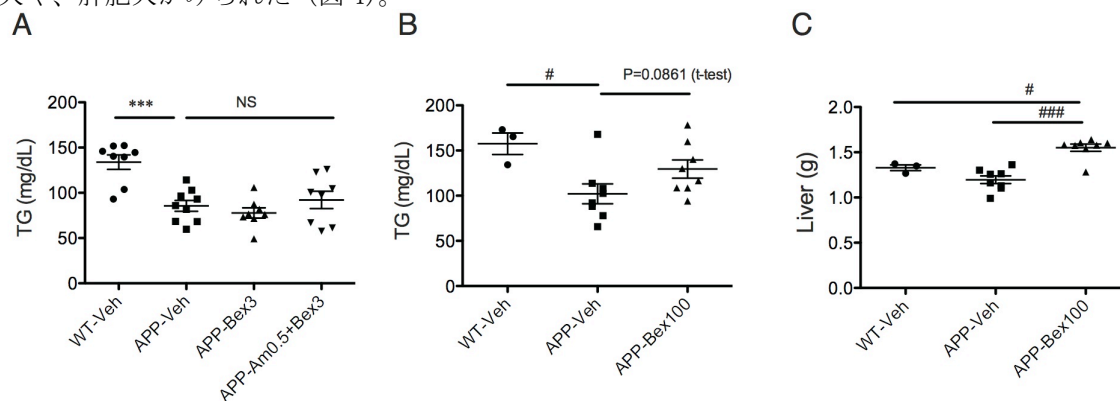


図 4. 9 月齢 APP23 マウスの血中トリグリセリド量 (A, B) および肝臓 (C) に与えるレチノイド経口投与の影響
Bex 3 mg/kg, Am 0.5 mg+Bex 3 mg/kg, or Bex 100 mg/kg/d for 18 days

本研究において、Am80 (0.5 mg/kg) と Bex (3 mg/kg) の併用投与では、AD モデルマウスの記憶保持力が有意に改善されるというデータは得られなかったが、Bex の高用量単独投与では、AD モデルマウスの記憶保持力が改善される可能性が示唆された。Bex 単独投与 (100 mg/kg, 20 days) による AD 改善作用 (Science 335: 1503, 2012) が研究者間で再現性が得られにくいのは、Bex が RXR 特異的アゴニストではなく、高用量では RAR:RXR 活性化作用を有するためであることも指摘されている。すなわち、高用量での Bex の治療効果には、RAR:RXR が主体的な役割を担っている可能性もある。今後、RAR アンタゴニストなどを用いてこの可能性を検証する必要がある。また、高用量 Bex による AD 改善作用には、LXR:RXR 活性化による ABCA1 の発現誘導が重要であることが報告されているが、一方で、RXR アゴニストによる肝毒性には、LXR α :RXR 活性化作用が原因である。そのため、今後 LXR α を介さない LXR:RXR 活性化作用 (例えば、LXR β 選択的アゴニストや TG 上昇作用を有さない LXR モジュレーター) の開発が重要であると考えられる。

1 型ミクログリアのマーカー分子 9F5 抗原 (GPNMB) については、以下の知見が得られた。

(1) ヒト AD 患者の海馬切片において、9F5 陽性細胞が認められた。(2) 9 月齢 APP23 マウスの海馬において、GPNMB 陽性 Iba1 陽性細胞が認められた。GPNMB 陽性細胞は、Iba1 陽性細胞の一部であり、主に A β プラーク周囲で観察された。(3) モリス水迷路試験 (MWM) の training trial において、9 月齢の APP23;Gpnmb+/-マウスは、APP23;Gpnmb+/+マウスよりも空間学習障害が改善される傾向にあった。また、MWM の probe test において、APP23;Gpnmb+/+マウスの記憶保持力には障害がみられたが、APP23;Gpnmb+/-マウスの記憶保持力は WT マウスと同程度であり正常であった。Gpnmb+/-マウスの記憶保持力は、WT マウスと同程度であった。

以上より、1 型ミクログリアに発現する GPNMB は、AD 病態 (空間認知障害) の悪化に関与する可能性が初めて明らかとなった。本研究は GPNMB がアルツハイマー病の記憶障害に寄与する分子であることを初めて示唆するもので、今後より詳細な分子機序の解明や適切な治療薬の開発を検討するための第一歩である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Kana Saida-Tamiya, Minoru Tamiya, Genki Sekiya, Kazunori Isobe, Takaaki Kitazawa, Nobuhisa Isaka, Ayako Matsukawa, Kohichi Kawahara, Akihiko Komuro, Masaji Ishiguro, Structural requirements of cholenamide derivatives as the LXR ligands. Bioorg Med Chem Lett. 査読有, 印刷中

② 川原浩一, ミクログリアのサブタイプとアルツハイマー病, 細胞, 査読無, 50 巻, 2018, 54-59

③ 川原浩一, ミクログリア亜種とアルツハイマー病, BIO Clinica, 査読無, 32 巻, 2017, 56-62

④ 深澤弘志, 川原浩一, 影近弘之, アルツハイマー治療を目指したタミバロテンの前臨床及び臨床研究, ビタミン, 査読有, 91 巻, 2017, 419-425

⑤ Akira Haga, Eri Takahashi, Yasuya Inomata, Koichi Kawahara, Hidenobu Tanihara, Differentiated expression patterns and phagocytic activities of type 1 and 2 microglia, Invest Ophthalmol Vis Sci, 査読有, Vol. 57, 2016, 2814-2823

⑥ Kohichi Kawahara, Hiroshi Hirata, Kengo Ohbuchi, Kentaro Nishi, Akira Maeda, Akihiko Kuniyasu, Daisuke Yamada, Takehiko Maeda, Akihiko Tsuji, Makoto Sawada, Hitoshi Nakayama The novel monoclonal antibody 9F5 reveals expression of a fragment of GPNMB/osteostatin

processed by furin-like protease(s) in a subpopulation of microglia in neonatal rat brain, GLIA, 査読有, Vol. 64, 2016, 1938-1961

〔学会発表〕（計 8 件）

- ①川原浩一, 相馬和希, 長谷川拓也, 前田武彦, アルツハイマー病における GPNMB 陽性 1 型ミクログリアの役割, 第 92 回日本薬理学会年会, 2019
- ②倉橋諒, 相馬和希, 田中怜旺那, 川原浩一, 長谷川拓也, 前田武彦, 9 月齢 APP23 マウスの空間認知障害に及ぼす Gpnmb 遺伝子の影響, N-Hybrid conference 2019, 2019
- ③川原浩一, 相馬和希, 俵山悟, 對馬沙耶香, 長谷川拓也, 前田武彦, アルツハイマー病モデルマウスにおける GPNMB 陽性 1 型ミクログリアの役割, 日本レチノイド研究会第 29 回学術集会, 2018
- ④Kohichi Kawahara, Retinoid receptor ligand as a medicament for treatment of Alzheimer's disease, JSPS Core-to-core Program Symposium Frontier of Genomic Medicine "Retinoid (Am80, Tamibarotene) as therapeutics for intractable diseases" (招待講演) (国際学会), 2018
- ⑤川原浩一, 豊岡万貴, 長谷川拓也, 前田武彦, GPNMB の高齢発症てんかんの抑制分子としての役割, ConBio2017, 2017
- ⑥川原浩一, 阿部小海, 藤巻凜, 笹岡直樹, 長谷川万里菜, 山田大祐, 前田武彦, 多発性硬化症に伴う神経障害性疼痛のモデル動物の作製と薬理学的特徴付け, 第 90 回日本薬理学会, 2017
- ⑦Kohichi Kawahara, Haruna Takase, Yusuke Yamada, Daisuke Yamada, Takehiko Maeda, Hitoshi Nakayama, Hiroshi Fukasawa, Koichi Shudo, RXR agonist with Am80 improved memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease, SFN2016 (国際学会), 2016
- ⑧川原浩一, 前田武彦, てんかんと 1 型ミクログリア, 第 38 回日本生物学的精神医学会/第 59 回日本神経化学会大会合同大会, 2016

〔図書〕（計 1 件）

- ①Kohichi Kawahara, Katsuyoshi Masuda, Masaji Ishiguro, Hitoshi Nakayama, Springer, Utilities of Anti-ligand Antibody and Mass Spectrum to Elucidate Photolabeled Sites. In: Hatanaka Y., Hashimoto M. (eds) Photoaffinity Labeling for Structural Probing Within Protein. 2017, 265

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）
なし

○取得状況（計 1 件）

名称: Medicament for treatment of Alzheimer's disease
発明者: Kohichi Kawahara, Michita Suenobu, Koichi Shudo
権利者: KEMPHYS LTD.
種類: 特許
番号: US Patent 9861640
取得年: 2018
国内外の別: 外国

〔その他〕

ホームページ等
<https://researchmap.jp/read0106609/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。