

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08352

研究課題名(和文) レチノイドX受容体ヘテロダイマーの活性化によるアルツハイマー病の予防と治療

研究課題名(英文) Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease by Activation of Retinoid X Receptor Heterodimers.

研究代表者

井上 誠 (INOUE, MAKOTO)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50191888

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)：アルツハイマー病(AD)の発症機序は未だ十分に解明されておらず、現在根本的なAD治療薬は存在しない。本研究ではAD治療薬の開発を目指して、核内受容体レチノイドX受容体(RXR)の天然由来アゴニストの生物活性を詳細に検討した。その結果、当研究室で見出した天然由来RXRアゴニスト及び半合成RXRアゴニストが、既存の合成RXRアゴニストでは報告のない作用機序で神経細胞の保護作用、抗炎症作用などの生物活性を示すことや肝X受容体のアゴニストと共作用を示すことを細胞及びADモデル動物で明らかにした。本研究の成果はADの予防法及び治療薬の開発に新たな可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AD型認知症患者は超高齢化社会の日本で急速に増加しており、有効な治療薬が存在しない現在においてADの予防法及び根本的な治療薬の開発は喫緊の課題である。本研究では合成RXRと異なる遺伝子発現プロファイルを持つ天然由来RXRアゴニストが新たな作用機序で効果を発現するとともに、パートナーNRアゴニストとの併用により、より効果的に脳機能を多面的に調節できる可能性を示し、天然由来RXRアゴニストは新たなAD治療薬の開発において有用な候補化合物あるいはリード化合物になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The mechanism underlying the development of Alzheimer's disease (AD) has not been fully elucidated, and there is currently no fundamental therapeutic drug for AD. In this study, we investigated the biological activity of a naturally-occurring agonist of the nuclear receptor retinoid X receptor (RXR) with the aim of developing a therapeutic drug for AD. As a result, the naturally-occurring RXR agonists and semi-synthetic RXR agonists found in our laboratory showed some biological activities such as neuronal protective and anti-inflammatory effects with a mechanism of action that has not been reported in existing synthetic RXR agonists, and further they showed interesting cooperative effects with liver X receptor agonists in cells and AD model animals. The results of this study show new possibilities for the development of preventive and therapeutic agents for AD.

研究分野：天然薬物(天然物、生薬、漢方方剤)の生活習慣病や加齢性疾患に対する有効性を分子レベルで解析している。

キーワード：レチノイドX受容体 核内受容体 アルツハイマー病 天然由来アゴニスト 肝X受容体 AD治療薬 脳炎症

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。

## 1. 研究開始当初の背景

日本では2025年に認知症患者が700万人を超え、65歳以上の高齢者の5人に1人が認知症になると試算されている。アルツハイマー病(AD)は進行性の神経変性疾患であり、認知症の原疾患として50~70%を占める。しかしADの発症機序は未だ十分に明らかにされておらず、現在、根本的なADの治療薬は存在していない。

ADの発症機序として、 $\beta$ -アミロイド(A $\beta$ )の凝集・沈着物(老人斑)が引き金となり、その後神経細胞内タウタンパク質の過剰なリン酸化による神経原線維変化が起こり、最終的に神経細胞死が誘導されるとする「アミロイドカスケード仮説」が支持されてきた。しかし最近、A $\beta$ の凝集・沈着を減少させる薬物や抗A $\beta$ 抗体を用いた臨床研究で、いずれも軽度から重度のAD型認知症患者に対する有効性が証明されなかったことより、本仮説の妥当性が疑問視された。その後、ADにおける神経細胞障害は凝集・沈着したアミロイド線維によるのではなく、可溶性のA $\beta$ オリゴマーによって惹起されるという「アミロイドオリゴマー仮説」が支持されるようになってきた。

一方、ADの病理学的変化は臨床症状が出現する数十年前から検出されることより、ADの診断基準で分類されるプレクリニカル期(臨床症状出現前のAD)あるいは軽度認知障害期における治療が有効であると考えられるようになってきた。最近の研究ではプレクリニカル期にすでに低強度の炎症と思われる病理所見が脳内で観察されており、加齢、感染、脳傷害、ストレスなどが原因となりA $\beta$ オリゴマーが増加することにより、ミクログリアやアストロサイトが活性化され慢性炎症が惹起されることがAD発症の引き金になっている可能性が示唆されている。実際に、凝集・沈着したA $\beta$ 多量体に比べ、A $\beta$ オリゴマーは多彩な生物活性を示し、神経細胞に対して毒性を示すことも明らかになっている。

すなわち、これまでにAD治療薬の開発の標的とされてきた分子、1)A $\beta$ の排泄に関するapoE、ATP-binding cassette transporter (ABC) A1, ABCG1、2)A $\beta$ のミクログリアへ取り込みに関するCD36、3)A $\beta$ の分解に関するインスリン分解酵素やネプリライシン、4)血液脳関門を介したA $\beta$ の末梢への排泄に関するlow-density lipoprotein receptor-related protein 1やmultidrug resistance protein 1、などの発現を調節することにより、プレクリニカル期における脳内A $\beta$ オリゴマー量を減少させることができれば、AD発症を遅延あるいは抑制できると考えられる。そして興味深いことには、これらのタンパク質はサブファミリー1に属する核内受容体(NR)により発現が制御されていることである。NRは脂溶性低分子化合物をリガンドとする遺伝子の転写調節因子であり、NRサブファミリー1に属するペルオキシゾーム増殖剤感受性受容体(PPAR)、肝X受容体(LXR)、レチノイン酸受容体(RAR)、ビタミンD受容体(VDR)などは、NRサブファミリー2に属するレチノイドX受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成し、遺伝子の転写を巧みに調節している。すなわちADの予防あるいは治療薬の開発において、これらの核内受容体アゴニストは非常に有望な候補化合物であると考えられる。

## 2. 研究の目的

「アミロイドオリゴマー仮説」によれば、脳内A $\beta$ オリゴマー量を減少させる薬物やA $\beta$ オリゴマーの毒性を軽減できる薬物はAD発症を遅延、抑制できると考えられる。そこで、そのような薬物の開発を目指してNRサブファミリー2に属するRXRを標的分子に選んだ。NRサブファ

ミリー 1 に属する NR は NR/RXR ヘテロダイマーを形成することにより A の産生、分解、排泄を制御する多くのタンパク質の発現を調節していることが報告されている。また、多くの NR サブファミリー 1 に属する NR は、特徴的な炎症抑制作用を示すことも報告されている。そして、NR/RXR ヘテロダイマーは NR の種類により、NR アゴニスト及び RXR アゴニストにより、それぞれ単独であるいは協力的に遺伝子の転写を調節している。すなわち RXR アゴニストは単独、あるいは、パートナーNR アゴニスト依存的に A の産生、分解、排泄を調節できる可能性や A オリゴマーの細胞毒性を軽減できる可能性が考えられる。そこで本研究では RXR が他の NR とは異なった特徴を有する NR であることに着目し、合成 RXR アゴニストとは異なる遺伝子発現誘導プロファイルを有する天然由来 RXR アゴニストの生物活性を詳細に検討するとともに、NR サブファミリー 1 に属する NR に対するアゴニストとの併用による AD に対する予防・治療法を開発することを目的とした。

### 3 . 研究の方法

( 1 ) ミクログリア様 MG5 細胞、アストロサイト様 A1 細胞、神経細胞様 PC12 細胞、マクロファージ様 RAW264.7 細胞は理化学研究所細胞バンクより購入した。

( 2 ) AD モデルマウスとして、ヒト AD に類似した病態を示す App<sup>NL-G-F</sup> マウスを繁殖飼育し、RXR アゴニストの作用を解析した。天然由来 RXR アゴニストは 1 週間胃内強制投与し、海馬、大脳皮質における、炎症性サイトカイン、ミクログリアやアストロサイトの活性型マーカー、A の産生と分解に関与する酵素、A の産生・排泄に関与するタンパク質の mRNA とタンパク質の発現を調べた。

( 3 ) 各種細胞及びマウス脳内における mRNA 及びタンパク質の発現量はそれぞれリアルタイム PCR 法及びウェスタンブロット法で解析した。

( 4 ) マウスの認知能に及ぼす NR アゴニストの効果は 新奇物体認識試験法を用いて解析した。

### 4 . 研究成果

これまでに当研究室では、ホオノキオール、プレニルフラバノン (SPF1、SPF2) などいくつかの RXR に対する天然由来アゴニストを見出してきた。そこで本研究では、AD の発症抑制に関与すると考えられる生物活性に焦点を絞り、RXR アゴニスト及び LXR アゴニストの単独あるいは併用効果を詳細に検討した。さらに、ヒトの AD プレクリニカル期の動物モデルとして注目されている APP<sup>NL-G-F</sup> マウスを用いて、RXR アゴニスト効果を検討した。

#### 1 ) RXR アゴニストの神経様細胞 PC12 細胞に及ぼす効果

A のオリゴマーあるいは凝集・沈着物による神経細胞死の誘導は、AD 型認知症の発症の直接的な原因になっている。そこで、RXR アゴニストが神経様細胞 PC12 細胞に及ぼす効果を検討した。その結果、プレニルフラバノン (SPF1 と SPF2) は A が誘導する細胞死を 1  $\mu$ M 以下の低濃度で抑制し、その作用は RXR アンタゴニストで阻害された。また、この細胞死抑制作用は LXR アゴニスト T0901317 の共存下で増強された。さらに、SPF1/2 はコレステロール排出トランスポーターである ABCA1 を単独で誘導し、その作用は T0901317 の共存下で増強された。興味深いことに、ABCA1 によるコレステロールの排出活性を阻害するシクロヘキシミドは、SPF1/2 による A が誘導する PC12 細胞死の抑制作用を阻害した。これらの結果より SPF1/2 が RXR/LXR ヘテロダ

イマーを介して ABCA1 を誘導し、A の細胞毒性を阻害している可能性が示唆された。ABCA1 は細胞膜のラフトに存在する A の結合タンパク質と考えられている RAGE(receptor for advanced glycation end products)、TLR4 (toll-like receptor 4) などの局在に影響を与え A の細胞死の誘導シグナルと遮断している可能性が考えられており、RXR アゴニストはこれまでに報告のない機序で神経細胞の細胞死を抑制している可能性が示唆された。

## 2) RXR アゴニストのサイトカイン産生抑制作用

SPF1/2 の抗炎症作用を、マクロファージ系細胞 RAW264.7 細胞を用いて、サイトカイン産生能に及ぼす効果を解析することにより詳細に検討した。SPF1/2 はリポ多糖 (LPS) による インターロイキン (IL)-1、IL-6 などのサイトカイン産生を低濃度で抑制した。その抑制作用は LXR アゴニスト T0901317 により増強された。作用機序を検討したところ、一般的な炎症性の転写因子である NF- $\kappa$ B や AP-1 を介した転写を直接抑制する作用は非常に軽微であった。一方、SPF1/2 は activating transcription factor 3 (ATF3) の発現を誘導し、その作用は T0901317 で増強された。ATF3 は IL-1 などの炎症性サイトカインで誘導され、NF- $\kappa$ B による遺伝子転写活性をフィードバック抑制するとともに、NF- $\kappa$ B の核内への移行を阻害することが知られている。そこで SPF1/2 のサイトカイン産生抑制作用を検討したところ、SPF1/2 は NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制した。これらの結果より、SPF1/2 は ATF3 を誘導し NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制することによりサイトカインの産生を抑制するというこれまでに報告のない作用機序でサイトカイン産生を抑制することが示唆された。

## 3) RXR アゴニストのミクログリアに及ぼす効果

ミクログリアは脳内で神経細胞の可塑性を制御するとともに、過剰に活性化されることで脳内炎症を惹起し神経細胞を障害することが示唆されている。そこでミクログリア様 MG5 細胞に及ぼす RXR アゴニストの作用を検討した。MG5 細胞を LPS で刺激すると IL-6 mRNA の著しい増加と iNOS, COX2, IL-1, TNF- $\alpha$  の有意な増加が観察された。一方、SPF1/2 の前処理で LPS による炎症性サイトカイン、メディエーターの産生は有意に抑制された。また、ミクログリアでは殆ど産生されないと報告されているメタロチオネイン II (MTII) が SPF1/2 で強く誘導され、その作用は合成 RXR アゴニストであるベキサロテンより強かった。RXR アゴニストはミクログリアで MTII を誘導することで、脳内の活性酸素の除去、亜鉛などの濃度調節に加え、LRP1 を介した抗炎症活性を示すことが推察された。MTI 及び MTII の脳内における機能はこれまで十分に検討されておらず、本研究で初めて RXR アゴニストで MTII が誘導されることが明らかになり、AD 予防、治療薬の開発のための新たな標的分子になると考えられた。

## 4) 新規 RXR アゴニストの探索

我々がこれまでにいくつかの天然由来 RXR アゴニストを見出しており、今回、それらを化学修飾することにより、遺伝子発現プロファイルの異なる半合成 RXR アゴニストを生成することを目指した。そこで天然由来 RXR アゴニストであるホオノキオールを基にして、より強力な RXR アゴニストを設計、合成した。その結果、PPAR /RXR ヘテロダイマーを選択的に活性化できる RXR アゴニスト化合物 1 を見出した。

## 5) RXR アゴニストの AD モデルマウスに及ぼす効果

化合物 1 が AD モデルマウスである C57BL/6-App<sup>tm(NL)</sup>Tcs (APP<sup>NL-G-F</sup> マウス) に及ぼす効果を

検討した。APP<sup>NL-G-F</sup> マウスは AD のプレクリニカル期の病態を呈するモデルと考えられており、13 ヶ月齢の APP<sup>NL-G-F</sup> マウスでは、炎症性サイトカイン IL-1、IL-6 の発現が上昇するとともに、活性化ミクログリア及び活性化アストロサイトの局在が観察された。そこで化合物 1 の効果を検討したところ、化合物 1 を 1 週間強制胃内投与することにより、海馬で発現が上昇していた炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、TNF) の誘導が抑制され、活性化ミクログリアが減少した。また、A の代謝や抗炎症に関与する ABCA1 の発現を増加させた。しかし、新奇物体認識試験では、加齢 APP<sup>NL-G-F</sup> マウスの活動量の減少が見られ、化合物 1 は有意な新規物体認識能の改善は観察されなかった。

#### 6) 今後の展望

本研究を通して、天然由来 RXR アゴニスト及び半合成 RXR アゴニストが、これまでの合成 RXR アゴニストでは報告されていない作用機序による生物活性を示すこと、パートナー NR である LXR に対するアゴニストとの興味深い共作用を示すことが明らかになった。今後、各種 AD モデルマウスによる有用性の検討とヒトの臨床研究への展開が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang W, Nakashima KI, Hirai T, Inoue M.	4. 巻 73
2. 論文標題 Neuroprotective effect of naturally occurring RXR agonists isolated from Sophora tonkinensis Gagnep. on amyloid- $\beta$ -induced cytotoxicity in PC12 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 154-162
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1007/s11418-019-01305-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Wang W, Nakashima KI, Hirai T, Inoue M.	4. 巻 73
2. 論文標題 Anti-inflammatory effects of naturally occurring retinoid X receptor agonists isolated from Sophora tonkinensis Gagnep. via retinoid X receptor/liver X receptor heterodimers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nat Med	6. 最初と最後の頁 419-430
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-018-01277-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakashima KI, Yamaguchi E, Noritake C, Mitsugi Y, Goto M, Hirai T, Abe N, Sakai E, Oyama M, Itoh A, Inoue M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Discovery and SAR of natural-product-inspired RXR agonists with heterodimer selectivity to PPAR $\gamma$ -RXR.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1526-1534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.0c00146.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 井上誠、中島健一、平居貴生	4. 巻 12
2. 論文標題 核内受容体 レチノイドX受容体アゴニストの現在と将来	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 愛知学院大学薬学会誌	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 王蔚、中島健一、平居貴生、井上誠
2. 発表標題 アミロイド が誘導するPC12細胞死に対するサンズコン由来RXRアゴニストの抑制作用
3. 学会等名 日本薬学会第136年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 王蔚、中島健一、平居貴生、井上誠
2. 発表標題 サンズコン由来RXRアゴニストによるアミロイド が誘導するアポトーシスの保護作用に関するメカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中島健一、平居貴生、井上誠
2. 発表標題 生活習慣病の改善を目指した天然由来核内受容体リガンドの探索
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知学院大学薬学部薬用資源学講座 <a href="http://www.phar.agu.ac.jp/lab/med_res/top.html">http://www.phar.agu.ac.jp/lab/med_res/top.html</a>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	王 蔚  (Wei Wang)		
連携研究者	平居 貴生  (Hirai Takao)  (80389072)	愛知学院大学・薬学部・准教授   (33902)	
連携研究者	中島 健一  (Nakashima ken-ichi)  (70635135)	愛知学院大学・薬学部・講師   (33902)	