

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07389

研究課題名(和文) マイクログリアのM2化によるアルツハイマー病根本的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy for Alzheimer's disease via M2 microglia

研究代表者

久保山 友晴 (Kuboyama, Tomoharu)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10415151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドは、マイクログリアをM1化して炎症および神経変性を誘発する。一方、マイクログリアには抗炎症性・組織修復性のM2がある。我々は以前、HDAC3阻害剤RGFP966がマイクログリアをM2化し、軸索伸長を誘発することを報告した。そこで本研究は、in vivoおよびin vitroのアルツハイマー病モデルに対するRGFP966の作用を検証することを目的とした。その結果、RGFP966はアミロイドによってM1化したマイクログリアをM2化させ、因子Aの分泌を促進し、変性軸索を正常化することにより、アルツハイマー病モデル5XFADマウスの記憶障害を回復させることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病が難治性である原因は、発症時には既に脳内に多くのアミロイドが沈着し、神経回路網の破綻が生じているためだと考えられている。本研究成果は、HDAC3阻害剤RGFP966が、変性軸索正常化因子・因子Aを分泌し、変性した脳内の神経回路網を再構築することにより、抗アルツハイマー病作用を示したと考えられる。本研究は新たなアルツハイマー病治療法の開発に繋がるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Amyloid (A) skews microglia to M1 phenotype and induces inflammation and neurodegeneration. On the other hand, another type of microglia, M2, shows anti-inflammatory and neurotrophic effects. We previously clarified that HDAC3 inhibition induced predominance of M2 microglia and axonal growth. Therefore, this study aimed to clarify that HDAC3 inhibition skewed to M2 microglia and restored memory function in in vitro and in vivo Alzheimer's disease models. As a result, RGFP966 skewed microglia from M1 to M2 in A-treated cultured microglia. RGFP966 promoted secretion of factor A, which normalized morphology of axonal endings after A treatment in cultured neurons. RGFP966 decreased degenerated axons and improved novel object recognition memory in a transgenic model of Alzheimer's disease, 5XFAD mice. These results suggest that HDAC3 inhibition increased predominance of M2 microglia, recovered axonal degeneration, and ameliorated memory deficit in 5XFAD mice.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 マイクログリア 軸索 HDAC3

## 1. 研究開始当初の背景

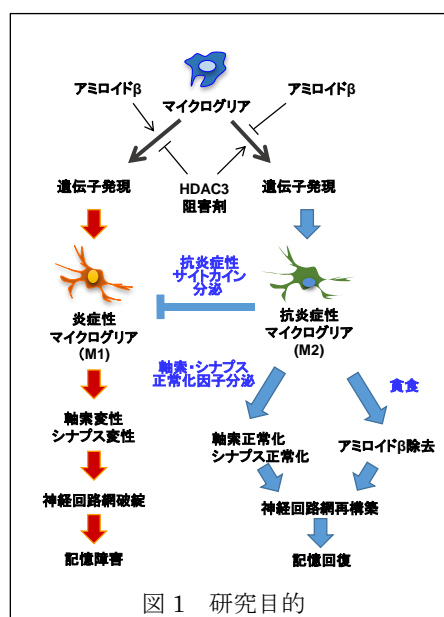
アルツハイマー病が発見されて100年以上経つが、未だに根本的治療薬は存在しない。いくつかの薬物が臨床で用いられているが、いずれも病状の進行を遅らせるだけで、根本的治療法ではない。なぜアルツハイマー病の根本的治療薬の開発に成功していないのだろうか？ アルツハイマー病の発症原因は、遺伝因子、エピジェネティック因子、環境因子など多岐にわたるが、共通して患者に見られるのは脳内におけるアミロイドβタンパクの沈着と神経変性、そして記憶障害である。これまで、アミロイドβの産生を抑制したり除去したりする薬物の開発が多く行われてきたが、アルツハイマー病患者の記憶を改善するものはない[1]。さらに、アルツハイマー病患者の脳内で炎症反応が生じていることが神経変性の原因と考えられていることから[2]、様々な抗炎症薬の治験が行われてきたが、有効なものは見つかっていない[1]。これらの理由として、アルツハイマー病発症時には既にアミロイドβが脳内に沈着し、不可逆的な神経変性が生じているため、病因を除去するだけでは回復に至らないのではないかと考えられている[3]。そこで我々は、変性して失われた神経回路網を積極的に再構築させることもアルツハイマー病の治療に必要なのではないかと考えた。

脳内唯一の免疫細胞であるマクログリアには、炎症性のもの(M1)と抗炎症性・組織修復性のもの(M2)が存在する。これまでM1の機能(炎症反応)に着目したアルツハイマー病研究は多いが、M2に着目したものは少ない。近年、M2にはアミロイドβを貪食して除去する作用[4]に加え、軸索伸長を誘発する作用[5]が報告された。このことから、M2を増加させることは、病因となるアミロイドβや炎症反応を取り除くだけでなく、軸索伸長を誘発して神経回路網を再構築できる可能性がある。そこで、“M1を減らしM2を増加させることができれば、アルツハイマー病を治療できる”かもしれない。しかしそのような作用を示す薬物はなく、これを実証した報告はまだない。

マクログリアのM2化およびM1化の過程で様々な遺伝子発現の変化が生じている[4]ことから、申請者は、何らかのグローバルな遺伝子発現制御機構があるのではないかと考えた。そこでヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)に着目した。HDACは、核内のヒストンの脱アセチル化を促進して様々な遺伝子発現を制御する。我々はこれまでに、HDAC3選択的阻害剤(RGFP966)を脊髄損傷モデルマウスに投与した結果、M1マクログリアが減少してM2マクログリアが増加し、軸索伸長が誘発され、運動機能が回復することを明らかにした(Kuboyama et al, Sci Rep, 2017)。そこで我々は、アルツハイマー病においてもHDAC3を阻害すればM1マクログリアが減少してM2マクログリアが増加し、その結果アミロイドβが除去され、変性した軸索・シナプスが正常化して神経回路網が再構築され、記憶障害が改善するのではないかと(図1)と考えた。

## 2. 研究の目的

アルツハイマー病モデルマウスにおいて、M1を減少させM2を増加させることができれば、炎症が抑制され、アミロイドβが除去され、神経回路網が再構築され、記憶障害から回復できる



のかどうかを、HDAC3 阻害剤を用いて実証し、その機序を解明し、記憶回復との因果関係を明らかにすることを本研究の目的とした。これにより、“マイクログリアの質的改善によって、病因を除去することに加え、失われた脳機能を積極的に回復させる”という新たなアルツハイマー病治療ストラテジーを確立することを目指した。

### 3. 研究の方法

P1-P4 ddY マウスの大脳皮質からマイクログリアを初代培養した。処置後、抗 iNOS 抗体 (M1 マーカー)、抗 CD206 抗体 (M2 マーカー) を用いて免疫染色を行い、M1 細胞および M2 細胞の割合を算出した。

妊娠 14 日目のマウスの大脳皮質を用い、神経細胞の初代培養を行った。処置後、固定し、軸索終末部の変性を評価した。

7 カ月齢 5XFAD マウスに対して RGFP966 を投与し、新規物体認知試験により記憶能力を評価した。行動実験終了後、マウス脳切片を作成し、抗 CD16/32 抗体 (M1 マーカー)、抗 CD206 抗体 (M2 マーカー)、抗リン酸化型 NF-H 抗体 (軸索マーカー) を用いて免疫染色を行った。また、チオフラビン T を用いてアミロイドプラークの染色を行った。

### 4. 研究成果

培養マイクログリアにアミロイド  $\beta$  を処置すると、M1/M2 比が有意に増加した。次に、アミロイド  $\beta$  を処置した後に IL-4 を処置すると、M1/M2 が有意に減少した。IL-4 は M2 マイクログリアを増加させることが報告されていることから、本培養系はマイクログリアの M2 化を適切に評価できる系であると言える。本培養系を用い、アミロイド  $\beta$  処置後に RGFP966 を処置したところ、M1/M2 比が有意に減少した。以上のことから、RGFP966 はアミロイド  $\beta$  によって M1 化したマイクログリアを M2 化する作用があることが示された。

5XFAD マウスに RGFP966 を投与し、新規物体記憶試験を行った結果、RGFP966 投与により 5XFAD マウスの記憶障害が改善した。次に、5XFAD マウスに clophosome を脳室内投与し、マイクログリアの除去を行った。本マウスに対して RGFP966 を投与しても、記憶改善作用は見られなかった。よって、RGFP966 はマイクログリアを介して記憶改善作用を示したことが明らかになった。脳組織を解析した結果、5XFAD マウスの脳内ではマイクログリアが M1 化している傾向が見られ、RGFP966 投与により M2 化する傾向が見られた。また 5XFAD マウスは、脳内のアミロイドプラーク内で軸索が変性していたが、RGFP 投与により変性軸索が有意に減少した。アミロイドプラークそのものは RGFP966 投与で減少しなかった。さらに、clophosome 脳室内投与した 5XFAD マウスでは、RGFP966 を投与してもアミロイドプラーク内での変性軸索は減少しなかった。以上のことから、RGFP966 は 5XFAD マウスの脳内でマイクログリアを M2 化し、変性軸索を正常化し、記憶改善作用を示すことが明らかになった。

培養マイクログリアにアミロイド  $\beta$  を処置してから RGFP966 を処置し、培養上清を回収した。そしてこの培養上清を、アミロイド  $\beta$  を処置して軸索終末部の変性が生じた培養神経細胞に処置した。その結果、この培養上清処置により、軸索終末部が有意に正常化した。したがって、培養マイクログリアに RGFP966 を処置することにより、何らかの軸索正常化因子が分泌されることが示唆された。そこで RGFP966 処置した培養マイクログリアの培養上清を、抗体アレイで解析した。その結果、因子 A が RGFP966 処置で増加することが示された。因子 A をアミロイド  $\beta$  処置した培養マイクログリアに処置したところ、変性軸索が正常化した。また、RGFP966 処置した培養マイクログリアの培養上清を因子 A に対する機能阻害抗体と混合して、アミロイド  $\beta$

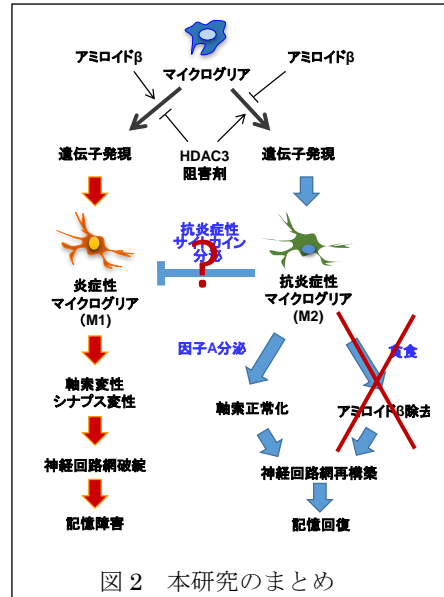
処置した培養マイクログリアに処置したところ、変性軸索は正常化しなかった。以上のことから、RGFP966 はマイクログリアから因子 A を分泌させ、変性軸索を正常化させる作用を示したと考えられる。

本研究は、HDAC3 阻害剤・RGFP966 によるマイクログリア M2 化を介したアルツハイマー病モデルマウスの記憶改善作用を示しただけではなく、その機序として、マイクログリアからの因子 A の分泌促進による変性軸索の正常化が関与している可能性を示した (図 2)。

今回、因子 A を変性軸索正常化の候補因子として発見したが、これまでに因子 A に関するそのような報告はなく、本研究が初めての発見となる。因子 A が *in vivo* において変性軸索正常化や記憶障害改善に寄与するのか、また

どのような機序なのか、今後明らかにしていきたい。さらに、因子 A が HDAC3 阻害によるエピジェネティックな発現制御機構を介して発現が増加するのか、明らかにしていく予定である。

本研究は、マイクログリアを介した神経回路網再構築によるアルツハイマー病治療の可能性を示し、そのターゲット分子として HDAC3 と因子 A を発見した。残念ながら今回用いた HDAC3 阻害剤・RGFP966 は、アミロイドプラークを減少させなかった。最近、抗アミロイド β 抗体・アデュカヌマブが、アルツハイマー病患者の脳内のアミロイド β 減少をさせて記憶障害の進行を遅らせる作用を期待され、米国 FDA にアルツハイマー病治療薬として認可された。そこでこのようなアミロイド β を減少させるような薬物と、RGFP966 を組み合わせれば、より効果的にアルツハイマー病治療ができるようになるかもしれない。今後、マイクログリア M2 化を介した神経回路網再構築を機序とする新たなアルツハイマー病治療薬の開発が期待される。



#### 参考文献

1. Graham WV, Bonito-Oliva A, Sakmar TP (2017) Update on Alzheimer's Disease Therapy and Prevention Strategies. *Annu Rev Med* 68: 413-430
2. Andreasson KI, Bachstetter AD, Colonna M, Ginhoux F, Holmes C, Lamb B, Landreth G, Lee DC, Low D, Lynch MA, Monsonego A, O'Banion MK, Pekny M, Puschmann T, Russek-Blum N, Sandusky LA, Selenica ML, Takata K, Teeling J, Town T, Van Eldik LJ (2016) Targeting innate immunity for neurodegenerative disorders of the central nervous system. *J Neurochem* 138: 653-693
3. Jack CR, Jr., Holtzman DM (2013) Biomarker modeling of Alzheimer's disease. *Neuron* 80: 1347-1358
4. Tang Y, Le W (2015) Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*
5. Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Yoshida S (2015) Interferon regulatory factor 7 participates in the M1-like microglial polarization switch. *Glia* 63: 595-610

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yang Zhiyou, Kuboyama Tomoharu, Tohda Chihiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Naringenin promotes microglial M2 polarization and A degradation enzyme expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phytotherapy Research	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ptr.6305	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 Kuboyama Tomoharu	4. 巻 139
2. 論文標題 Development of New Therapies for Neurodegenerative Diseases <i>via</i> Axonal Growth	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1385 ~ 1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00147	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 Yang Zhiyou, Kuboyama Tomoharu, Tohda Chihiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Naringenin promotes microglial M2 polarization and A degradation enzyme expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phytotherapy Research	6. 最初と最後の頁 1114 ~ 1121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ptr.6305	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 Kuboyama Tomoharu	4. 巻 140
2. 論文標題 Visualizing Axonal Growth Cone Collapse and Early Amyloid Effects in Cultured Mouse Neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/58229	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuboyama Tomoharu, Kominato Seiya, Nagumo Misaki, Tohda Chihiro	4. 巻 82
2. 論文標題 Recovery from spinal cord injury via M2 microglial polarization induced by Polygalae Radix	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytomedicine	6. 最初と最後の頁 153452 ~ 153452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phymed.2020.153452	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 Kuboyama Tomoharu, Yang Ximeng, Tohda Chihiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Natural Medicines and Their Underlying Mechanisms of Prevention and Recovery from Amyloid - Induced Axonal Degeneration in Alzheimer ' s Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4665 ~ 4665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21134665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kuboyama T, Tohda C.
2. 発表標題 HDAC3 inhibition ameliorates memory function via M2 skewing of microglia in a transgenic mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 NEURO2019 (第42回日本神経科学大会、第62回日本神経化学学会大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuboyama T, Tohda C.
2. 発表標題 HDAC3 inhibition ameliorates memory function via M2 microglia in a transgenic mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保山友晴
2. 発表標題 神経変性疾患の根本治療を目指した和漢薬研究
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuboyama T, Tohda C.
2. 発表標題 HDAC3 inhibition ameliorates memory function via regulating microglial phenotype in Alzheimer's disease model mice.
3. 学会等名 第61回日本神経化学会大会・第40回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保山友晴
2. 発表標題 マイクログリアの善玉化によるアルツハイマー病治療法の開発.
3. 学会等名 Toyama Academic GALA 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保山友晴
2. 発表標題 アルツハイマー病の予防と治療を目指した和漢薬研究
3. 学会等名 第35回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保山友晴
2. 発表標題 軸索伸長を基盤とした神経変性疾患治療法の開発
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuboyama T, Tohda C.
2. 発表標題 HDAC3 inhibition ameliorates dystrophic axons and memory function via M2 microglia in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保山友晴、楊熙蒙、東田千尋
2. 発表標題 アミロイド による軸索変性に着目したアルツハイマー病予防・治療法の開発
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 分担者	東田 千尋  (Tohda Chihiro)  (10272931)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授    (13201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------