

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21577

研究課題名(和文) ミクログリア膜タンパク質を標的とした副作用の少ない革新的認知症抗体療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative dementia antibody therapy targeting microglial membrane proteins with few side effects

研究代表者

中曾 一裕 (NAKASO, Kazuhiro)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：30379648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の抗体療法を目指し、xCTを標的とした抗体を作成した。xCTはミクログリア細胞膜に発現誘導されるタンパク質であること、細胞外にグルタミン酸放出することからxc-系/xCTは抗体療法の有望な標的である。細胞外ドメインのアミノ酸配列を使用し、ファージディスプレイ法により5種の候補抗体を得た。ウエスタンブロットにより、取得したいずれの抗体もxCTを認識することを確認した。また、ミクログリア株化細胞において、アルツハイマー病関連刺激としての重合化A_β添加でxCTの発現誘導を確認した。現在ADマウスモデル切片を用いた組織免疫染色、細胞を用いた抗体によるxCT阻害実験を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗体を利用した認知症治療の研究が進められてきた。アルツハイマー病におけるA_β抗体療法もその一つだが、有意な効果が認められないか、自己免疫性脳炎等の副作用により、実用レベルには至っていない。抗体治療を試みる場合、「いかに正常タンパク質を攻撃しないようにするか」が重要であり、標的とすべき抗原は、正常時には発現がなく、認知症時にのみ発現誘導されるものが理想である。本研究では条件を満たす抗原として、シスチン・グルタミン酸交換系トランスポーター「System xc⁻ (xc-系)」の構成分子 xCT に注目し、認知症全般に応用可能な、かつ副作用の少ない抗体療法の可能性を探る。

研究成果の概要(英文)：In order to establish antibody therapy for dementia, we generated antibodies targeting xCT. Since xCT is a protein whose expression is induced in the microglial cell membrane, and release glutamate to the extracellular space, "system xc⁻/xCT" is a promising target for antibody therapy. Five candidate antibodies were obtained by the phage display method using the amino acid sequence of the extracellular domain. Western blotting confirmed that all the obtained antibodies reacted to xCT. In addition, we confirmed the induction of xCT expression in microglial cell lines by adding polymerized A_β as a stimulus related to Alzheimer's disease. Currently, we are conducting tissue immunostaining using AD mouse model sections and xCT inhibition experiments using antibodies using cells.

研究分野：病態生化学，神経科学，神経内科学，生化学

キーワード：ミクログリア xCT xc-系 グルタミン酸 ファージディスプレイ アルツハイマー病 認知症

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎え、ADやDLBなどの認知症患者は年々増加している。申請時点(2019年)の認知症治療薬は、AchE阻害剤、NMDA型グルタミン酸受容体アンタゴニストがあるのみであり、選択肢が少ない。近年ADのアミロイド仮説に端を発し、Aβに対する抗体療法(solanezumabやaducanumab、あるいはワクチン療法)の研究が行われた。しかし、十分な効果が認められなかったり、自己免疫性脳炎など副作用の出現により、実用レベルに至っていない。抗体治療を試みる場合、「いかに正常タンパク質・正常抗原を攻撃しないようにするか」が重要であり、標的とすべき抗原は、正常時にはほとんど発現がなく、認知症など異常が生じた時のみ発現誘導されるものが理想である。

申請者は最近、敗血症後の脳内ミクログリアに誘導されるシスチン・グルタミン酸交換系トランスポーター“System xc⁻”(xc⁻系)由来の細胞外グルタミン酸がうつ症状・認知機能障害を引き起こすことを明らかにした。xc⁻系は、シスチン(酸化型システイン)を細胞に取り込み、同時にグルタミン酸を細胞外に放出する。xCTはxc⁻を構成する重要な分子であり、通常時は脳内にほとんど発現していないが、酸化ストレス等種々の負荷に応じて転写因子Nrf2依存的に誘導される(図1)。xCTを発現した細胞は、抗酸化物質グルタチオンを合成し、結果的に酸化ストレス耐性を獲得する。発現細胞にとっては、自らが劣悪な環境を生き延びるために重要なストレス応答である一方、周囲の神経細胞にとっては放出されたグルタミン酸が毒性に作用してしまう可能性がある。

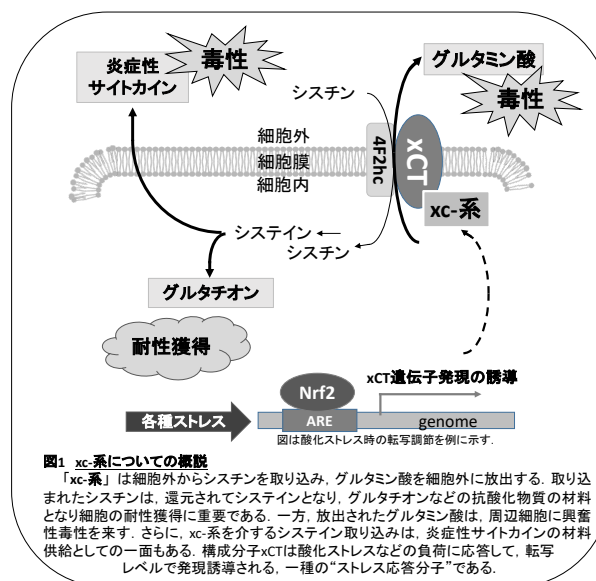
(1) xCTが細胞膜に発現誘導されるタンパク質であること、(2) 放出するグルタミン酸が認知機能低下に関係していること、からxc⁻系/xCTは抗体療法の標的として大きな可能性を持っているという発想に至った。実際、初期検討では敗血症後の認知機能障害だけでなく、長期ビタミンE欠乏による慢性酸化ストレス、ADやDLBの病態の一部にもこのメカニズムが関係している証拠を得ており(Aβやα-synucleinオリゴマー添加で培養ミクログリアのxCTが発現誘導される)、新規性、広範な応用の可能性という点で極めて有望である。

2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)に代表される認知症の患者数は年々増加する一方、現在の認知症治療には選択肢が少ないのが問題である。近年、特定の抗原を認識する抗体を利用した治療の研究が進められてきた。ADにおけるアミロイドβ(Aβ)に対する抗体療法・生物学的製剤療法もその一つだが、これまでの検討では有意な効果が認められない、あるいは自己免疫性脳炎などの副作用出現といった理由により、未だ実用レベルには至っていない。

抗体治療を試みる場合、「いかに正常タンパク質・正常抗原を攻撃しないようにするか」が重要であり、標的とすべき抗原は、正常時には発現がなく、認知症など異常が生じた時のみ発現誘導されるものが理想である。本研究では条件を満たす抗原として、ミクログリア細胞膜に発現するシスチン・グルタミン酸交換系トランスポーター「System xc⁻(xc⁻系)」の構成分子xCTに注目し、ADに限定しない認知症全般に応用可能な、かつ副作用の少ない抗体療法の可能性を探る。

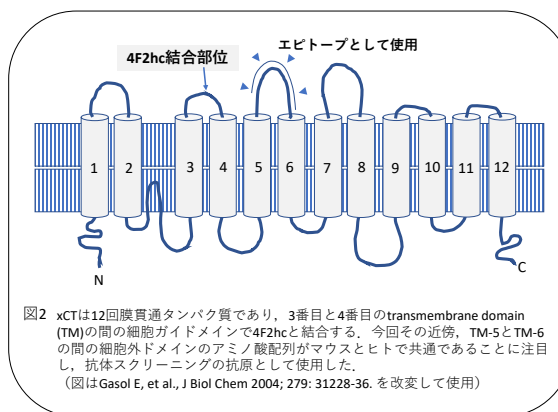
xCTはシスチン・グルタミン酸交換系トランスポーターxc⁻系の構成分子であり、通常の脳内での発現はほとんど見られず、酸化ストレスやAβ等により負荷がかかった際に、主にミクログリアにおいて発現誘導される(神経細胞における発現は検出されない)。xCTを発現した細胞にとっては、自らが劣悪な環境を生き延びるために重要なストレス応答である一方、同時にグルタミン酸を細胞外に放出するため、周囲の神経細胞には毒性に作用する。申請者は最近、敗血症後の脳内ミクログリアに誘導されるxc⁻系由来の細胞外グルタミン酸がうつ症状・認知機能障害を引き起こし、xCTが治療ターゲットになりうることを明らかにした(Sci Rep. 2019)。さらに、これまでの初期検討で、敗血症後の認知機能障害だけでなく、長期ビタミンE欠乏による慢性酸化ストレス、ADやレビー小体型認知症(DLB)の病態にもxc⁻系由来のグルタミン酸が関係



している証拠を蓄積しつつあり、xc-系/xCTは抗体療法の新規標的として極めて大きな可能性を含んでいる。本研究は認知症に対する新規抗体療法の確立を目指すものであるが、(1) 標的抗原xCTが正常脳にはほとんど発現がなく、種々のストレス環境下でのみ発現が誘導され、正常細胞が抗体の標的になりにくいこと、(2) ADだけでなく、DLBや内科疾患に随伴する認知症にも応用可能であること、(3) 細胞外に放出されたグルタミン酸に起因する他の症状(うつ症状や身体活動性低下)にも効果が期待できること、などの点が斬新・独創的であり、挑戦的研究にふさわしいものである。

3. 研究の方法

(1) ファージディスプレイ法によるxCT細胞外ドメインを認識するFab抗体のスクリーニング。研究と将来的な臨床応用を結びつけるため、設定するエピトープは、①xCT細胞外ドメインでトランスポート機能に直結する部位、かつ②ヒトとマウスで共通なアミノ酸配列部分、を満たすものとする。ファージディスプレイ法により上記エピトープを認識するFab抗体をスクリーニングする。transmembrane domain(TM)およびextracellular domain(ED)は右図のようになっており、TM-3とTM-4の間のEDに4F2hc結合部位が存在する。近傍のTM-5とTM-6間のEDのアミノ酸配列はマウスとヒトで共通であるため、候補アミノ酸配列とした。



(2) マウス培養ミクログリア, その他の株化細胞, xCT-KOマウス由来細胞を用いた抗体の分析。分子生物学的手法による抗体のxCT認識能(ウエスタンブロット, 細胞免疫染色)の確認, および抗体を用いたxc-系由来グルタミン酸放出抑制の検討を行う。

(3) マウス脳切片を用いたミクログリア染色性についての確認。ADモデルマウスの脳を用いたウエスタンブロット, 免疫染色。実際に、選択した抗体がマウス, おいて抗体として機能するか否かの判断を行う。

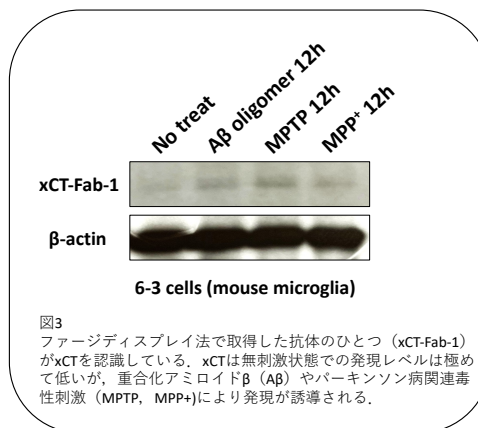
4. 研究成果

マウスおよびヒトに共通なアミノ酸配列で、かつ細胞外ドメインである部位として「LIKQTHHFKDAFSGRDTS」を候補とした。そのうちKGQTHHFKDAFSGRDTSの配列のN末端側にシステインを付加したもの(1)C-KGQTHHFKDAFSGRDTS, およびC末端足にシステインを付加したもの(2)KGQTHHFKDAFSGRDTS-Cを抗原としてペニングを行った。さらにBSAまたはトランスフェリンにリンカーを介して結合させたコンジュゲートを抗原として使用しファージディスプレイライブラリーから結合する抗体のスクリーニングを行った。(外部委託) その結果, 5種の候補抗体を得た。

ウエスタンブロットを用いた分析により, 取得したいずれの抗体もxCTを認識した。また, 6-3ミクログリア株化細胞において, 無刺激状態ではxCT発現が極めて低い

が, アルツハイマー病関連刺激としての重合化Aβ添加やパーキンソン病関連毒性刺激(MPTP, MPP⁺)でxCT発現が誘導された(図3)。

また, 細胞レベルで効果が確認できた場合, 現状Fabのみの抗体にFc部分を結合させたものを用意し, 動物実験を行う予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurashiki T, Horikoshi Y, Kamizaki K, Sunaguchi T, Hara K, Morimoto M, KitagawaY, Nakaso K, Matsura T	4. 巻 未定
2. 論文標題 Molecular mechanisms underlying the promotion of wound repair by coenzyme Q10: PI3K/Akt signal activation via alterations to cell membrane domains.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Clin Biochem Nutr	6. 最初と最後の頁 未定
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中曽一裕, ほか
2. 発表標題 MPTP誘発パーキンソン病モデルにおける活動性低下は ミクログリアxCT/xc- 系と関係している
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会・第20回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021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	岩田 正明 (IWATA Masaaki) (40346367)	鳥取大学・医学部・教授 (15101)	

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
---------	---------