

平成 23 年 4 月 13 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790114
 研究課題名(和文) 2型ミクログリアのA β クリアランス能を促進するアルツハイマー病治療薬候補の開発
 研究課題名(英文) Development of Alzheimer's disease drug candidates promoting A β clearance activity of type 2 microglia
 研究代表者
 川原 浩一 (KAWAHARA KOHICHI)
 熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
 研究者番号：10347015

研究成果の概要(和文)：

我々は、アルツハイマー病(AD)の新しい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行った。(1) 4.5月齢ADモデルマウス(APP23)にIL-4/IL-13を脳内微量注入すると、注入2日後においてCD36陽性MGが出現し、7日後にアミロイド β (A β)蓄積量が減少した。CD36陽性細胞は、マクロファージ/ミクログリアM2マーカー(Arginase I, Yml)と共局在したことから、スカベンジャー受容体を発現しA β クリアランスに関与するMGはM2様細胞(2型)であることがわかった(Kawahara et al., submitted)。(2) IL-4分泌促進作用をもつレチノイン酸受容体アゴニストをAPP23マウスへ経口投与すると、脳内A β_{42} ペプチドが有意に減少することを見出した(Kawahara et al., Biol. Pharm. Bull., 2009)。本研究成果は、抗炎症作用による新しいAD治療戦略に新たな手がかりを与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：

As a new strategy for treatment of Alzheimer's disease (AD), we aimed to induce the antiinflammatory activity we have in a living body. In particular, we tried to develop the strategy for which the neuroprotective anti-inflammatory type of microglia (type 2 MG) is utilized aggressively and searched the new medicine seeds which achieves this. When we administered an intracerebral microinjection of a mixture of IL-4 and IL-13 into one hemisphere of 4.5 mo old APP23 mice, CD36-positive MG was induced at 2 day, and A β accumulation was reduced at 7 day post injection. The cytokine-induced CD36 expression was observed in arginase I-positive and Yml-positive cells, which indicates that CD36-positive MG are M2-like cells (Kawahara et al., submitted). We found that oral administration of retinoic acid receptor agonist Am80, which increased IL-4 production in T-cell system, decreased brain A β_{42} peptide in APP23 mice (Kawahara et al., Biol. Pharm. Bull., 2009). This study may encourage development of new anti-inflammatory strategies for treatment of AD.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：アルツハイマー病、ミクログリア、CD36、レチノイド、インターロイキン-4

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) 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。

一方、脳の免疫担当細胞であるミクログリア (MG) は、AD においては軽度認知障害のときから活性化され、AD 病態の発症と密接に関連することが示唆されている。従来、ミクログリア (MG) は脳炎症時に活性化され、proinflammatory に作用すると捉えられがちであったが、最近の我々の知見も含め、(a) 神経傷害的か保護的となるかは条件によって異なること、(b) その作用の違いには少なくとも 2 群に分けられる MG サブタイプ (1 型と 2 型) が深く関わることが分かってきた。

2. 研究の目的

このような背景の下に我々は、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 A β 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) 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行った。

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 A β 前駆体タンパク質 (APP_{SWE}) の transgenic マウス (APP23) を用いた。APP23 マウスあるいは野生型の同腹仔の脳内に IL-4 と IL-13 の混合液を微量注入し、注入後、4 日目から 7 日目にかけてモリス水迷路試験を行い、空間認知能力を調べた。行動実験終了後、抗 A β 抗体を用いた免疫組織染色を行い、A β が減少するか調べた。また、スカベンジャー受容体 CD36 や A β 分解酵素ネプリライシン (NEP) の発現や分布を組織染色により調べた。Am80 含有のマウス餌を 5 月齢の APP23 マウスに 14 週間連日経口投与し (0.5 mg/kg/d)、その効果を (A) ELISA による A β の定量、および (B) Morris 水迷路を用いた

行動解析によって調べた。

4. 研究成果

(1) IL-4/IL-13 の脳内微量注入は、若齢 APP23 マウスにおける A β 蓄積量を減少させ、空間認知障害を改善させる

我々はこれまでに、抗炎症性サイトカイン IL-4 がラット初代培養 2 型ミクログリアにおけるオリゴマー状 A β ₁₋₄₂ の選択的クリアランスを誘導することを報告した (J. Immunol. 181: 6503-6513, 2008)。本研究では、IL-4 と IL-13 が in vivo での A β クリアランスを誘導するか、そして空間認知障害を改善させるかをアミロイド前駆体タンパク質過剰発現マウス (APP23 マウス) を用いて調べた。我々は 4.5 月齢と 9 月齢の APP23 マウスの左脳へ IL-4/IL-13 混合液を注入し、空間認知能力と A β 蓄積量の変化を調べた。

IL-4/IL-13 投与は、4.5 月齢と 9 月齢の両月齢の APP23 マウスの A β 蓄積量を減少させたが、空間認知障害は 4.5 月齢でのみ有意に改善され、9 月齢では改善されなかった。APP23 マウスは加齢とともに A β が蓄積し空間認知障害も悪化するため、投与された IL-4/IL-13 の治療効果は、蓄積された A β の総量に依存するかもしれない。すなわち、若齢で A β 蓄積量の少ない 4.5 月齢 APP23 マウスでは、認知障害を改善するが、老齢で A β 蓄積量の多い 9 月齢では、認知障害を改善するには至らないと考えられる。あるいは別の可能性として、in vitro 実験系において IL-4/IL-13 によりオリゴマー状 A β が効率的に除去されることから、空間認知障害におけるオリゴマー状 A β の寄与が大きいと考えられるステージ (4.5 月齢) では、IL-4/IL-13 により記憶が改善されるのかもしれない。今後 IL-4/IL-13 脳内投与によるオリゴマー状 A β の変化を調べることが重要である。

(2) IL-4/IL-13 の脳内微量注入は、M2 様ミクログリアを誘導し、スカベンジャー受容体 CD36 の発現量を増加させる

我々はこれまでに、in vitro 実験系において、IL-4 で誘導される 2 型ミクログリアの A β クリアランスには、スカベンジャー受容体 CD36 と A β 分解酵素ネプリライシン (NEP) が寄与することを報告した (J. Immunol. 181: 6503-6513, 2008)。これらの分子が、上記の in vivo での A β 減少に関与するかどうかを

調べるために、ミクログリア/マクロファージマーカー Iba1 や CD36、NEP の発現変化を組織染色で調べた。

IL-4/IL-13 を脳内投与すると、投与 2 日目において Iba1 の増加が観察された。また、投与 2 日目において、CD36 は活性化ミクログリアに発現し、NEP は主にニューロンに発現した。以上のことから、IL-4/IL-13 脳内投与による A β クリアランスには、CD36 や NEP が関与する可能性が示唆された。また、二重染色の結果より、CD36 を発現する細胞は、M2 様マーカー (アルギナーゼ 1, Ym1) 陽性であった。

(3) レチノイン酸受容体 (RAR) アゴニスト Am80 の経口投与は、アルツハイマー病モデルマウスにおける脳内 A β ペプチドを減少させる

「IL-4/IL-13 による A β クリアランス作用」を AD 治療法にまで展開するには、上記クリアランス能を誘導できる薬物候補がほしい。申請者は、naïve T 細胞を IL-4 分泌型の Th2 細胞へ分化誘導することが報告されている、RAR アゴニスト・Am80 に注目し、AD モデルマウスを用いた *in vivo* 系で AD 治療薬候補としての有効性を調べた。

Am80 含有のマウス餌を 5 月齢の APP23 マウスに 14 週間連日経口投与し (0.5 mg/kg/d)、その効果を (A) ELISA による A β の定量、および (B) Morris 水迷路を用いた行動解析によって判定した。

(A) Am80 は APP23 マウスの脳内 A β 量を低下させる：実験期間中、Am80 は体重の増減に影響を与えなかった。Am80 を経口投与すると、可溶性画分の A $\beta_{40,42}$ には影響を及ぼさなかったが、不溶性画分の A $\beta_{40,42}$ 量が減少した。

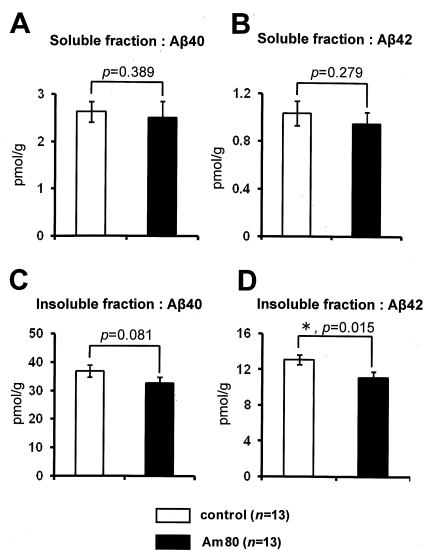


図. Am80 の経口投与 (0.5 mg/kg/d, 14 週間) は、APP23 マウスの脳内 A β 量を減少させる

特に、不溶性画分の A β_{42} は、Am80 投与により有意に減少した (p=0.015, 図)。この結果は、Am80 の経口投与は APP23 の脳内の A β_{42} 量を減少させることを示している。

(B) Am80 は APP23 マウスの Morris 水迷路試験での空間認知能力には影響を与えない：空間認知能力を Morris 水迷路試験で評価すると、vehicle 処理した APP23 は、野生型 (WT) マウスに比べ、空間認知障害が有意に低下していた (p<0.001)。このような条件下で、Am80 を投与したマウスは、行動が改善される傾向にあったが (p=0.254)、統計学的な有意差は得られなかった。また、プローブ試験を行っても、Am80 は有意な行動改善を示さなかった。Morris 水迷路試験中、13 匹中 3~4 匹が泳がずに浮き続けた (遊泳速度: 0.06 m/s 未満)。

本研究より、Am80 の経口投与は APP23 マウスの脳内 A β 量を減少させることがわかった (Kawahara et al., *Biol. Pharm. Bull.* 32:1307-1309, 2009)。今回、Morris 水迷路試験では、行動の有意な改善がみられなかった。行動実験中、浮遊マウスが多く見られたため、今後はストレスの負荷が少ない実験法を用いた方が良いと思われる。又、レチノイド X 受容体 (RXR) アゴニストなどの他の薬物の併用により、Am80 の A β 減少作用を高める工夫が必要であると考えられる。

以上本研究成果は、抗炎症作用による新しい AD 治療戦略に新たな手がかりを与えるものとする。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Kuniyasu, A., Tokunaga, M., Yamamoto, T., Inoue, S., Obama, K., Kawahara, K., Nakayama, H.: Oxidized LDL and lysophosphatidylcholine stimulate plasminogen activator inhibitor -1 expression through reactive oxygen species generation and ERK1/2 activation in 3T3-L1 adipocytes, *Biochim Biophys Acta.* 査読(有), 1811, 153-162 (2011)

② Kawahara, K., Nishi, K., Suenobu, M., Ohtsuka, H., Maeda, A., Nagatomo, K., Kuniyasu, A., Staufenbiel, M., Nakagomi, M., Shudo, K., Nakayama, H.: Oral administration of synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) decreases brain β -amyloid peptides in APP23 mice, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読(有), 32, 1307-1309

(2009)

③ Kawahara, K., Yoshida, A., Koga, K., Yokoo, S., Kuniyasu, A., Gotoh, T., Sawada, M., Nakayama, H.: Marked induction of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in rat CD40+ microglia by comparison to CD40- microglia., *J. Neuroimmunol.*, 査読(有), 208, 70-79 (2009)

④ Yokote, S., Setoguchi, R., Shimizu, E., Kawahara, K., Kuniyasu, A., Shirasaki, T., Takahama, K., Konno, K., Kawai, N., Yamaoka, K., Kinoshita, E., Nakayama H.: A synthetic approach to develop peptide inhibitors delective for brain γ -type sodium channels on the basis of pempidotoxin structure., *Heterocycles*, 査読(有), 79, 925-933 (2009)

[学会発表] (計 12件)

① 末延道太, IL-4/IL-13 の脳内注入は 4.5 月齢 APP23 マウスにおける A β 蓄積を減少させ、記憶学習能力の低下を改善する, 第 27 回日本薬学会九州支部大会, 2010 年 12 月 12 日, 長崎大学, 長崎

② 杉本幸彦, プロスタグランジン E₂ による視索前野ニューロン突起伸長の促進機構, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 10 日, 神戸国際会議場, 神戸

③ 川原浩一, 抗炎症性 2 型ミクログリアの選択的活性化によるアルツハイマー病治療法の開発, 武田薬品創薬研究所研究講演会 (招待講演), 2010 年 12 月 9 日, 武田薬品工業, 大阪

④ 川原浩一, レチノイン酸受容体アゴニスト Am80 の経口投与はアルツハイマー病モデルマウスにおける脳内 β アミロイドペプチドを減少させる, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸国際会議場, 神戸

⑤ 末延道太, APP23 マウスにおける IL-4/IL-13 の脳内微量注入による注入側 β アミロイド蓄積の減少, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸国際会議場, 神戸

⑥ Kawahara, K.,

Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation and improves cognitive deficits in young APP23 mice, 29th Naito Conference on "GLIA WORLD - Dynamic Function of Glial Cells in the Brain -", 2010.10.6, Shonan Village Center, Kanagawa

⑦ 山中暢人, ペプチドを利用したミクログリアへの特異的物質輸送, 第 26 回日本薬学会九州支部大会, 2009 年 12 月 13 日, 九州大学, 福岡

⑧ 大塚英起, A β クリアランス能誘導からみたレチノイドのアルツハイマー病治療の可能性, 第 26 回日本薬学会九州支部大会, 2009 年 12 月 12 日, 九州大学, 福岡

⑨ 山中暢人, 細胞内導入キャリアとしてのミクログリア選択的ペプチドリガンド, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸

⑩ 大塚英起, A β クリアランス能誘導からみたレチノイドのアルツハイマー病治療の可能性, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸国際会議場, 神戸

⑪ 川原浩一, インターロイキン 4 で活性化したラット初代培養 2 型ミクログリアによるオリゴマー状アミロイド β ペプチド₁₋₄₂ の選択的クリアランス, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸国際会議場, 神戸

⑫ Kawahara, K., Interleukin-4-induced selective clearance of oligomeric β -amyloid peptide₁₋₄₂ by rat primary type 2 microglia, 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2009.10.18, McCormick Place convention center, Chicago, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 浩一 (KAWAHARA KOHICHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号: 10347015