

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03354

研究課題名(和文) 持続可能な超高齢化社会を実現する認知症に対する予防医療戦略の基盤構築

研究課題名(英文) Building the foundation for preventive medical strategies against dementia to realize a sustainable super-aging society

研究代表者

橘 敬祐 (TACHIBANA, Keisuke)

大阪大学・大学院薬学研究科・招へい教員

研究者番号：30432446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血液脳関門(BBB)構成分子を標的とした薬物送達技術の開発と、脂質センサー分子核内受容体PPAR α の活性化による脂質代謝制御を介して、認知症に対する予防・治療法を構築することを目的とした。PPAR α の活性化を介した脂質制御法として、植物抽出エキスから活性化成分のスクリーニング、及び、独自リガンドの高度化を行った。また、BBBの構成分子CLDN-5に対する抗体を用いた薬物送達技術の有効性及び安全性を評価した。さらに、CLDN-5の血中濃度測定系を構築し、認知症の早期バイオマーカーとしての可能性を評価した。本成果は、認知症の新規予防・治療法の基盤構築に繋がる非常に意義深いものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の食生活や運動不足によるエネルギー過剰の状態は、生活習慣病発症の引き金となるだけでなく、生活習慣病を基礎疾患として持つ人は、認知症の発症率が高まること等が報告されている。このように、本邦における超高齢化社会においては、認知症の克服が健康寿命の延伸に不可欠である。本研究で得られた成果は、認知症の早期バイオマーカーの開発、血液脳関門を突破する薬物送達技術の開発、及び認知症予防効果を発揮する医薬品・機能性食品成分等の開発に繋がるものであり、認知症の新規予防・治療法の基盤構築による健康長寿社会の実現に向けた非常に意義深いものである。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop both a drug delivery system that modulates the blood-brain barrier (BBB) and methods for preventing and ameliorating dementia through metabolic control by activating peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α). We began by screening and identifying PPAR α activators from plant extracts and designed and synthesized a range of 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine-4-carboxylic acid derivatives as potent PPAR α agonists. Next, we evaluated the efficacy and safety of an antibody against claudin-5 (CLDN-5), a key component of the BBB, for drug delivery to the brain in non-human primates. Additionally, we established a plasma human CLDN-5 protein detection system and investigated its diagnostic utility. Our findings revealed that plasma CLDN-5 could be a potential biochemical marker for diagnosing dementia. These results are of great significance and will pave the way for new methods to prevent and treat dementia.

研究分野：脂質代謝

キーワード：核内受容体 PPAR 認知症 血液脳関門 タイトジャンクション 薬物送達技術 早期診断技術

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国では世界的にも経験したことがない人口減少や少子高齢化が急速に進展しており、2065年には65歳以上の者1人に対して1.3人の現役世代という比率になる。さらに、現在の平均寿命は男性で81歳、女性で87歳であるのに対し、日常生活において介護を必要とせず自立して生活ができる健康寿命は男性で72歳、女性で75歳であり、平均寿命と健康寿命に10歳もの差が開いている。従って、超高齢化社会において持続可能な社会を維持するためには、健康寿命を延伸することが最重要課題である。

高齢者の7人に1人は介護のきっかけである認知症に罹患しているといわれている。認知症は、前臨床期・軽度認知障害(MCI)という未病の状態を経て、30年余りの歳月を経て発症する上に、認知機能の検査はアンケート等によって評価されているため、認知症と診断された患者では神経変性が進んだ状態である。認知症治療薬は大脳皮質等に存在する神経細胞を活性化することで認知機能の低下を抑制することから、神経細胞の変性が進んでしまうと十分な治療効果が発揮されない。一方、前臨床期やMCIである未病の状態では神経変性は進んでおらず、軽度認知障害から正常に回復する報告例もあり、早期から介入することで運動や食事療法による予防・治療効果が期待できる。このように認知症を克服するためには、発症の早期から予防的に介入する先制医療が重要であるが、認知症を早期に見出すバイオマーカーは確立されていない。

近年の食生活や運動不足によるエネルギー過剰の状態は、体内に余剰の脂肪蓄積を促し、生活習慣病発症の引き金となる。脂質異常症などの生活習慣病を基礎疾患として持つ人は、認知症の発症率が高まること、コレステロール代謝を司るアポリポ蛋白 E (ApoE) が危険因子であること、スタチンなどの血中コレステロール低下薬が認知症発症率を低下させることなどが報告されている。しかしながら、脳の毛細血管では隣接する血管内皮細胞の間隙を埋める密着結合(タイトジャンクション)が発達して血液脳関門(BBB)を形成しており、医薬品や食事成分は直接脳内に入ることはできない。

以上より本研究では、脂質センサー分子及びBBBに着目し、認知症の早期バイオマーカーの開発、脳への薬物送達技術の開発、並びに認知症予防効果を発揮する医薬品・機能性食品成分等を開発し、認知症の予防・治療の基盤を構築し、健康長寿社会の実現を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、脂質センサー分子であるPPAR α とBBBのタイトジャンクションの主要な構成分子であるCLDN-5に着目し、(1)BBB構成分子を指標とした認知症の早期バイオマーカーの開発、(2)BBBを標的とした脳への薬物送達技術の開発、並びに(3)認知症の予防・治療に向けたPPAR α の活性制御分子の開発を行い、認知症の予防・治療の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)BBBのタイトジャンクションを構成する主要分子であるCLDN-5について、CLDN-5の細胞内及び細胞外を認識する抗体を用いた血中濃度測定系を構築した。構築した測定系を用いて、各種疾患由来血漿中のCLDN-5量を測定した。得られた結果を基に、認知症と血中CLDN-5量との関係について考察した。

(2)脳への薬物送達技術として、BBBの主要構成因子であるCLDN-5に対する抗体を用いることとした。カニクイザルに抗CLDN-5抗体を投与した後に、モデル化合物としてフルオレセインを投与した。脳への移行性は、脳脊髄液中の蛍光量を定量することで評価した。

(3)PPAR α の活性化分子のスクリーニングには、テトラサイクリンの有無でPPAR α の発現を制御でき、かつPPAR α の認識配列をエンハンサーとして持つレポーター遺伝子を組み込んだ独自のスクリーニング細胞株を用いた(Tachibana et al. JBC, 2018)。約500種類の植物抽出エキス等を用いて、PPAR α を活性化する成分の探索を行った。また、申請者らが見出したピラゾロピリジン骨格を持つ独自PPAR α リガンドについて(Bioorg Med Chem Lett, 2019, Sci Rep, 2020)、PPAR α のリガンド結合領域、及びPPAR α のコアクチベーターであるPGC1 α 由来ペプチドを用いて、シッティングドロップ蒸気拡散法により共結晶化を行った。得られた結晶のX線解析データをSPRing-8にて取得し、立体構造を解析すると共に、新たな化合物をデザインし合成展開を実施した。合成した化合物を用いてin vitroで活性評価を行い、EC50を算出した。強い活性を持つ化合物については、in vivoでの脂質代謝活性を評価すると共に、脳への移行性について検討した。

4. 研究成果

(1)認知症の約6割を占めるアルツハイマー病では、BBBが破綻してアルブミンが脳内に流入していることが知られている。一方、多発性硬化症ではBBBの破綻に伴い、BBBの構成タンパク

質である CLDN-5 が血中に漏出することが知られている。これらのことから、血中の CLDN-5 が認知症のバイオマーカーになる可能性が推察された。そこで、CLDN-5 の細胞内及び細胞外領域を認識する抗体を用いて、サンドイッチ ELISA による CLDN-5 定量系を構築した。構築した定量系を用いて、50～80 歳台の認知機能正常者、MCI、アルツハイマー病患者 (AD) 由来血漿中の CLDN-5 量を測定した。その結果、興味深いことに、50 歳台及び 60 歳台では認知機能正常者に比較し、軽度認知障害やアルツハイマー病由来サンプルで血漿中 CLDN-5 量が増加する傾向が認められ、その傾向は年齢が若いほど顕著であった (図 1)。すなわち、血中 CLDN-5 量は早期かつ軽度の認知症のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

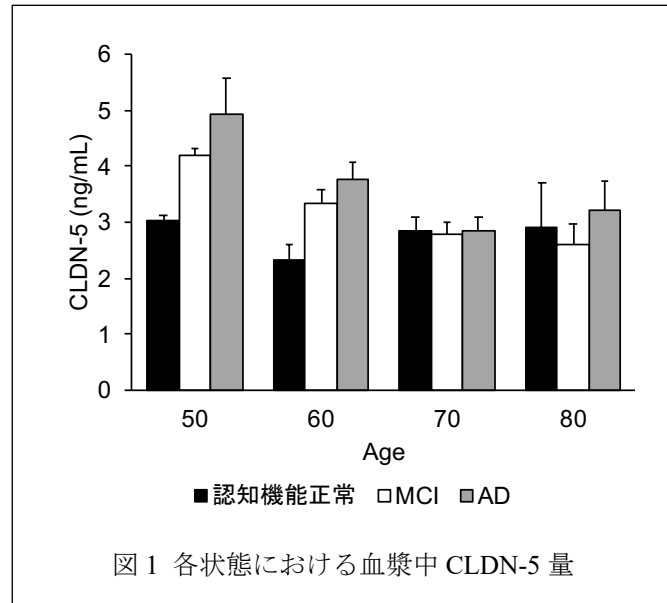


図 1 各状態における血漿中 CLDN-5 量

このように本研究で得られた成果は、BBB 構成タンパク質が認知症の早期 (未病) バイオマーカーになる可能性を示唆するものと考えられる。本バイオマーカーを活用することで未病の人をスクリーニングできる診断技術の開発に繋がるため、先制医療・予防による認知症の克服が期待できる社会的に重要な研究成果である。

(2) スタチン等の血中脂質低下薬が認知症発症率を低下させることなどが報告されているが、脳の毛細血管では隣接する血管内皮細胞の間隙を埋めるタイトジャンクションが発達して BBB を形成しており、医薬品等の脳内への移行率は悪い。BBB のタイトジャンクションの主要な構成因子が CLDN-5 であり、CLDN-5 のシールド機能を阻害することで、有効かつ安全な脳内薬物送達が可能になると考えた。そこでまず、CLDN-5 の細胞外領域を認識する抗体を用いて、培養細胞に処理したときのバリア機能を評価した。その結果、用いた抗体がカニクイザルの CLDN-5 に結合しバリア機能を低下させること、抗体を培地中から除去することでバリア機能が回復することが確認できた (図 2)。

次に、抗 CLDN-5 抗体を用いた薬物送達技術の有効性及び安全性を評価することとした。カニクイザルに抗 CLDN-5 抗体を投与した後に、トレーサー分子として 376 Da の蛍光分子を投与したところ、脳脊髄液中の蛍光分子量は増加傾向にあった (図 2)。この時、一般状態および血液生化学的検査において、抗 CLDN-5 抗体投与前後に大きな変化は認められなかったことから、この投与量での安全性には問題がないと考えられた。一方、高用量で抗 CLDN-5 抗体を投与した場合、投与 16 時間後に脳圧亢進によると考えられる痙攣が認められた。

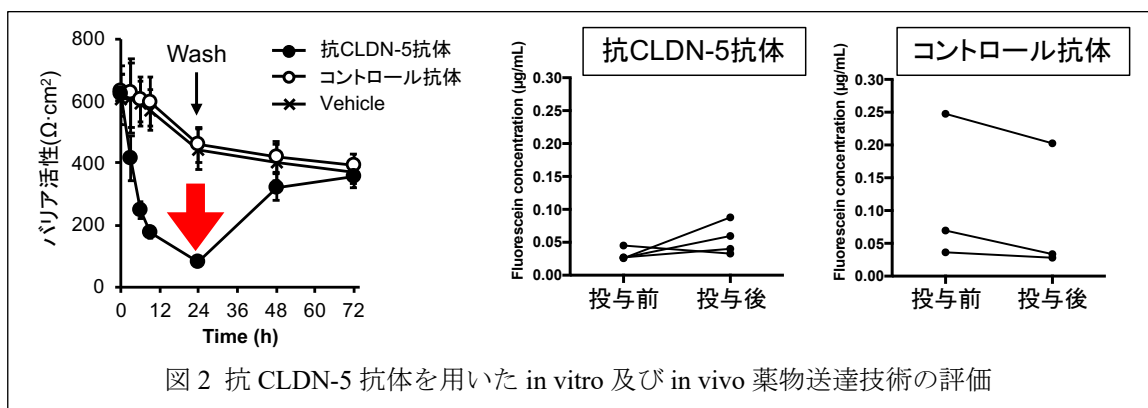
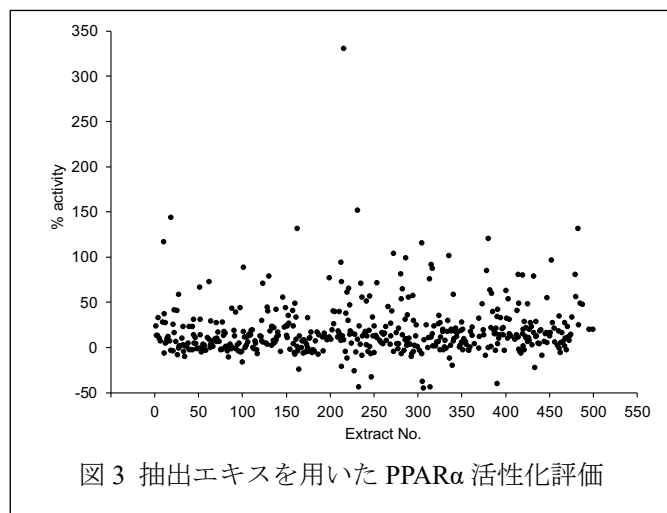


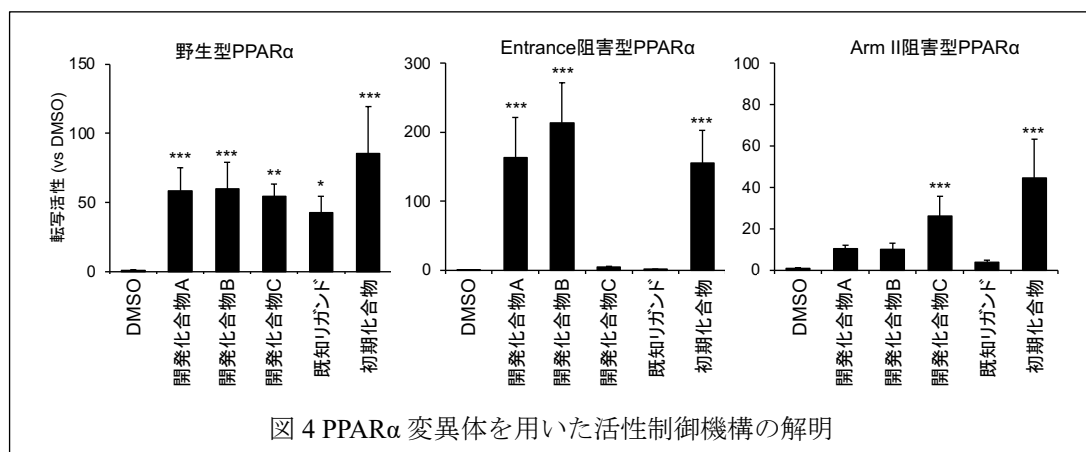
図 2 抗 CLDN-5 抗体を用いた in vitro 及び in vivo 薬物送達技術の評価

本研究の結果、CLDN-5 を標的とすることで、安全性には課題が認められたものの、低分子の脳内薬物送達技術の有効性が確認できた。今後、CLDN-5 を標的とした BBB 送達技術を開発する上では、有効性と安全性のバランスを考慮し、広い安全域を確保することが重要になってくると考えられた。

(3) 認知症の前段階では、未病の状態 (MCI) から認知機能正常なレベルに回復する報告例があり、ウォーキングなどの運動や n-3 系脂肪酸の一種ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などを含む食事療法による予防効果が期待されている。これら EPA や DHA をはじめとする不飽和脂肪酸は、PPAR α のリガンドとして報告されており、PPAR α を活性化することで、認知症の予防・治療が可能になると考えられた。そこで、認知症の予防・治療に向けた PPAR α の活性制御分子を得るために、独自の PPAR α 活性評価系を用いて、約 500 種類の抽出エキスをスクリーニングした。その結果、活性を示す抽出エキスが 4 種類得られた (図 3)。そのうち 2 種類の抽出エキスには濃度依存的な活性化効果が認められ、その中でも蒲黄 (ホオウ) 抽出エキスは PPAR α 特異的な活性化効果を示した。興味深いことに、ホオウ抽出エキスを緑茶抽出エキスと組み合わせることで、PPAR α の活性化効果が増強した。本抽出エキスを培養細胞に添加したところ、実際に PPAR α 標的遺伝子の発現上昇が誘導されたことから、生体内においても薬効を発揮することが期待される。



次に、申請者らが見出したピラゾロピリジン骨格を持つ新規 PPAR α リガンドを出発物質として用いて、より強力な活性を持つ化合物の開発を進めた。当該化合物と PPAR α のリガンド結合領域との立体構造解析の結果を基に、新規化合物を約 150 種類デザイン・合成した。これら化合物について、*in vitro* における PPAR α 転写活性を評価した結果、EC₅₀ が 2.10 nM の化合物をはじめ、約 20 種類の化合物が数 nM オーダーの非常に強い活性を有していた。これら活性の強い化合物について、PPAR α のリガンド結合領域との立体構造解析及び変異体を用いた活性評価実験を実施した。興味深いことに、初期開発化合物は Y 字型のリガンド結合ポケット (Arm I, Arm II, Entrance) のうち Arm I のみと相互作用して活性化したが、高度化した化合物は Arm I と Arm II に跨って相互作用、あるいは Arm I と Entrance に跨って相互作用しており、それぞれ異なる分子メカニズムで活性を制御することが明らかとなった (図 4)。なお、これまでの既存のリガンドは Arm I と Arm II に作用して活性化する化合物がほとんどであり、Entrance に作用して強い活性を示すリガンドは本研究にて初めて得られたものである。



これら高活性の化合物について、*in vivo*における薬効評価試験を実施したところ、脂質代謝に関わる遺伝子群の発現上昇が認められ、実際に脂質代謝活性の上昇が認められた(図5)。また、少ないものの脳中で化合物が検出されたことから、開発した化合物は脳へ移行する可能性が示唆された。

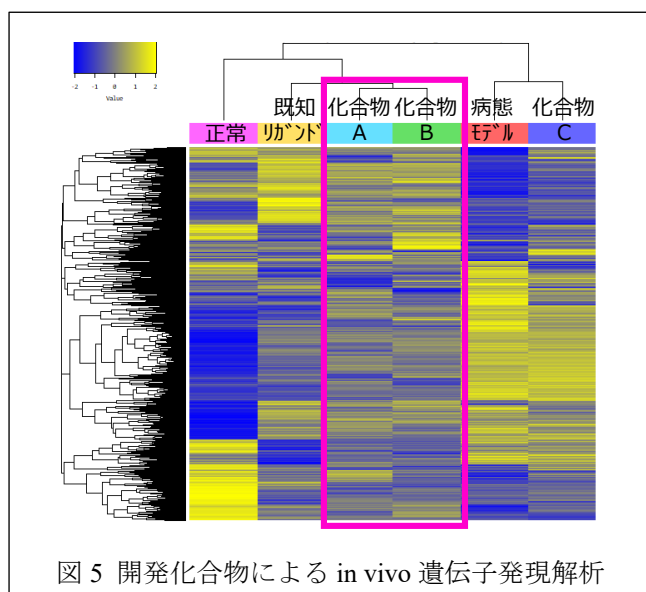


図5 開発化合物による *in vivo* 遺伝子発現解析

このように本研究で得られた成果は、核内受容体リガンドの分子設計について新しい知見を与えるものであり、新規リガンド創製技術の基盤となり得る。また、活性の認められた抽出エキスや開発した化合物を活用することで、認知症等に対して予防効果や薬効を発揮する機能性食品や医薬品等の開発に繋がると考えられるため、本研究成果は学術的にも人類の健康にも貢献する非常に有意義なものである。

以上、本研究で得られた成果は、認知症の新規予防・治療法の基盤構築に繋がる意義深いものである。これら得られた成果を活用することで、認知症の未病・早期の網羅的スクリーニングが実施可能になり、認知症が発症する前の神経細胞が十分に残存している状況で投薬を開始することで、尊厳を保った状態で健やかに暮らす健康長寿社会の実現に繋がることが期待される。

<引用文献>

1. Tachibana, K., Yuzuriha, T., Tabata, R., Fukuda, S., Maegawa, T., Takahashi, R., Tanimoto, K., Tsujino, H., Nunomura, K., Lin, B., Matsuura, Y., Tanaka, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., Kobayashi, T., Ishimoto, K., Miyachi, H., Doi, T., 2018. Discovery of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) activators with a ligand-screening system using a human PPAR α -expressing cell line. *J Biol Chem* **293**, 10333–10343. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002077>
2. Miyachi, H., Yuzuriha, T., Tabata, R., Fukuda, S., Nunomura, K., Lin, B., Kobayashi, T., Ishimoto, K., Doi, T., Tachibana, K., 2019. Structural development of 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine-4-carboxylic acid derivatives as human peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)-selective agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 2124–2128. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2019.06.062>
3. Yoshida, T., Oki, H., Doi, M., Fukuda, S., Yuzuriha, T., Tabata, R., Ishimoto, K., Kawahara, K., Ohkubo, T., Miyachi, H., Doi, T., Tachibana, K., 2020. Structural Basis for PPAR α Activation by 1H-pyrazolo-[3,4-b]pyridine Derivatives. *Sci Rep* **10**, 7623. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64527-x>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tachibana Keisuke, Fukuda Syohei, Fukushima Jun, Ishimoto Kenji, Sakata Masahiro, Nishimori Yasutomo, Doi Takefumi	4. 巻 44
2. 論文標題 Exploring compounds to be used as cosmetic agents that activate peroxisome proliferator activated receptor alpha	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Cosmetic Science	6. 最初と最後の頁 189 ~ 200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ics.12767	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 Tachibana Keisuke, Hashimoto Yosuke, Shirakura Keisuke, Okada Yoshiaki, Hirayama Ryuichi, Iwashita Yumi, Nishino Itsuki, Ago Yukio, Takeda Hiroyuki, Kuniyasu Hiroki, Kondoh Masuo	4. 巻 336
2. 論文標題 Safety and efficacy of an anti-claudin-5 monoclonal antibody to increase blood-brain barrier permeability for drug delivery to the brain in a non-human primate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 105 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2021.06.009	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 Tachibana Keisuke, Hirayama Ryuichi, Sato Naoyuki, Hattori Kotaro, Kato Takashi, Takeda Hiroyuki, Kondoh Masuo	4. 巻 25
2. 論文標題 Association of Plasma Claudin-5 with Age and Alzheimer Disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms25031419	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14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉村 早耶香、橘 敬祐、近藤 昌夫
2. 発表標題 吸収促進剤のレギュラトリーサイエンス研究-細胞間隙作用性吸収促進剤の薬事上の論点整理-
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西野 樹、橘 敬祐、橋本 洋祐、岩下 有美、白倉 圭祐、岡田 欣晃、竹田 浩之、國安 弘基、近藤 昌夫
2. 発表標題 カニクイザルを用いたClaudin-5指向性血液脳関門制御技術の有効性及び安全性評価
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若山 英里香、葛生 泰己、橘 敬祐、平山 龍一、岡田 欣晃、近藤 昌夫
2. 発表標題 Claudin-5を標的とした脳内薬物送達技術における有効性と安全性の検討
3. 学会等名 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葛生 泰己、橋本 洋祐、若山 英里香、西野 樹、橘 敬祐、岡田 欣晃、近藤 昌夫
2. 発表標題 Claudin-5を標的とした血液脳関門制御技術の安全性・有効性評価～カニクイザルを用いた解析～
3. 学会等名 第12回レギュラトリーサイエンス学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳良 真、橘 敬祐、Mian Wu、鎌田 祥太郎、石井 功、尾谷 優子、大和田 智彦
2. 発表標題 脂肪酸EPAの立体配座を制御したPPAR アゴニストの創製
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Taiki Kuzu, Yosuke Hashimoto, Erika Wakayama, Itsuki Nishino, Keisuke Tachibana, Yoshiaki Okada, Yasushi Fujio, Ryuichi Hirayama, Hiroki Kuniyasu, Masuo Kondoh
2. 発表標題 Safety assessment of modifying the blood-brain barrier by targeting claudin-5 in a cynomolgus monkey model
3. 学会等名 SOT 62nd Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西鍛冶 大樹, 若山 英里香, 橘 敬祐, 近藤 昌夫
2. 発表標題 認知症治療薬の現状及び臨床開発における課題に関する論点整理
3. 学会等名 第11回レギュラトリーサイエンス学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩下 有美, 橘 敬祐, 西野 樹, 近藤 昌夫
2. 発表標題 脳部位特異的な薬物送達の安全性に関するレギュラトリーサイエンス 脳部位特異的なTJ構成タンパク質結合バイオプローブの作製
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉村 早耶香, 橘 敬祐, 近藤 昌夫
2. 発表標題 タイトジャンクション制御活性を有する作用点異なる機能性添加剤に関するレギュラトリーサイエンス研究
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉村 早耶香、橘 敬祐、近藤 昌夫
2. 発表標題 先端DDS技術のレギュラトリーサイエンス研究～細胞間隙作用性吸収促進剤の有効性・安全性解析～
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西野 樹、橘 敬祐、橋本 洋祐、岩下 有美、白倉 圭祐、岡田 欣晃、竹田 浩之、國安 弘基、近藤 昌夫
2. 発表標題 先端DDS技術のレギュラトリーサイエンス研究～非ヒト霊長類を用いたClaudin-5指向性血液脳関門制御技術の有効性及び安全性評価～
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉村 早耶香、橘 敬祐、近藤 昌夫
2. 発表標題 Tight junction作用性レギュラトリーサイエンスプローブを用いた細胞間隙作用性吸収促進剤の特性評価
3. 学会等名 第44回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 崎村 柊子、杉村 早耶香、白 霖、橘 敬祐、近藤 昌夫
2. 発表標題 第一世代と第二世代タイトジャンクションモジュレーターのパリア制御活性の比較解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 塚井 彩夏、橘 敬祐、平山 龍一、近藤 昌夫
2. 発表標題 非アルツハイマー病疾患におけるアルツハイマー病バイオマーカー (p-Tau-181) 解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 P P A R 活性化剤	発明者 土井健史、橘敬祐、 福田昭平、福島純、 阪田昌弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-162499	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 P P A R 転写活性化剤およびその医薬用途	発明者 土井健史、橘敬祐、 赤井周司、吉田卓 也、布村一人、辻川	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/022719	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	吉田 卓也 (YOSHIDA TAKUYA) (00294116)	大阪大学・大学院薬学研究科・准教授 (14401)	
研究 分 担 者	石本 憲司 (KENJI ISHIMOTO) (00572984)	大阪大学・大学院薬学研究科・招へい教員 (14401)	

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