

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790090

研究課題名（和文）ミクログリアのニコチン性受容体を標的とした新規アルツハイマー病治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease targeting on nicotinic acetylcholine receptors on microglia

研究代表者

高田 和幸（TAKATA KAZUYUKI）

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：10434664

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病治療薬のガランタミンには、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用の他にニコチン受容体の増強作用がある。本研究では、ガランタミンがミクログリアのニコチン受容体を刺激してミクログリアの貪食機能を促進し、アルツハイマー病の原因物質と考えられるアミロイドβタンパク質の脳内除去にも効果があることを見出した。さらには、骨髄細胞からミクログリア様のアミロイドβタンパク質貪食細胞の分化誘導に成功した。

研究成果の概要（英文）：Galantamine is an acetylcholinesterase inhibitor approved for symptomatic treatment of Alzheimer's disease. Galantamine also acts as an allosterically potentiating ligand for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). In this study, we demonstrated that galantamine stimulates nAChRs on microglia and promotes microglial phagocytic ability. This effect resulted in the reduction of amyloid-β burden in the brain which is thought to be a primary pathological event in the development of Alzheimer's disease. We further successfully differentiated bone-marrow cells to the microglia-like amyloid-β phagocytic cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病、アミロイドβ、ミクログリア、ニコチン性アセチルコリン受容体、貪食、ガランタミン、アロステリック活性化リガンド、骨髄細胞

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病（AD）は老化とともに発症頻度が著しく高まる進行性の認知機能障害である。世界一の少子高齢化社会である日本では、ADは深刻な社会問題であり、より効果的治療法の早急な開発が熱望されている。AD脳ではアミロイドβ（Aβ）が細胞外で蓄積す

るが、このAβの異常蓄積はAD病態形成に深く関与していることが予想されており、その脳内からの除去はADの根本的治療法の開発に繋がることが期待されている。

一方、脳構成細胞の一つであるミクログリアは代償性のAβ貪食機能を有しており、この貪食機能の促進的制御が脳内Aβ除去の

有効な手段として期待されている。近年、ミクログリアにもニコチン性アセチルコリン受容体（ニコチン受容体）が発現していることが明らかとなり、ミクログリアの機能調節に働くことが明らかとなりつつある。

ガラタミンは中枢移行性のアセチルコリンエステラーゼ阻害薬であり、2011年より日本でも臨床使用が開始されたアルツハイマー病治療薬である。ガラタミンはニコチン受容体のアロステリック活性化リガンド（APL）であり、ニコチン受容体の増強作用を有することも知られている。

2. 研究の目的

本研究では、ミクログリアに発現するニコチン受容体をニコチンやガラタミンといった薬物により直接またはアロステリックに刺激することで、 $A\beta$ 食量に対する促進的作用およびそのメカニズムを解析し、さらには、*in vivo* 脳での $A\beta$ クリアランスに対する有効性を評価する。つまり本研究の目的は、AD 治療薬開発における新規ターゲット分子としてミクログリアのニコチン受容体を提唱し、ユニークかつ効果的な新規 AD 治療戦略を開発することである。

3. 研究の方法

(1) ニコチン受容体の発現

①ヒト剖検脳組織：インフォームドコンセントおよび倫理委員会の審査・許可を得たヒト AD 患者（67 歳）剖検脳の脳組織を使用した。

②ラット初代培養ミクログリア：ラット初代培養ミクログリアを新生仔ラットより調製し、37°C、5% CO₂、95% 空気の環境に設定された CO₂ インキュベーター内で培養・維持した。

③免疫組織学的解析：ヒト剖検脳組織およびラットミクログリアに、抗 $A\beta$ 抗体、抗 ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) 抗体（ミクログリアマーカー）、抗ニコチン受容体 ($\alpha 7$ サブユニット) 抗体、FK1 抗体 (APL 結合部位マーカー) や FSB ($A\beta$ 蓄積部位マーカー)、ローダミン結合ファロイジン（アクチン骨格マーカー）、ヘキスト（核マーカー）といった蛍光化学物質を用いて共焦点レーザー顕微鏡による解析を行った。

④RT-PCR：ラットミクログリアの RNA を抽出し、ニコチン受容体 ($\alpha 7$ サブユニット) の発現について、プライマー (forward, 5'-TTT CTG CGC ATG AAG AGG CCC GGA GAT-3' および reverse, 5'-ACC TCC TCC AGG ATC TT-3') を設計して解析した。

⑤Western blotting：ラットミクログリアのホモジネートを調製してニコチン受容体 ($\alpha 7$

サブユニット) の発現を解析した。

(2) ラットミクログリアのニコチン受容体刺激による $A\beta$ 食量機能の解析

①食量機能の解析：ラットミクログリアにニコチンやガラタミンの存在下において $A\beta 1-42$ を処置し、共焦点レーザー顕微鏡や ELISA を用いて $A\beta$ 食量の変化を解析した。

②ニコチン受容体阻害薬を用いた解析：ラットミクログリアに mecamylamine (Mec：非選択的ニコチン受容体阻害薬)、methyllycaconitine (MLA： $\alpha 7$ サブユニット特異的ニコチン受容体阻害薬) や atropine (Atr：ムスカリン受容体阻害薬) を前処置後、ニコチンやガラタミンの存在下において $A\beta$ を処置し、 $A\beta$ 食量の変化に対するニコチン受容体やムスカリン受容体の関与について解析した。

③APL 結合部位阻害抗体を用いた解析：ラットミクログリアに APL 結合部位阻害抗体 (FK1) を前処置後、ニコチンやガラタミンの存在下において $A\beta$ を処置し、 $A\beta$ 食量の変化に対するニコチン受容体の APL 結合部位の関与について解析した。

(3) ニコチン受容体刺激による $A\beta$ 食量促進作用のメカニズムの解析

①細胞外カルシウムの影響：ラットミクログリアにカルシウム感受性の蛍光試薬である Fluo 4 を前処置して、ニコチンやガラタミンの処置による細胞内へのカルシウムの流入について解析した。また、細胞外カルシウムを除去した培養液を用いて、ニコチンやガラタミンの処置による $A\beta$ 食量促進への関与を解析した。

②細胞内シグナル分子の解析：ラットミクログリアに W-7 (カルモジュリン阻害剤)、KN93 (カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素阻害剤)、Toxin B や NSC23766 (いずれも Rac1 阻害剤) を前処置してカルシウムにより活性化される分子の関与を解析した。

(4) ガラタミンの長期投与による記憶機能や脳内 $A\beta$ 量の解析

脳内に $A\beta$ が蓄積する AD モデル動物としてヒト変異型の amyloid precursor protein 遺伝子とヒト変異型 presenilin 1 遺伝子を導入した APdE9 マウスを用い、ガラタミンを 56 日間経口投与した。その後モリス水迷路により記憶・学習に対する作用を解析し、さらに脳内 $A\beta$ 量を測定した。

(5) 骨髄細胞からミクログリア様 Aβ 貪食細胞への分化誘導

市販のヒト骨髄細胞に高濃度のヒト由来 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) を処置し、増殖する細胞数ならびに Aβ 貪食機能を解析した。

4. 研究成果

(1) ニコチン受容体の発現

①AD 患者剖検脳組織を用いた解析

AD 患者剖検脳の Aβ 蓄積部位 (青) にはミクログリア (赤) が集積しており、集積するミクログリアにはニコチン受容体 (α7 サブユニット: 緑) が発現していた (矢印) (図 1)。

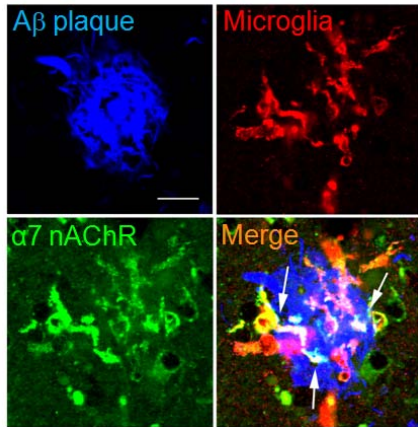
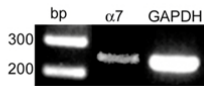


図 1 共焦点レーザー顕微鏡による解析

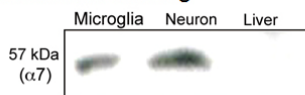
②ラットミクログリアを用いた解析

ラットミクログリアにはニコチン受容体 (α7 サブユニット) の mRNA が発現しており、ラットの神経細胞 (ポジティブコントロール) や肝臓 (ネガティブコントロール) を用いて Western blotting による解析を実施したところタンパク質レベルでの発現も確認できた。また、免疫組織学的解析により、アクチン骨格 (赤) で示される細胞表面にニコチン受容体 (緑) が発現していることが明らかとなった (図 2)。

RT-PCR



Western Blotting



免疫組織学的解析

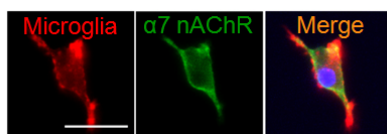


図 2 RT-PCR、Western blotting、免疫組織化学的手法を用いた解析

(2) ラットミクログリアのニコチン受容体刺激による Aβ 貪食機能の解析

①ニコチンやガラタミン処置による Aβ 貪食機能の促進

ラットミクログリアにニコチンやガラタミンの存在下において Aβ1-42 を処置したところ、ミクログリアの Aβ 貪食機能が促進した (図 3)。

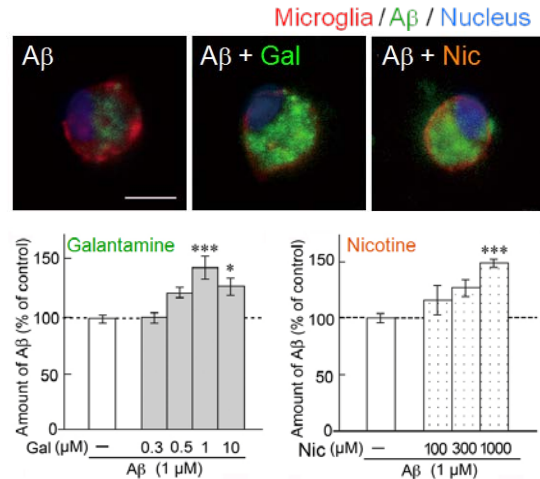


図 3 共焦点レーザー顕微鏡および ELISA による解析

②ニコチン受容体阻害薬を用いた解析

ラットミクログリアに mecamylamine (Mec : 非選択的ニコチン受容体阻害薬) や methyllycaconitine (MLA : α7 サブユニット特異的ニコチン受容体阻害薬) を前処置したところ、ニコチンやガラタミンにより誘導される Aβ 貪食促進が阻害された。一方、atropine (Atr : ムスカリン受容体阻害薬) の前処置では影響がなかった (図 4)。このことから、ニコチンやガラタミンはミクログリアのニコチン受容体を介してミクログリアの Aβ 貪食機能を促進することが明らかとなった。

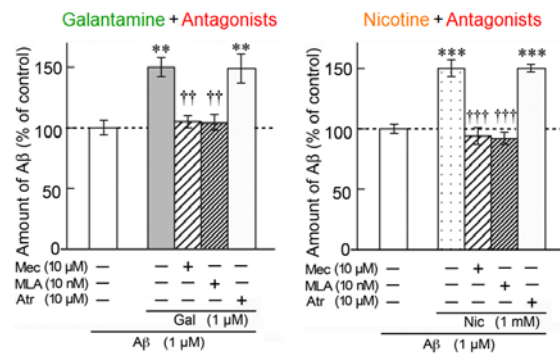


図 4 ニコチン受容体やムスカリン受容体阻害薬のミクログリア Aβ 貪食機能への影響

③ APL 結合部位の発現と APL 結合部位阻害抗体 (FK1) の作用

AD 患者剖検脳の Aβ 蓄積部位 (青) にはミクログリア (赤) が集積しており、集積するミクログリアには FK1 抗体で認識されるニコチン受容体の APL 結合部位が発現していることが明らかとなった (図 5)。

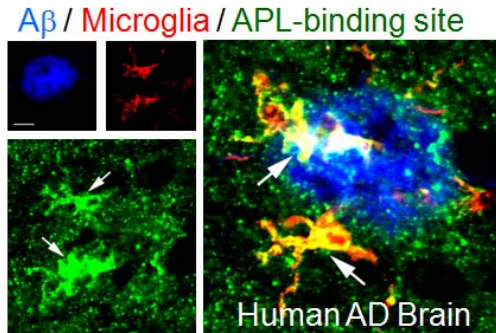


図 5 共焦点レーザー顕微鏡による解析

また、ラットミクログリアに APL 結合部位阻害抗体 (FK1) を前処置したところ、ニコチンの Aβ 食食促進作用には影響しなかったが、ガラントミンの Aβ 食食促進作用は阻害された。つまり、ガラントミンはミクログリアのニコチン受容体における APL 結合部位に作用して、食食機能を促進することがわかった (図 6)。

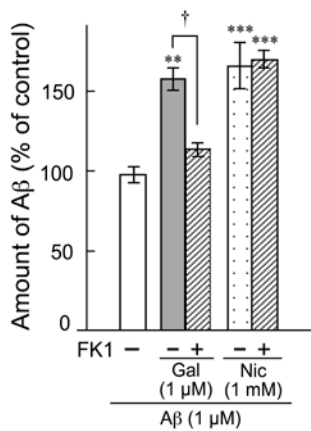


図 6 APL 結合部位阻害抗体 (FK1) のミクログリア Aβ 食食機能への作用

(3) ニコチン受容体刺激による Aβ 食食促進作用のメカニズムの解析

① 細胞外カルシウムの影響

ラットミクログリアにカルシウム感受性の蛍光試薬である Fluo 4 を前処置して、細胞内へのカルシウムの流入について解析したところニコチンやガラントミン処置によりカルシウムが細胞内へ流入することがわかった (図 7)。

また、細胞外カルシウムを除去してニコチンやガラントミンを処置しても、Aβ 食食促進が誘導されないことがわかり、細胞外のカル

シウム流入が、ミクログリアの Aβ 食食促進に深く関与することがわかった (図 8)。

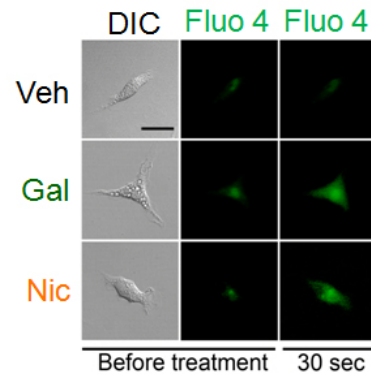


図 7 Fluo 4 を用いたカルシウム流入解析

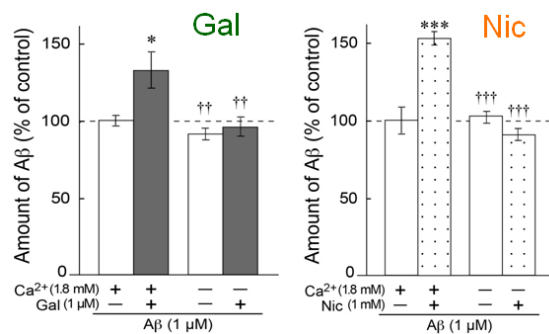
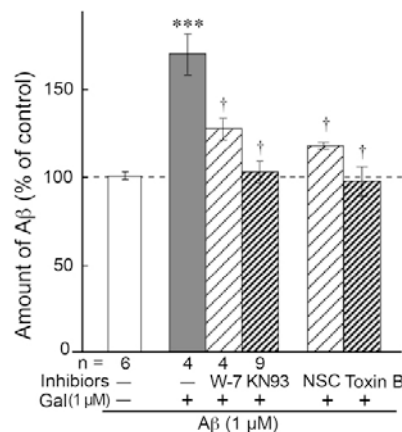


図 8 ミクログリア Aβ 食食機能促進における細胞外カルシウムの影響

② 細胞内シグナル分子の解析

ラットミクログリアに W-7 (カルモジュリン阻害剤)、KN93 (カルシウム/カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素阻害剤)、Toxin B や NSC23766 (いずれも Rac1 阻害時) を前処置したところ、それぞれの阻害剤により、ガラントミンによる食食促進が誘導されず、ミクログリアの Aβ 食食促進に深く関与することがわかった (図 9)。また、これらの分子はアクチン骨格の再構築にかかわる分子であり、アクチン骨格の再構築が促進される結果 Aβ 食食が促進されることが示唆された (図 10)。



以上の結果より、ミクログリアに発現するニコチン受容体が AD の根本的治療を目指した創薬ターゲットとなり得ることが期待される。また、骨髄細胞を M-CSF で処置するとミクログリア様の A β 貪食細胞に分化誘導できることがわかり、AD に対する細胞療法開発の可能性が示唆された。

おわりに

本研究を遂行するにあたり、多くの研究者および大学院生・学部生のご協力を頂きました。心より感謝の意を表します。

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 3 件)

(1) Kazuyuki Takata and Yoshihisa Kitamura: Molecular approaches to the treatment, prophylaxis, and diagnosis of Alzheimer's disease: tangle formation, amyloid- β , and microglia in Alzheimer's disease. *J. Pharmacol Sci.* 査読有 **188**, 338-344 (2012).

(2) Kazuyuki Takata, Tetsuya Takada, Hironori Tatsuda, Tomomi Tsuruno, Kaneyasu Nishimura, Shun Shimohama, and Yoshihisa Kitamura: Preparation and characterization of microglia-like cells derived from rat, mouse, and human bone marrow cells for therapeutic strategy of Alzheimer's disease. *J. Addict. Res. Ther.* 査読有 **S5:001**, 1-5 (2011). doi:10.4172/2155-6105.S5-001.

(3) Kazuyuki Takata, Yoshihisa Kitamura, Mana Saeki, Maki Terada, Sachiko Kagitani, Risa Kitamura, Yasuhiro Fujikawa, Alfred Maelicke, Hidekazu Tomimoto, Takashi Taniguchi, and Shun Shimohama: Galantamine-induced amyloid- β clearance mediated via stimulation of microglial nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 査読有 **285**, 40180-40191 (2010).

[学会発表] (計 3 件)

(1) Kazuyuki Takata and Yoshihisa Kitamura: Translational research on compensatory microglial function for therapeutic strategy of Alzheimer's disease. 第 5 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2011 年 11 月 27 日, 名古屋大学医学部附属病院 (愛知県)

(2) 高田和幸, 北村佳久, 谷口隆之: ガランタミンによるミクログリアのアミロイド β 貪食促進作用. 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 30 日, ツインメッセ静岡 (静岡県)

(3) 高田和幸, 北村佳久, 下濱 俊, 谷口隆之: ニコチン性アセチルコリン受容体のアロステリック制御によるミクログリアのアミロイド β 貪食促進作用の解析. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 23 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 1 件)

Kazuyuki Takata and Yoshihisa Kitamura: Chapter 8: Microglial functions against amyloid- β accumulation in brains of Alzheimer's disease. *Microglia: Biology, Functions and Roles in Disease*, Edited by Charanjit Kaur and Ling Eng-Ang, NOVA Science Publishers, in press (2012).

[その他]

(1) アルツハイマー治療薬に新たな働き アミロイド β タータ除去. *京都新聞*, 2010 年 12 月 21 日.

(2) ガランタミンの新たな作用機序を発見 ミクログリアによる A β 除去を促進. *薬事日報*, 2010 年 11 月 17 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 和幸 (TAKATA KAZUYUKI)
京都薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 10434664

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

谷口 隆之 (京都薬科大学・教授)
下濱 俊 (札幌医科大学・教授)
富本 秀和 (三重大学・教授)
北村 佳久 (京都薬科大学・准教授)
西村 周泰 (CiRA・研究員)
Alfred Maelicke (Galantos Pharma CSO)
佐伯 真菜 (京都薬科大学・大学院生)
寺田 真希 (京都薬科大学・大学院生)
鍵谷 沙智子 (京都薬科大学・大学院生)
北村 理紗 (京都薬科大学・大学院生)
辰田 博則 (京都薬科大学・大学院生)
高田 哲也 (京都薬科大学・学部生)
藤川 靖浩 (京都薬科大学・学部生)
鶴野 友美 (京都薬科大学・学部生)