

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 26 年 7 月 14 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23790133
 研究課題名（和文）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
 研究課題名（英文）Selective activation of anti-inflammatory type 2 microglia as a strategy for treatment of Alzheimer's disease
 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）：

本研究では、アルツハイマー病 (AD) の新しい治療方策として、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。特に、T 細胞系において IL-4 を誘導することが知られる合成レチノイドに注目した。(1) ある種のレチノイド類を AD モデルの APP23 マウスへ経口投与すると、vehicle 群と比較しレチノイド投与群において、脳内不溶性画分の A β ペプチド量が有意に減少し、空間認知障害が有意に改善された。(2) レチノイド投与により、APP23 マウスの大脳皮質の IL-4 量は変動しなかったが、海馬 IL-4 量は増加傾向にあった。また、vehicle 群とは対照的に、レチノイド投与群において、海馬 IL-4 量と空間記憶保持力とは有意な正の相関を示した。(3) *in vitro* において、レチノイド添加はミクログリア細胞の IL-4 受容体 α の発現を増大させた。本研究成果は、レチノイドによる 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）：

In this study, we tried to develop seeds that stimulate the neuro-protective activities of anti-inflammatory type 2 microglia as a new strategy for treatment of Alzheimer's disease. We focused on synthetic retinoids, because they have reported to increase IL-4 production in T-cell system. (1) Administration of the retinoids significantly improved memory deficits in APP23 mice and reduced levels of insoluble A β peptide in the brain. (2) IL-4 level in the hippocampus, not in the cerebral cortex, tended to increase in retinoids-treated group compared with vehicle-treated one. In addition, improvement of memory in APP23 mice after retinoid treatment was related to the IL-4 level in the hippocampus. (3) *In vitro*, IL-4R α was increased in murine microglial MG5 cells co-stimulated with retinoids. These findings provide information about the therapeutic potential of these agents for AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、 β アミロイドペプチド、記憶改善、レチノイド、インターロイキン 4、ミクログリア

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 (ドネペジル等) 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。

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探索を行ってきた。

これまでの研究成果として、(1)抗炎症性サイトカインIL-4による2型ミクログリアのオリゴマー状A β クリアランスの選択的活性化を見出した(J. Immunol., 2008)。また、(2)上記(1)のA β クリアランス能が*in vivo*でも作動するかを、本病態モデルの一つAPP23マウスを用い、脳内にIL-4/IL-13を微量注入して調べた結果、A β 蓄積が有意に認められる4.5月齢では、蓄積A β の減少とそれに伴う記憶学習能の有意な改善を認めることができた(Neuroscience, 2012)。

「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ためには、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、レチノイン酸受容体(RAR)アゴニスト・Am80(Tamibarotene)に注目し、Am80含有餌(0.5 mg/kg/d)を5月齢APP23マウスに14週間連日経口投与すると、脳内不溶性画分のA β_{42} ペプチドが有意に減少することを見出した(Biol. Pharm. Bull., 2009)。しかし、この実験では、モリス水迷路試験で評価されるAPP23マウスの空間認知障害は有意に改善されなかった。そのため、何らかの方法により、Am80のA β 減少作用を高める工夫が必要である。

RXRアゴニストは、単独ではHL-60細胞の好中球への分化を促すことはできないが、低濃度のAm80との共存下では、その分化誘導活性を劇的に増大させる。また、Am80単独投与と同様、RXRアゴニスト単独投与もまた、スコポラミンで誘導される記憶障害を改善するが、RXRアゴニストはAm80の記憶改善作用を協調的に高める。ごく最近、Cramerら[2012]は皮膚性T細胞リンパ腫の治療に用いられているRXR選択的アゴニストであるベキサロテン(LG1069, Targretin)がアポリポ蛋白E(ApoE)依存的なミクログリアのA β クリアランス活性を増大させ、APP/PS1マウスの記憶学習障害を改善させることを報告した。

2. 研究の目的

本研究では、合成レチノイドの経口投与が、APP23マウスのAD病態を改善するかどうかを調べた。また、レチノイド投与により、TBS

可溶性および不溶性のA β が変動するか調べた。さらにレチノイドの脳内IL-4量に及ぼす影響を調べた。

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(Matthias Staufenbiel博士より恵与)。レチノイド類は、首藤紘一博士、中込まどか博士より恵与して戴いた。レチノイド類を8.5月齢のAPP23マウスへ17日間連日経口投与した。投与開始後15日目から18日目にかけて、モリス水迷路試験(MWM)を行い、空間学習能力を評価した。行動実験終了後、脳を摘出し、A β ELISAを行うとともに、IL-4ELISAを行った。pGL3-RARE-lucを用いて、MG5ミクログリア細胞(高坂新一博士、大澤圭子博士より恵与)におけるRAREレポーター活性を調べた。抗IL-4R α 抗体を用いたWestern blot法により、IL-4R α の発現変動を調べた。

4. 研究成果

(1) 8.5月齢APP23マウスへのレチノイド経口投与は空間認知障害を改善させる

8.5月齢のAPP23マウスと同腹仔の野生型(WT)マウスに17日間レチノイド類を経口投与した。実験期間中にそれぞれのグループにおいて体重に変化は見られなかった。Vehicleを投与したAPP23マウスでは、WTマウスと比較してMWMにおける記憶学習能力の低下を示した。対照的に、APP23マウスにおいて、レチノイド投与群はvehicle投与群と比較し、有意に改善された。

Training trial後、プラットホームの位置の記憶保持を測定するprobe testを行った。APP23マウスにおいて、レチノイド投与群ではvehicle投与群と比較し、Target quadrant(Trained area)に滞在する時間が有意に長かった($P < 0.05$)。また、他のareaに滞在する時間に比べて有意にTrained areaに滞在する時間が長かった。Crossed count(ゴール横切り回数)ではレチノイド投与群はvehicle投与群と比較し、有意に回数が増加した($P < 0.05$)。以上のことから、8.5月齢APP23マウスにある種のレチノイド類を経口投与すると記憶認知障害が改善されることがわかった。

(2) APP23マウスへのレチノイド投与は脳内不溶性画分のA β_{40} とA β_{42} レベルを減少させる

8.5月齢のAPP23マウスの大脳ホモジネートを調製し、A β_{40} とA β_{42} のELISAを行った。その結果、TBS可溶性A β_{40} とA β_{42} は変化しなかったが、TBS不溶性A β_{40} とA β_{42} はレチ

ノイド投与群において有意に減少した ($P < 0.05$)。

このことから、レチノイドの経口投与は APP23 マウスにおいて脳内不溶性 A β レベルを減少させる作用を持つことが明らかとなった。

(3)レチノイド投与 APP23 マウスにおける記憶改善は海馬 IL-4 レベルと相関する

レチノイド投与により APP23 マウスの脳炎症が減少するかどうか調べるために、大脳皮質ならびに海馬における炎症性サイトカイン・IL-4 のレベルを調べた。レチノイド投与により大脳皮質の IL-4 レベルは変動しなかったが、APP23 マウスの海馬 IL-4 レベルはレチノイド投与により増大傾向にあった。また、レチノイド投与 APP23 マウスにおける海馬 IL-4 レベルは、モリス水迷路試験における記憶保持力と有意な正の相関を示した。これらの相関は、vehicle 投与群ではみられなかった。また、海馬における不溶性 A β ペプチドレベルも、レチノイド投与により減少した。

(4)レチノイドはマウスミクログリア細胞株 MG5 における IL-4R α 発現を相乗的に増大させる

レチノイドがミクログリアにおける IL-4 受容体 α (IL-4R α) の発現を増加させるかどうか調べるために、MG5 細胞を用いてそれらの化合物の効果調べた。レチノイドは、MG5 の IL-4R α 発現を有意に増大させた ($P < 0.05$)。MG5 細胞におけるレチノイン酸応答配列 (RARE) レポーター活性は、レチノイドにより著しく増大した (15.9 倍)。対照的に、レチノイドは、ネガティブコントロールである pGL3-luc ベクターのルシフェラーゼ活性には影響を与えなかった。これらの結果は、レチノイドで誘導される著しい RAR 活性は、MG5 細胞における IL-4R α 発現増大に関与するかもしれないことを示している。

以上の知見は、レチノイドによる 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。

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 2 件)

①Hiroshi Fukasawa, Madoka Nakagomi, Naoko Yamagata, Hiroshi Katsuki, Kohichi Kawahara, Kazuyoshi Kitaoka, Takami Miki, and Koichi Shudo. Tamibarotene: A candidate retinoid drug for Alzheimer's disease. *Biol. Pharm. Bull.* 査読(有), 35, 1206-1212 (2012)

②Kohichi Kawahara,* Michita Suenobu,* Akira Yoshida, Kiyohiro Koga, Atsushi Hyodo, Hideyuki Ohsuka, Akihiko Kuniyasu, Nobuaki Tamamaki, Yukihiko Sugimoto, and Hitoshi Nakayama. (*equal contribution) Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces β -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young amyloid precursor protein 23 mice. *Neuroscience* 査読(有), 207, 243-260 (2012)
<http://hdl.handle.net/2298/26643>

[学会発表] (計 13 件)

①末延道太, 4.5 月齢 APP23 マウスにおける IL-4/IL-13 の脳内微量注入は β アミロイド蓄積を減少させ、空間認知障害を改善する, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡市, 福岡国際会議場

②村木一徳, ミクログリア結合ペプチドの生細胞イメージングへの応用, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡市, 福岡国際会議場

③鈴木佑治, ミクログリアの IL-33 遺伝子発現に対するプロスタグランジン E2 の効果, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012 年 12 月 9 日, 熊本市, 熊本大学

④馬驍彦, Ca²⁺動員型プロスタグランジン受容体は着床時の embryo spacing に必須の役割を果たす, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012 年 12 月 9 日, 熊本市, 熊本大学

⑤北條寛典, プロスタグランジン EP4 受容体による視索前野ニューロンの細胞骨格制御, 第 29 回日本薬学会九州支部大会, 2012 年 12 月 9 日, 熊本市, 熊本大学

⑥北條寛典, プロスタグランジン EP4 受容体による視索前野ニューロンの細胞骨格制御, 第 65 回日本薬理学会西南部会, 2012 年 11 月 23 日, 熊本市, 熊本大学

⑦末延道太, IL-4/IL-13 の脳内微量注入は M2 様ミクログリアを誘導し、APP23 マウスにおける脳内 β アミロイド蓄積を減少させる, 第 11 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム, 2012 年 9 月 15 日, 福岡市, 九州大学

⑧末延道太, IL-4/IL-13 の脳内微量注入は M2 様ミクログリアを誘導し、APP23 マウスにおけるアルツハイマー病様の症状を軽減する, 第 28 回日本薬学会九州支部大会, 2011 年 12 月 10 日, 福岡市, 福岡大学

⑨ Kohichi Kawahara, Oral administration of a retinoic acid receptor agonist Am80 decreases brain β -amyloid peptides in Alzheimer's disease model mice, 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011.11.15, Washington Convention Center, Washington DC, USA.

⑩ 北條寛典, プロスタグランジン EP4 受容体による視索前野ニューロンの細胞骨格制御の分子機構, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都市, 京都国際会館

⑪ 末延道太, APP23 マウスにおける IL-4/IL-13 の脳内微量注入は, CD36 陽性 M2 様ミクログリアを誘導し, β アミロイド蓄積を減少させる, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都市, 京都国際会館

⑫ 川原浩一, 新たに見出した IL-4/IL-13 脳内投与による β アミロイド分解酵素誘導の分子機序の解析, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 京都市, 京都国際会館

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称: ラット I 型ミクログリアを特異的に認識するモノクローナル抗体

発明者: 川原浩一、中山 仁、倉津純一、中村英夫、築城裕正

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: 特許第 4 8 1 5 6 1 0 号

取得年月日: 2011 年 9 月 9 日

国内外の別: 国内

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