

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460150

研究課題名(和文) 2型ミクログリアの抗炎症/抗酸化/貪食作用を促進するアルツハイマー病治療法の開発

研究課題名(英文) Utilization of anti-inflammatory/anti-oxidative/phagocytic activities by type 2 microglia for an Alzheimer's disease therapy

研究代表者

川原 浩一 (Kohichi, Kawahara)

新潟薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10347015

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2型ミクログリアの抗炎症/抗酸化/貪食作用を促進する化合物の一つとして、まずレチノイドに注目した。レチノイン酸受容体作動薬(Am80, 0.5 mg/kg/day)とレチノイドX受容体作動薬(HX630, 5 mg/kg/day)の共投与(17日間経口投与)により、8.5月齢アルツハイマー病モデルマウス(APP23)の空間認知障害が有意に改善された。7残基のペプチドSxにより、ミクログリアの抗酸化酵素HO-1の発現が著明に増大した。炎症型ミクログリア(1型)を特異的に認識する抗体・9F5の抗原分子を同定し、その抗原分子のGFPノックインマウスを開発した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on retinoid as a compound to promote the anti-inflammatory, anti-oxidative, and phagocytic activities of type 2 microglia. Oral co-administration of Am80 (0.5 mg/kg) and HX630 (5 mg/kg) for 17 days significantly improved memory deficits (Morris water maze) in 8.5-month old APP23 mice. A heptapeptide Sx markedly induced the expression of heme oxygenase-1 in mouse microglia. The antigen molecule for 9F5, a monoclonal antibody that recognizes inflammatory type (type 1) of rat microglia, was identified, and the GFP knock-in mouse was also developed.

研究分野：神経化学

キーワード：アルツハイマー病 記憶改善 ミクログリア レチノイド Am80 HX630 ペプチド 9F5

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。

このような背景のもと我々は、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 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 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探索を行ってきた。

これまでの検討より、抗炎症性サイトカイン IL-4/IL-13 の脳内微量注入により、AD モデルマウス (APP23) の脳内 A 蓄積量が減少し、空間認知障害も有意に改善されることが明らかとなった (Neuroscience, 2012)。また、IL-4/IL-13 脳内微量注入により、CD36 陽性の M2 様 MG が出現したことから、*in vitro* と同様に *in vivo* でも IL-4/IL-13 のシグナル増強は抗炎症性の MG (2 型) を活性化すると考えられる。脳内での IL-4/IL-13 シグナルを増強する化合物候補として、モルヒネやカンナビノイドなども考えられるが、我々はレチノイドに興味を持って解析を進めている。

一方、動物細胞は酸化ストレスに曝された場合、Keap1-Nrf2 システムを活性化し、抗酸化酵素群や解毒酵素群を「誘導」することにより、ストレスを速やかに消去する。我々は内因性 Keap1-Nrf2 活性化剤である 15d-PG₂ で 1 型と 2 型 MG を処理すると、2 型でのみ CD36 が誘導されることを見出した。また、内因性 Keap1-Nrf2 活性化剤 (15d-PG₂, 8-nitro-cGMP) の産生を高める刺激 (低濃度のリポポリ多糖刺激) を行った場合でも、2 型でのみ CD36 が誘導される。このことから、酸化ストレスに曝された脳病態時において 2 型 MG は、1 型 MG に比べ抗酸化/食食作用が高いことが示唆された。

2. 研究の目的

この状況をふまえ、本研究では、「2 型 MG による神経保護作用」を AD の新規治療法にまで展開するために、2 型 MG の抗炎症/抗酸化/食食作用を促進する低分子化合物を探索し、有望な化合物については A 前駆体タンパク質変異トランスジェニックマウス (APP23) に投与し、治療効果を調べた。また、2 型 MG と機能的にも異なる 1 型 MG のマーカー分子 (9F5 抗原) の解析を進め、MG 亜種の機能分化の分子基盤とその成立の一端を解き明かすことも目的の一つとした。

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 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ご恵与いただいた。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 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 ELISA を行うとともに、IL-4 ELISA を行った。

マウス新生仔脳より混合グリア培養を行った。Nrf2 の標的遺伝子の一つである heme oxygenase-1 を指標として、Nrf-2 活性化剤を探索した。ペプチド合成は、外部委託し、フナコシ社より購入した。

1 型ミクログリア特異的抗体・9F5 (特許第 4815610) は、常法に従い、腹水より精製した。ラット 1 型ミクログリアの細胞抽出液を 9F5 により免疫沈降した後、SDS-PAGE を行い、目的のバンドを N 末端シークエンサーで解析した。9F5 抗原の GFP ノックインマウスは、国内の製薬企業と共同で開発した。

4. 研究成果

レチノイド化合物に関して以下の知見を得た。すなわち、(1)レチノイン酸受容体作動薬 (Am80, 0.5 mg/kg/day) とレチノイド X 受容体作動薬 (HX630, 5 mg/kg/day) の共投与 (17 日間経口投与) により、APP23 マウスの病態が著明に改善されることを見出した。それぞれの単独投与は無効であった。(2)Am80 と HX630 の共添加により、MG の IL-4 受容体の発現が増大し抗炎症性の 2 型へ性質が変化するとともに、その細胞によるオリゴマー状 A の除去活性も亢進した。(3)Am80 と HX630 の共投与により、記憶形成に重要な海馬での A 蓄積が減少し、本病態モデルマウスにおける海馬 IL-4 の機能不全も改善された。本成果については、熊本大学よりプレスリリースされるとともに、2 つの新聞に掲載された (熊本日日新聞 (平成 26 年 6 月 12 日付掲載)、科学新聞 (平成 26 年 7 月 11 日付掲載))。

抗酸化作用を促進する化合物について以下の知見を得た。野生型マウスを用いた混合グリア細胞系において、7 残基のペプチド Sx が、MG の抗酸化酵素 HO-1 の発現を著明に増大させた (図 1)。本化合物は、海外において

(-) 化合物 Sx

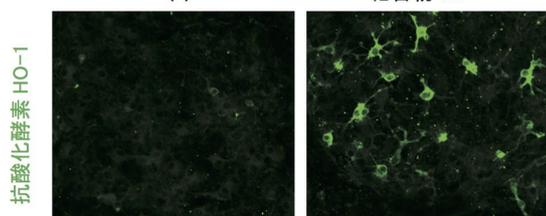


図 1. 化合物 Sx は抗酸化酵素 HO-1 の発現を増大させる

向知性薬として用いられているが、その分子機序はまだ十分に分かっていない。MGの抗酸化活性が、その薬理作用に一部関与するかもしれない。今後の研究が必要である。

ラット1型ミクログリア特異的抗体9F5の抗原同定を行った。その結果、9F5の抗原分子は、170番目のLysから始まる1型膜貫通タンパク質GPxxxであった(投稿中)。抗原分子の機能を調べるために、ノックアウトマウスを作製した。1型MGを*in vivo*で詳細に解析することを念頭に置き、GFPノックインマウスとした。GFPノックインマウス(ヘテロ接合型)の新生仔脳から混合グリア培養を行い、GFP陽性細胞を観察した。その結果、GFP陽性細胞は、Iba1陽性MGの一部であった(図2)。

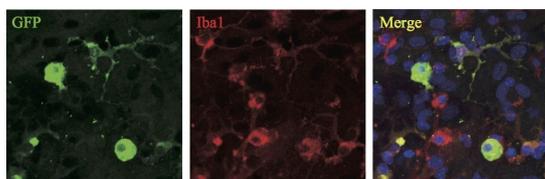


図2. GFP陽性細胞はIba1陽性MGの一部である

これまでの9F5抗体を用いたラットでの解析を支持する結果であった。今後、*in vivo*での解析が必要である。

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)

A. Haga, E. Takahashi, Yasuya Inomata, Koichi Kawahara, Hidenobu Tanihara. Differentiated expression patterns and phagocytic activities of type 1 and type 2 microglia. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.印刷中

川原浩一, 中山仁. レチノイン酸受容体 / とレチノイドX受容体の同時活性化によるアルツハイマー病治療. MedChem News (Essay) 査読(無), 25, 69-74 (2015)

Kohichi Kawahara, Hirofumi Hohjoh, Tomoaki Inazumi, Soken Tsuchiya, Yukihiko Sugimoto. Prostaglandin E₂-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. Biochim. Biophys. Acta 査読(有), 1851, 414-421 (2015)

Kohichi Kawahara,* Michita Suenobu,* Hideyuki Ohtsuka, Akihiko Kuniyasu, Yukihiko Sugimoto, Madoka Nakagomi, Hiroshi Fukasawa, Koichi Shudo, Hitoshi Nakayama. (*equal contribution) Cooperative therapeutic action of retinoic acid receptor and retinoid X receptor agonists in a mouse model of Alzheimer's disease. J.

Alzheimers Dis. 査読(有), 42, 587-605 (2014)

[学会発表](計7件)

Kohichi Kawahara. Retinoid receptor ligand as a candidate drug for treatment of Alzheimer's disease, The 3rd International Conference on Retinoids, 2015.10.23, Gifu Grand Hotel, Gifu (Invited Speaker)

川原浩一, 前田武彦, 首藤紘一, 中山仁. レチノイド化合物によるアルツハイマー病の治療, 第17回応用薬理シンポジウム, 2015年9月5日, 新潟市, 新潟大学医学部(招待講演)

川原浩一. レチノイン酸受容体 / とレチノイドX受容体の同時活性化によるアルツハイマー病の治療. 平成27年度日本生化学会関東支部例会/第56回新潟生化学会懇談会, 2015年6月20日, 新潟市, 新潟日報メディアシップ(招待講演)

川原浩一, 未延道太, 大塚英起, 國安明彦, 杉本幸彦, 前田武彦, 中込まどか, 深澤弘志, 首藤紘一, 中山仁. アルツハイマー病モデルマウスにおけるレチノイン酸受容体アゴニスト Am80 とレチノイドX受容体アゴニスト HX630 の協調的な治療効果. 日本薬学会第135年会, 2015年3月28日, 神戸市, デザイン・クリエイティブセンター神戸

川原浩一, 未延道太, 大塚英起, 國安明彦, 杉本幸彦, 中込まどか, 深澤弘志, 首藤紘一, 中山仁. アルツハイマー病モデルマウスにおけるレチノイン酸受容体作動薬とレチノイドX受容体作動薬の協調的な治療効果. 日本レチノイド研究会第25回学術集会, 2014年10月11日, 秋田市, 秋田大学医学部

Kohichi Kawahara, Michita Suenobu, Yukihiko Sugimoto, Hitoshi Nakayama. Intracerebral microinjection of interleukin-4/interleukin-13 reduces -amyloid accumulation in the ipsilateral side and improves cognitive deficits in young APP23 mice. 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2013.11.10, San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA.

川原浩一, 未延道太, 吉田陽, 古賀清弘, 兵藤敦, 大塚英起, 國安明彦, 玉巻伸章, 杉本幸彦, 中山仁. インターロイキン4/インターロイキン13の脳内微量注入は抗炎症性M2様ミクログリアを活性化しアルツハイマー病モデルマウスの空間認知障害を改善する, Neuro2013, 2013年6月20日, 京都市, 京都国際会議場

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称 : Medicament for treatment of
Alzheimer ' s disease
発明者 : Kohichi Kawahara, Michita Suenobu,
Koichi Shudo
権利者 : KEMPHYS LTD.
種類 : International Application
番号 : PCT/JP2014/065025
出願年月日 : 2014 年 5 月 30 日
国内外の別 : 米国

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.nupals.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川原 浩一 (KAWAHARA KOICHI)
新潟薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号 : 10347015