

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670441

研究課題名(和文)機能性ペプチド核酸によるアルツハイマー病治療の可能性

研究課題名(英文)Treatment for Alzheimer disease by CpG with RVG

研究代表者

水野 哲也(Mizuno, Tetsuya)

名古屋大学・環境医学研究所・客員准教授

研究者番号：70335008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳内の免疫機能を受け持つミクログリアは、アルツハイマー病における慢性炎症の主体となり神経障害性に作用する一方で、炎症を伴わない貪食作用、抗酸化酵素・抗炎症性サイトカイン・神経栄養因子産生により神経保護作用を示す。我々は、トル様受容体9リガンドである機能性核酸CpG-DNAが、ミクログリアの神経保護作用を誘導することを明らかにした。本研究において、CpG-DNAに脳内送達能を持つペプチドRVGを付与した機能性ペプチド核酸を開発し、アルツハイマー病モデルマウスへ腹腔内投与したところ、認知機能障害の改善および病理所見の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：Soluble oligomeric amyloid beta (oAb) 1-42 causes synaptic dysfunction and neuronal injury in Alzheimer's disease (AD). Microglia are involved in AD pathology. Microglia activated with unmethylated DNA CpG motif (CpG), a ligand for toll-like receptor 9, attenuated oAb neurotoxicity. In this study, we developed CpG with a specific target peptide for the brains; ravies virus glycoprotein (RVG). Intraperitoneal (IP) administration of CpG with RVG ameliorated the impairment of associative learning in APP/PS1 mouse model of AD. We propose that CpG with RVG may be an effective therapeutic strategy for inhibiting oAbeta 1-42 neurotoxicity in AD.

研究分野：神経内科

キーワード：ミクログリア アルツハイマー病 機能性ペプチド核酸

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進展に伴い、アルツハイマー病の患者数は増加しており、現在、世界で約2,660万人、2050年には1億人といわれている。また、国内の認知症患者数はおよそ170万人に上り、その内6割以上をアルツハイマー病患者が占めており、アルツハイマー病に対する有用な治療薬が待ち望まれる。

現在、国内で認可されている治療薬はアセチルコリン分解酵素阻害薬、NMDA受容体拮抗薬のみである。我々は、アルツハイマー病の病態に脳内免疫細胞であるミクログリアの役割が重要であることに着目した。

神経変性疾患、炎症性脱髄疾患において変性神経細胞の周囲に活性化ミクログリアの集簇が認められる。ミクログリアは腫瘍壊死因子、Interleukin(IL)-1等の炎症性サイトカイン、活性酸素、グルタミン酸を産生し、慢性炎症を惹起するとともに神経細胞に対して障害的に働く。一方で、ミクログリアは神経細胞の状態をチェックし、神経栄養因子やIL-10などの抗炎症性サイトカイン、抗酸化酵素を産生し神経保護作用を有する。さらに、ミクログリアは、その貪食能により変性神経細胞やアルツハイマー病の病因蛋白であるアミロイドベータ蛋白を除去し脳内環境を維持している。ミクログリアの貪食作用には、炎症を伴う場合と伴わない場合が存在し、炎症を伴わない貪食は、神経細胞保護作用に働いている。従って、ミクログリアの神経障害作用を抑制し、神経保護的に作用するようにミクログリアを制御できれば種々の神経変性疾患の治療に応用できる。

TLR ligandは、一般に炎症を誘導する因子と考えられているが、我々は、TLR9 ligandであるCpGには3種類のサブタイプが存在し、タイプBは、ミクログリアに対して神経保護的に作用することを明らかにした。

さらにCpG投与によりミクログリアが、アミロイドベータオリゴマーの除去を促進し、

抗酸化酵素を誘導することにより神経保護作用を発揮し、アミロイドベータオリゴマー神経毒性に対して有効であることを示した(Doi et al. Am. J. Pathol. 2009)。

2. 研究の目的

ミクログリアの神経障害作用を抑制するCpG-DNAに脳移行性を有するペプチドRVGを付与した機能性ペプチド核酸を開発することにより、末梢投与によってアルツハイマー病神経変性の一因であるグリア細胞による慢性炎症を抑制することを目指す点にある。

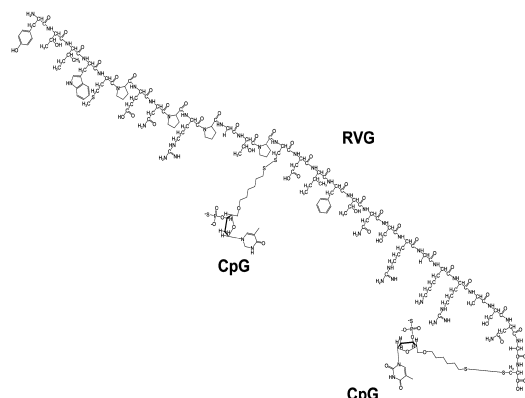
本研究の着想は、遺伝子導入による形質転換ではなく、末梢からの機能性ペプチド核酸を投与することにより脳内のミクログリアの機能を神経保護的に制御し、アルツハイマー病への治療に結びつけようとするものである。

アルツハイマー病のみならず神経変性の病態形成に、ミクログリア・アストロサイト等グリア細胞の活性化による脳独自の慢性神経炎症の関与が示唆されていることから、本研究におけるミクログリア制御による慢性炎症抑制法の確立は他の神経変性疾患治療法の開発にも結びつくことが期待される。本研究が成功した場合には、中枢神経系への薬剤送達の一法としての可能性も開けることから、汎用性の高い成果につながるものと考えられる。

3. 研究の方法

1) マウス初代混合グリア細胞より分離したミクログリアを用いて、ミクログリアの活性化を抑制する種々のCpGを探索する。CpGはホスホロチオエート修飾およびLNA修飾を施し、核酸分解酵素に分解されにくい構造とする。神経保護作用を有するミクログリアは、抗炎症性サイトカイン、抗酸化酵素を産生し、炎症を伴わない貪食能を獲得することを目標とする。候補分子について、脳移行ペプチドRVGを付与し、機能性ペプチド核酸とする。また、機能性ペプチド核酸の合成方法におい

て、最適化 CpG を脳移行ペプチド RVG のシステインに S-S 結合によって合成することが特徴である(下図)。



誘導に用いる CpG は、LPS より炎症惹起能が低く、抗酸化酵素 HO-1 産生能および貪食能が高い。脳血管内皮細胞の通過能をもつ狂犬病由来脳移行性ペプチド RVG は、これまでに 9 分子のアルギニン鎖を付加し、siRNA と電気的に結合し、脳内に送達させた Kumar らの報告 (Nature 448:39-43, 2007) があるが、我々はこの改良型を作成し、さらに脳移行性を高める方法を見出した。

In vitro において、トランスウェルのポリカーボネート膜上面に脳血管内皮細胞を培養した薬物脳内移行性モデルを用いて、機能性ペプチド核酸の透過性を検証する。

2) 上記で有用な機能性ペプチド核酸を、アルツハイマー病モデルマウス (APP/PS1 トランスジェニックマウス) に末梢投与 (腹腔内投与) し、病態改善効果を恐怖条件付け実験等の行動実験・病理学的解析により検討する。

4. 研究成果

CpG は、マウス TLR9 に反応する gacggt 配列を有するもの、ヒト TLR9 に反応する gtcggt 配列を有するものがある。これを基に、核酸分解酵素による分解を受けない修飾 (ホスホロチオエート修飾) を施した CpG-ODN を作成した。培養神経細胞、ミクログリアを用いて、アミロイドベータオリゴマー神経毒性に対

して抑制作用をもつものを検索した。さらに、培養脳血管内皮細胞による薬物脳内移行性モデルにおいて、脳移行性機能性核酸 CpG を加え、10-20%の移行性を示すものを選択した。その結果、5種類の候補分子が得られた。これらの中から神経保護作用の強い分子に脳移行性を有するペプチド RVG を付与した。RVG-CpG は、培養細胞においてミクログリアに結合しやすいことが明らかとなった。脳内移行性を確かめるために、FITC による蛍光標識を行い、正常マウスの尾静脈より投与した。投与 6 時間後の病理組織学的検討において、大脳皮質および海馬への集積が認められた。さらに、アルツハイマー病モデルマウス (APP/PS1 トランスジェニックマウス) に腹腔内投与し、恐怖条件付け実験を行ったところ、恐怖条件付けを受けた野生型マウス (WT) は電気刺激を受けたケージに入れると 50%のすくみ行動が見られたが、アルツハイマー病モデルマウス (APP/PS1) の PBS 投与群 (対照群) ではすくみ行動は 22%に低下した。一方、RVG-CpG 投与群では、すくみ行動は 36%に増加し有意差が認められたことから、RVG-CpG 腹腔内投与はアルツハイマー病モデルマウスにおいて認知機能障害の改善に有用であると考えられた。さらに病理学的解析により、大脳皮質及び海馬のアミロイドベータ蛋白の減少が認められた。以上のことから、機能性ペプチド核酸 RVG-CpG のアルツハイマー病モデルマウスにおける有用性が認められた。今後、脳移行性機能性核酸 CpG を蛍光色素、RI、ガドリニウム錯体等で標識し、生体に投与した後、免疫染色、ポジトロン断層撮影 (PET)、MRI にて脳移行性、脳内分布を解析する予定である。機能性ペプチド核酸 RVG-CpG は、その作用機序においてアミロイドベータオリゴマーの減少が期待されることから、病初期のアルツハイマー病治療薬および予防薬としての有用性が期待される。

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)

名古屋大学環境医学研究所
客員准教授
研究者番号：70335008

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Parajuli B, Horiuchi H, Mizuno T,
Takeuchi H, Suzumura A.
CCL11 enhances excitotoxic neuronal
death by producing reactive oxygen
species in microglia.
Glia. 2015 Dec;63(12):2274-84.

(2) Doi Y, Takeuchi H, Mizoguchi H,
Fukumoto K, Horiuchi H, Jin S,
Kawanokuchi J, Parajuli B, Sonobe Y,
Mizuno T, Suzumura A.
Granulocyte-colony stimulating factor
attenuates oligomeric amyloid
neurotoxicity by activation of
neprilysin.
PLoS One. 2014 Jul 25;9(7):e103458.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) 水野哲也、Parajuli B、竹内英之、錫村
明生
可溶性 Abeta オリゴマーによるミクログ
リアの慢性神経炎症作用
日本神経学会 2014 年 5 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 哲也(MIZUNO TETSUYA)