

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15369

研究課題名（和文）GM1ガングリオシドを標的としたアルツハイマー病の新規治療薬開発

研究課題名（英文）Development of a new treatment for Alzheimer's disease targeting GM1 ganglioside

研究代表者

梶原 隆太郎 (Kajihara, Ryutaro)

熊本大学・大学院生命科学研究部（保）・助教

研究者番号：00738221

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）は、認知症の60-70%を占め、先進国において最も金銭的コストが高い疾患となっている。A β と呼ばれるペプチドが脳に凝集・蓄積することが本疾患の発症機構と考えられているが、根本的治療法は現在のところ確立しておらず、対症療法のみにとどまっている。近年になってAD患者の神経細胞膜表面に存在するGM1ガングリオシド（以下GM1）と呼ばれる糖脂質が、A β の凝集を促進しADの病態形成に深く関わっていることがわかってきた。そこで本研究では、iPS細胞技術を駆使し、GM1をターゲットとした今までにない作用機序によるAD治療薬開発、およびAD病態形成におけるGM1の機能解明について探る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性AD患者からiPS細胞を樹立し神経細胞へと分化させることによって、in vitroでヒト神経細胞を解析でき、種の違い・アーティファクト等の問題を起こしにくい実験系を確立した。また、根本的な治療薬が存在しない本疾患において、GM1をターゲットとして新規治療薬開発を行うことは非常に独創的である。さらに、GM1ガングリオシド患者由来iPS細胞を用いたスクリーニング系により、GM1を抑制する化合物を世界で初めて発見したことは非常にインパクトが大きい。本研究によって今までにない作用機序によるAD治療薬を開発でき、将来的に医療現場における患者のQOLの向上に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Alzheimer's disease (AD) accounts for 60-70% of all dementias and has the highest financial cost in developed countries. The aggregation and accumulation of peptides called A β in the brain is thought to be the pathogenic mechanism of this disease, but no fundamental treatment has been established so far, and only symptomatic treatment is available. In recent years, it has become clear that a glycolipid called GM1 ganglioside (GM1), which exists on the surface of neuronal cell membranes in AD patients, promotes A β aggregation and is deeply involved in the pathogenesis of AD. In this study, we will develop a new therapeutic drug for AD with a novel mechanism of action targeting GM1 and elucidate the function of GM1 in the pathogenesis of AD by using iPS cell technology.

研究分野：神経科学

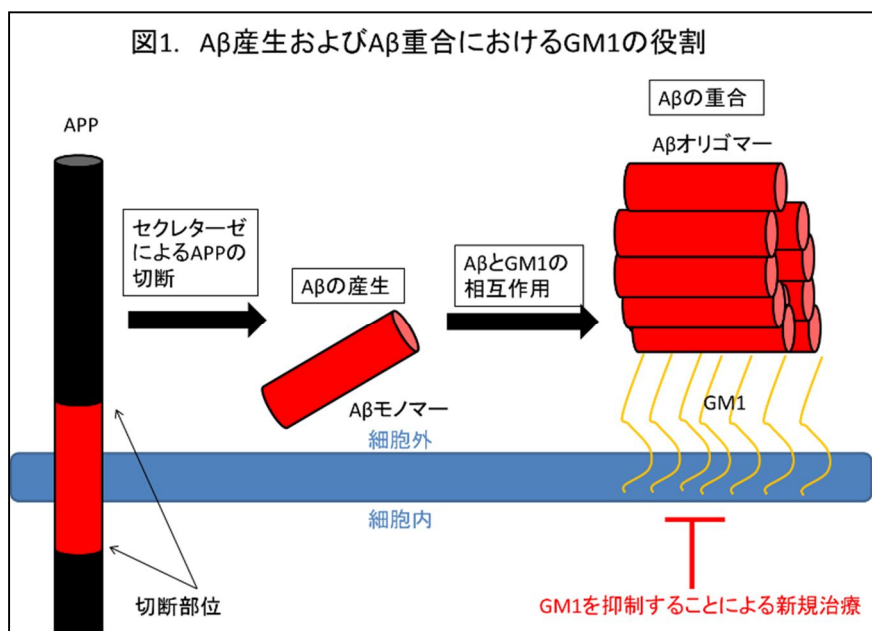
キーワード：アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能低下、人格の変化を主な症状とする認知症の一種であり、大脳皮質における神経細胞の著しい脱落に加え、老人斑 (A と呼ばれるペプチドが神経細胞外に凝集・沈着したものと神経原線維変化を特徴とする。病態発症機構としては A の産出の上昇、あるいは分解不全による A 蓄積を開始点とするアミロイドカスケード仮説が最も支持されている。A は分子量約 4kD の小さな蛋白質で 38-43 個のアミノ酸からなり、アミロイド前駆蛋白 (APP) からセクレターゼにより切りだされて産出される (図 1)。主要な A の分子種としてはアミノ酸数の違いにより A₄₀ と A₄₂ が存在し A₄₂ は高い凝集性から病原性がより強いことが知られている。AD に対しては近年治療薬の開発によって薬物治療 (対症療法) が主に行われるようになってきたが、現在のところ根本的治療薬は見つかっていない。根本治療としてセクレターゼ阻害剤、抗 A 免疫療法等が臨床研究されてきたが、被験者に対する不十分な有効性や強い副作用のため、いずれも中止に追い込まれている。したがって、AD 治療薬開発のためには、今までにはない新たな観点・標的分子から創薬を行う必要がある。

近年になって、神経細胞膜表面の脂質ラフトと呼ばれる領域に存在する GM1 が、A の重合・凝集を促進するための足場となり、AD の病態形成に深く関わっていることがわかってきた (図 1)。さらに、AD 患者の脳内 GM1 量は、健常者のそれに比べて増加しているという報告があり、また逆に、GM1 ガングリオシドーシス (GM1 の加水分解に関与する β -gal 酵素の欠損・異常によって、GM1 が脳に蓄積してしまう先天性代謝異常症) 患者では、若年期から A が脳内に蓄積するということが報告されている。

そこで申請者は、A の重合・凝集の足場となっている GM1 を抑制することで、A の蓄積を抑えることができるのではないかと考え、GM1 をターゲットとした今までにない作用機序による AD 治療薬開発および AD 病態解明について探ることとした。



2. 研究の目的

本研究は、申請者が発見した GM1 抑制化合物の AD 新規治療薬としての有効性を、ヒト患者 iPS 細胞由来ニューロン (in vitro)、および AD モデルマウス (in vivo) を用いて解析し、また作用メカニズムについても探ることを目的としている。

大きく分けて次の 2 点からなる。治療薬候補のニューロンに対する有効性を確認するために、患者 iPS 細胞 から分化させたニューロンを候補薬剤で処理して同様に A の産生が減少するか、また、Fluo-4 を用いてニューロンの細胞機能 (カルシウムシグナルの異常) が改善するかを in vitro で調べる。候補薬剤の in vivo での効果について明らかにするため、AD モデルマウス (5xFAD) に候補薬剤を投与後、脳内 A 量を定量し、in vivo でも A 蓄積を軽減する作用があるかを調べる。

3. 研究の方法

< 治療薬候補の患者ニューロンに対する in vitro での有効性の評価 >

(1) ELISA を用いた細胞外 A 測定

患者ニューロンを候補薬剤で処理後、細胞外 (培地中) の A₄₀ および A₄₂ 量を測定することによって、候補化合物が患者ニューロンの A 産生量を抑制する効果があることを調べる。

(2) Fluo-4 を用いたニューロン機能の評価

Fluo 4 は Fluo 3 のクロロ基(Cl)をフルオロ基(F)へと置きかえた構造を持つカルシウム蛍光プローブであり、ニューロンにおいては、シナプス後終末の機能の計測に活用されている。これを用いて、患者ニューロンのポストシナプス機能を測定する。化合物処理によって、このカルシウムシグナルの異常を是正することができるかを調べる。

< モデルマウス(5xFAD)を用いた in vivo での治療薬候補の有効性の評価 >

(1) 脳内 A 量の測定

AD モデルマウス (5xFAD) に治療薬候補を投与後、脳内 A 量を ELISA を用いて定量、および、脳切片を作成し抗 A 抗体によって免疫染色する。これらの実験から in vivo でも A 蓄積を軽減する作用があるかを調べる。

4. 研究成果

まず、候補化合物の患者ニューロンに対する in vitro での有効性の評価について焦点を当てて解析した。患者ニューロンを候補薬剤で処理後、細胞外(培地中)の A₄₀ および A₄₂ 量を ELISA を用いて測定したところ、処理群では、対照軍にくらべて優位に A₄₂ 量の産生量が抑えられ、A₄₀/A₄₂ 比を健常者由来ニューロンに近づけるような効果があることを見出した。

また、候補薬剤の in vivo での効果について明らかにするため、AD モデルマウス(5xFAD)に候補薬剤を投与後、脳内 A 量を定量したところ、同様な結果が得られたことから in vitro のみではなく in vivo でも効果があることが分かった。

このことから、申請者が発見した GM1 抑制化合物は、AD 新規治療薬候補としての有効性が期待できることが示された。

つぎに、AD 患者 iPS 細胞由来のニューロンにおいて、カルシウムシグナル動態の解析を行った。カルシウムプローブである Fluo-4 を用いて AD 患者ニューロンの活動を解析した結果、健常者由来ニューロンに比べて、異常な過活性を認めた。また、我々が薬剤スクリーニング系で見つけ出した GM1 ガングリオシド抑制効果のある化合物を処理したところ、この患者ニューロンの異常なカルシウムシグナルの過活動は抑制されることを見出した。

このことから、AD の病態では、カルシウムシグナルが異常に活性化しており、GM1 ガングリオシドを阻害することで、このカルシウムシグナルの異常を是正できる可能性を示唆する重要な知見を得た。

最後に、AD の原因タンパク質である APP と、GM1 ガングリオシドの分解酵素である beta-galactosidase の関係に焦点を当てて研究を行った。GM1 ガングリオシドが AD の増悪因子であることは前年度の研究により示唆されていたが、その分解酵素である beta-galactosidase と AD の原因タンパク質である APP が互いに物理的に結合することを免疫沈降法にて証明した。また、細胞に APP を過剰発現させると、beta-galactosidase 活性が阻害されることも見出した。

これらの研究結果により、AD の病態では、APP が beta-galactosidase を阻害し、そのことにより GM1 ガングリオシドが蓄積し、その蓄積した GM1 ガングリオシドがさらに AD を増悪させるという負のスパイラルが起きていることを示唆する重要な知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kajihara Ryutaro, Numakawa Tadahiro, Odaka Haruki, Yaginuma Yuji, Fusaki Noemi, Okumiya Toshika, Furuya Hirokazu, Inui Seiji, Era Takumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel Drug Candidates Improve Ganglioside Accumulation and Neural Dysfunction in GM1 Gangliosidosis Models with Autophagy Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 909 ~ 923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.03.012	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 Matsushita Kozo, Numakawa Tadahiro, Odaka Haruki, Kajihara Ryutaro, Soga Minami, Ozasa Shiro, Nakamura Kimitoshi, Mizuta Hiroshi, Era Takumi	4. 巻 414
2. 論文標題 Presynaptic Dysfunction in Neurons Derived from Tay-Sachs iPSCs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 128 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2019.06.026	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 TANABE KANO, KAJIHARA RYUTARO	4. 巻 44
2. 論文標題 The role of protein phosphorylation in the regulation of class switch recombination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 545 ~ 558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32604/BIOCELL.2020.012740	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 Kajihara Ryutaro, Numakawa Tadahiro, Era Takumi	4. 巻 11
2. 論文標題 Rapid and Simplified Induction of Neural Stem/Progenitor Cells (NSCs/NPCs) and Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3914 ~ e3914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3914	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 Odaka Haruki, Numakawa Tadahiro, Soga Minami, Kido Jun, Matsumoto Shiro, Kajihara Ryutaro, Okumiya Toshika, Tani Naoki, Tanoue Yuki, Fukuda Takaichi, Furuya Hirokazu, Inoue Takafumi, Era Takumi	4. 巻 152
2. 論文標題 An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca ²⁺ dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiology of Disease	6. 最初と最後の頁 105279 ~ 105279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2021.105279	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 Oba Takaaki, Makino Kenichi, Kajihara Ryutaro, Yokoi Toshihiro, Araki Ryoko, Abe Masumi, Minderman Hans, Chang Alfred E, Odunsi Kunle, Ito Fumito	4. 巻 9
2. 論文標題 In situ delivery of iPSC-derived dendritic cells with local radiotherapy generates systemic antitumor immunity and potentiates PD-L1 blockade in preclinical poorly immunogenic tumor models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e002432 ~ e002432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-002432	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 Patel Ankit, Oba Takaaki, Kajihara Ryutaro, Yokoi Toshihiro, Abrams Scott I., Ito Fumito	4. 巻 207
2. 論文標題 Multimodal Intralesional Therapy for Reshaping the Myeloid Compartment of Tumors Resistant to Anti-PD-L1 Therapy via IRF8 Expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1298 ~ 1309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100281	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 AbdelFatah Eihab N., Hoki Toshifumi, Oba Takaaki, Chen Hongbin N., Attwood Kristopher, Segal Brahm, Ito Fumito, Kajihara Ryutaro, Yau Edwin	4. 巻 233
2. 論文標題 Circulating CX3CR1+ CD8+ T Cells to Predict Response to Chemo-Immunotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American College of Surgeons	6. 最初と最後の頁 S244 ~ S245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jamcollsurg.2021.07.506	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 Yokoi Toshihiro, Oba Takaaki, Kajihara Ryutaro, Abrams Scott I., Ito Fumito	4. 巻 11
2. 論文標題 Local, multimodal intralesional therapy renders distant brain metastases susceptible to PD-L1 blockade in a preclinical model of triple-negative breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21992 ~ 21992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01455-4	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 Oba Takaaki, Kajihara Ryutaro, Yokoi Toshihiro, Repasky Elizabeth A., Ito Fumito	4. 巻 81
2. 論文標題 Neoadjuvant In Situ Immunomodulation Enhances Systemic Antitumor Immunity against Highly Metastatic Tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6183 ~ 6195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-0939	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 Yamauchi Takayoshi, Hoki Toshifumi, Oba Takaaki, Kajihara Ryutaro, Attwood Kristopher, Cao Xuefang, Ito Fumito	4. 巻 71
2. 論文標題 CD40 and CD80/86 signaling in cDC1s mediate effective neoantigen vaccination and generation of antigen-specific CX3CR1+ CD8+ T cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 137 ~ 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-02969-6	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 Makino Kenichi, Long Mark D, Kajihara Ryutaro, Matsueda Satoko, Oba Takaaki, Kanehira Kazunori, Liu Song, Ito Fumito	4. 巻 10
2. 論文標題 Generation of cDC-like cells from human induced pluripotent stem cells via Notch signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e003827 ~ e003827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-003827	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 Era Takumi、Numakawa Tadahiro、Kajihara Ryutaro	4. 巻 135
2. 論文標題 Analysis of GM1 gangliosidosis iPS cells provides new phenotype of neural dysfunction and drug candidates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 S41 ~ S42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymgme.2021.11.095	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 Ito Fumito、Long Mark D、Kajihara Ryutaro、Matsueda Satoko、Oba Takaaki、Kanehira Kazunori、Liu Song、Makino Kenichi	4. 巻 208
2. 論文標題 Notch signaling is required for generation of conventional type 1 dendritic cells from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 47.07 ~ 47.07
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.208.supp.47.07	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田邊香野、梶原隆太郎、乾誠治
2. 発表標題 プロテインホスファターゼはIgEクラススイッチを促進する
3. 学会等名 第9回 日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江良択実、梶原隆太郎、沼川忠広、曾我美南
2. 発表標題 疾患由来iPS細胞を使った疾患解析と薬剤開発
3. 学会等名 第67回日本輸血・細胞治療学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryutaro Kajihara
2. 発表標題 Drug development for GM1 gangliosidosis using the patient-derived iPS cells
3. 学会等名 The 18th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 隆太郎, 沼川 忠広, 小高 陽樹, 奥宮 敏可, 古谷 博和, 江良 択実
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたGM1ガングリオシドーシスの解析・薬剤開発
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryutaro Kajihara, Tadahiro Numakawa, Haruki Odaka, Takumi Era
2. 発表標題 Drug development for GM1 gangliosidosis using the patient-derived iPS cells
3. 学会等名 The 18th Congress of the Japanese Society for Regenerative Medicine (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梶原 隆太郎, 沼川 忠広, 小高 陽樹, 奥宮 敏可, 古谷 博和, 江良 択実
2. 発表標題 iPS細胞技術を用いたGM1ガングリオシドーシスの解析・薬剤開発
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下 紘三, 沼川 忠広, 曾我 美南, 梶原 隆太郎, 小高 陽樹, 江藤 真哉, 中村 英一, 江良 択実
2. 発表標題 Tay-Sachs病患者由来の人工多能性幹細胞から誘導した神経細胞における、神経機能異常
3. 学会等名 第 41 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶原 隆太郎, 沼川 忠広, 小高 陽樹, 奥宮 敏可, 乾 誠治, 江良 択実
2. 発表標題 GM1 ガングリオシドーシス患者由来iPS 細胞をいた神経障害の 機能的解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 曾我 美南, 梶原 隆太郎, 沼川 忠広, 小高 陽樹, 柳沼 裕二, 房木 ノエミ, 奥宮 敏可, 古谷 博和, 乾 誠治, 江良 択実
2. 発表標題 ガングリオシドーシス由来神経細胞の新しい異常表現型とそれを使った薬剤開発
3. 学会等名 日本先天代謝異常学会雑誌
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumito Ito, Mark D Long, Ryutaro Kajihara, Satoko Matsueda, Takaaki Oba, Kazunori Kanehira, Song Liu, Kenichi Makino
2. 発表標題 HETEROGENEITY AND FUNCTION OF CONVENTIONAL DENDRITIC CELLS DIFFERENTIATED FROM HUMAN INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS
3. 学会等名 ISSCR 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 PROPHYLACTIC AGENT OR THERAPEUTIC AGENT FOR ALZHEIMER'S DISEASE, SCREENING METHOD THEREFOR, AND COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING ALZHEIMER'S DISEASE	発明者 ERA Takumi, KAJIHARA Ryutaro	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、F190009929	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 PROPHYLACTIC OR THERAPEUTIC FOR GM1 GANGLIOSIDOSIS, AND COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING GM1 GANGLIOSIDOSIS	発明者 ERA Takumi, KAJIHARA Ryutaro	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、F190009930	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔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
研究協力者	江良 択実 (Era Takumi) (00273706)		
研究協力者	沼川 忠広 (Numakawa Tadahiro) (40425690)		
研究協力者	横内 裕二 (YOKOUCHI YUJI) (60252227)		
研究協力者	城戸 淳 (Kido Jun) (70721215)		

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