

平成 21 年 4 月 13 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007 - 2008
 課題番号：19390031
 研究課題名(和文)活性化ミクログリアの神経保護作用誘導を活用するアルツハイマー病新治療薬の開発
 研究課題名(英文) Development of a novel Alzheimer's disease drug utilizing neuroprotective action of activated microglia
 研究代表者
 川原 浩一 (KAWAHARA KOHICHI)
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
 研究者番号：10347015

研究成果の概要：

我々は、アルツハイマー病(AD)の新しい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開発を行った。(1) *in vitro*における2型MGによるA \cdot アミロイド(A \cdot)クリアランスの分子機構を解明した(J. Immunol., 2008)。(2) (1)のA \cdot 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、脳内にサイトカインを微量注入して調べた結果、A \cdot 蓄積が有意に認められる4.5月齢では、蓄積A \cdot の減少とこ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。(3) IL-4分泌促進能をもつある種の薬物候補化合物(経口投与)を用いても、APP23における脳内A \cdot 量が減少するとの予備知見も得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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、ミクログリア、インターロイキン-4、レチノイド

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)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。

一方、脳の免疫担当細胞であるミクログリ

ア(MG)は、ADにおいては軽度認知障害のときから活性化され、AD病態の発症と密接に関連することが示唆されている。従来、ミクログリア(MG)は脳炎症時に活性化され、proinflammatoryに作用すると捉えられがちであったが、最近の我々の知見も含め、(a)神経傷害的か保護的となるかは条件によって異なること、(b)その作用の違いには少な

くとも2群に分けられる MG サブタイプ (1型と2型) が深く関わるということが分かってきた。

2. 研究の目的

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) 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。

3. 研究の方法

(1) 初代培養 MG を用いた解析

ラット新生仔の脳より調製した混合グリア細胞から 1 型と 2 型 MG を分離した。分離した両 MG に対して IL-4 を 96 時間処理し、CD36、ネプリライシン、インスリン分解酵素の発現量を Western blot 法で調べた。また、A・クリアランス活性は、¹²⁵I 標識した A・による degradation 活性や、抗 A・抗体を用いた Western blot 法で調べた。また、レンチノイド類やモルヒネアナログを MG へ添加し、CD36 や neprilysin の発現が誘導されるか調べた。

(2) AD 病態モデルを用いた解析

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。APP23 マウスあるいは野生型の同腹仔 (wild-type: WT) の脳内に IL-4 と IL-13 の混合液を微量注入し、注入後、4 日目から 7 日目にかけてモリス水迷路試験を行い、空間認知能力を調べた。行動実験終了後、抗 A・抗体を用いた免疫組織染色を行い、A・が減少するか調べた。IL-4 の分泌促進能を持つ薬物候補物質を APP23 マウスに対して 3 ヶ月間経口投与し、脳内 A・₄₂ レベルを ELISA 法により調べた。

4. 研究成果

(1) ミクログリア (MG) での A・クリアランス能誘導

脳に障害が加わったとき、MG はまず炎症応答 (神経傷害的) としてこれに対処し、その後これを沈静化 (神経保護的) する。MG のこの二面的作用は、2 つの MG サブタイプに帰結できると澤田誠ら (名古屋大・医) は提唱している。我々もラット脳から単離した 2 種の MG 初代培養系で調べると、抗炎症性サイトカ

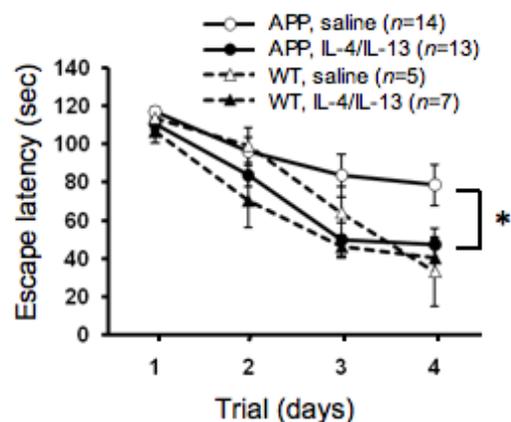
イン IL-4 (IL-13 でも) で処理したオリゴマー状 A・ (o-A・) の取り込み・分解は、2 型 MG に選択的に認められること、このときスカベンジャー受容体の CD36 や A・分解酵素であるネプリライシンやインスリン分解酵素の発現が誘導されること、これらの全てを誘導するのは IL-4 と IL-13 であることを見出した (J. Immunol., 2008)。種々の細胞系で CD36 がクリアランスに重要との我々の知見をふまえ、2 型 MG でも、CD36 機能を欠く SHR (spontaneously hypertensive rats) の MG にはこの作用がないことも確認した。

(2) AD モデル APP23 マウスを用いた in vivo での評価

2 型 MG にみられた o-A・クリアランス能誘導が in vivo でも認められるかを、AD モデルの APP23 マウス (Novartis 社の Staufenbiel 博士より供与) で調べた。このマウスは 3 月齢より A・の蓄積が始まり、6 月齢位より繊維化した A・プラークが認められるようになる。マウス大脳の片側に IL-4/IL-13 溶液 (各 50 ng per 0.5 μ L, 対照群には同量の生理食塩水) を一度だけマイクロインジェクトし、以下の 2 つの方法で効果を評価した。同月齢の WT マウスも同処置し、比較した。

モリス水迷路試験による空間認知学習能力の改善

下図には 4.5 月齢の training trial の結果を示す。生理食塩水投与で比べても、WT () に比較し、APP マウス () では学習効果が顕著ではない。これに比べ、IL-4/IL-13 投与した APP マウス () では、有意に学習能力の改善が見られた ($p < 0.05$)。



また probe trial でも有意に行動が改善された ($p < 0.05$)。もともと学習能力が低下していない WT マウスでは、IL-4/IL-13 投与してもその効果は認められなかった。IL-4/IL-13 投与の効果は、A・蓄積量が少ない 3 月齢やその大部分が繊維化した 9 月齢では認められなかった。

A・蓄積量の減少

学習能力の改善が脳内 A・蓄積量とどのように相関しているかを脳組織切片の染色で調べた。生理食塩水を注入した場合には、注入側でも非注入側と変化は認めないが、IL-4/IL-13 注入した APP マウスでは、注入側の A・蓄積量が明らかに減少していた。また画像解析ソフトで染色強度を比較すると、A・減少効果は有意差があった ($p < 0.01$)。

本研究では、抗炎症性サイトカイン IL-4 および IL-13 で活性化された 2 型 MG が A・を取り込み・分解するという細胞レベルで見出した新たなクリアランス能がアルツハイマー病モデルの一つ APP23 マウスを用いた *in vivo* の系でも誘導でき、その結果、A・蓄積の減少に相関して空間認知学習能力の改善がみられることが確認された。残された課題は、(a) IL-4, IL-13 量をいかに脳内で上昇させるか、さらには (b) IL-4, IL-13 関与なしにクリアランス能を誘導しうるかであり、いずれも脳移行性の高い低分子化合物が見つければ新しい治療戦略の候補となる。(a) の戦略の候補として中枢に作用することが知られた候補化合物を 2 種、また (b) の戦略に適う候補化合物 1 種を我々は既に得ている。(a) については APP23 マウスを用いた *in vivo* 評価でも効果を認めている。すなわち、ある種のレチノイド化合物を、APP23 マウスに一定期間経口投与すると、脳内 A・₄₂ 量が減少することを見出している (投稿準備中)。これらの結果は、更なる展開に弾みがつくものとして期待される。

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)

[雑誌論文](計 9 件)

Kawahara, K., Yoshida, A., Koga, K., Yokoo, S., Kuniyasu, A., Gotoh, T., Sawada, M., Nakayama, H.: Marked induction of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α in rat CD40+ microglia by comparison to CD40- microglia., *J. Neuroimmunol.*, 査読(有), 208, 70-79 (2009)

Yokote, S., Setoguchi, R., Shimizu, E., Kawahara, K., Kuniyasu, A., Shirasaki, T., Takahama, K., Konno, K., Kawai, N., Yamaoka, K., Kinoshita, E., Nakayama, H.: A synthetic approach to develop peptide inhibitors defective for brain-type sodium channels on the basis of pempidotoxin structure., *Heterocycles*,

査読(有), 79, 925-933 (2009)

Makise, M., Takehara, M., Kuniyasu, A., Matsui, N., Nakayama, H., Mizushima, T.: Linkage between Phosphorylation of the Origin Recognition Complex and Its ATP Binding Activity in *Saccharomyces cerevisiae*., *J. Biol. Chem.* 査読(有), 284, 3396-3407 (2009)

Nakayama, H.: Seeking "Etwas Neues"--from bioorganic chemistry to Alzheimer's disease, *Yakugaku Zasshi* 査読(無), 128, 1631-1643 (2008)

Shimizu, E., Kawahara, K., Kajizono, M., Sawada, M., Nakayama, H.: IL-4-induced selective clearance of oligomeric β -amyloid peptide₁₋₄₂ by rat type-2 microglia., *J. Immunol.* 査読(有), 181, 6503-6513 (2008)

Kaneko, K., Akuta, T., Sawa, T., Kim, H.W., Fujii, S., Okamoto, T., Nakayama, H., Ohigashi, H., Murakami, A., Akaike, T.: Mutagenicity of 8-nitroguanosine, a product of nitrative nucleoside modification by reactive nitrogen oxides, in mammalian cells., *Cancer Lett.* 査読(有), 262, 239-247 (2008)

Kaneko, K., Fukuda, H., Chuang, V.T., Yamasaki, K., Kawahara, K., Nakayama, H., Suenaga, A., Maruyama, T., Otagiri, M.: Subdomain IIIA of dog albumin contains a binding site similar to site II of human albumin., *Drug Metab. Dispos.* 査読(有), 36, 81-86 (2008)

Nishimura, S., Takahashi, S., Kamikatahira, H., Kuroki, Y., Jaalouk, D.E., O'Brien, S., Koivunen, E., Arap, W., Pasqualini, R., Nakayama, H., Kuniyasu, A.: Combinatorial targeting of the macropinocytotic pathway in Leukemia and lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 査読(有), 283, 11752-11762 (2008)

Hirayama, C., Watanabe, H., Nakashima, R., Nanbu, T., Hamada, A., Kuniyasu, A., Nakayama, H., Kawaguchi, T., Saito, H.: Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *Pharm. Res.* 査読(有), 25, 827-835 (2008)

〔学会発表〕(計 23件)

川原浩一, IL-4/IL-13で誘導されるA クリアランス能:アルツハイマー病モデルAPP23マウスでの評価, 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 京都

國安明彦, ペプチドリガンドによる白血病細胞における非アポトーシス性細胞死誘導, 日本薬学会第129年会, 2009年3月27日, 京都

中山 仁, 現代的疾患への分子化学的アプローチ -メタボリック症候群とアルツハイマー病を例に, 第10回日本薬学会創薬ビジョンシンポジウム, 2008年12月19日, 東京

川原浩一, LPS/IFN 海馬内投与ラットにおいて iNOS タンパク質は KM9F5 陽性ミクログリアに発現する, 第81回日本生化学会大会第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年12月11日, 神戸

山中暢人, ミクログリア選択的に取り込まれる新規ペプチドリガンドの同定, 第81回日本生化学会大会第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年12月11日, 神戸

西健太郎, Immunohistochemical analysis of heterogeneous microglial populations in the rat brains of several developing stages by using a novel antibody KM9F5, 第81回日本生化学会大会第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年12月11日, 神戸

末延道太, IL-4/IL-13で誘導されるA クリアランス能:アルツハイマー病モデルマウスでの評価, 第81回日本生化学会大会第31回日本分子生物学会年会合同大会, 2008年12月11日, 神戸

井上祥子, 脂肪細胞における酸化ストレス誘発性 PAI-1 分泌の分子機序, 第25回日本薬学会九州支部大会, 2008年12月7日, 延岡

高橋俊輔, 白血病細胞におけるミトコンドリア膜破壊ペプチドによる非アポトーシス性細胞死誘導, 第25回日本薬学会九州支部大会, 2008年12月6日, 延岡

末延道太, IL-4/IL-13で誘導されるA クリアランス能:アルツハイマー病モデルマウスでの評価, 第25回日本薬学会九州支部大会, 2008年12月6日, 延岡

西健太郎, 新規抗体 KM9F5 を用いた、成長

段階のラット脳におけるヘテロなミクログリア集団の免疫組織化学的解析, 第25回日本薬学会九州支部大会, 2008年12月6日, 延岡

川原浩一, A クリアランス能誘導からみたレチノイドのアルツハイマー病治療の可能性, 日本レチノイド研究会第19回学術集会, 2008年11月22日, 東京

Kuniyasu, A., Microglia targeting peptide ligands with cell-penetrating properties., 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, D.C., USA., November 18, 2008

國安明彦, マクロピノサイトーシスでの薬物送達と白血病細胞ターゲティング能をもつ新しいペプチド, 日本薬学会第128年会, 2008年3月26日, 横浜

川原浩一, Different induction of iNOS and TNF-alpha by LPS in two subtypes of rat microglia, 第80回日本生化学会大会第30回日本分子生物学会年会合同大会, 2007年12月14日, 横浜

中山 仁, Generation of Microglia-Specific monoclonal antibody that reveals heterogeneous microglial populations in the developing rat brain. 第80回日本生化学会大会第30回日本分子生物学会年会合同大会, 2007年12月14日, 横浜

井上祥子, アディポサイトカイン発現におけるリゾリン脂質の影響, 第80回日本生化学会大会第30回日本分子生物学会年会合同大会, 2007年12月12日, 横浜

高橋俊輔, 白血病細胞選択性を示す細胞内導入ペプチドの同定とその性質, 第80回日本生化学会大会第30回日本分子生物学会年会合同大会, 2007年12月13日, 横浜

西村真平, 白血病細胞選択的ペプチドの同定とその細胞内取り込み機序の解析, 第24回日本薬学会九州支部大会, 2007年12月8日, 福岡

黒木裕子, 神経芽腫細胞および単球細胞における LanCL-1 の細胞内局在の解析, 第24回日本薬学会九州支部大会, 2007年12月8日, 福岡

21 鷲見朋子, ミクログリアサブタイプを識別するモノクローナル抗体の作製とそれを用いた応用研究, 第24回日本薬学会九州支

部大会, 2007年12月8日, 福岡

22 横尾澄香, 炎症時におけるミクログリアサブタイプの機能的役割の解明, 第24回日本薬学会九州支部大会, 2007年12月8日, 福岡

23 中山 仁, A クリアランス能誘導からみたレチノイドのアルツハイマー病治療への可能性, 日本レチノイド研究会第18回学術集会, 2007年11月24日, 東京

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

工業所有権の名称: 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またはその断片。

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

工業所有権の種類, 番号: 特願 2007-501565

出願年月日: 2007年7月30日 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 浩一 (KAWAHARA KOHICHI) (2008年度)

熊本大学・医学薬学研究部・助教

研究者番号: 10347015

中山 仁 (NAKAYAMA HITOSHI) (2007年度まで)

熊本大学・医学薬学研究部・教授

研究者番号: 70088863

(2) 研究分担者

中島 誠 (NAKAJIMA MAKOTO)

熊本大学・医学薬学研究部・教授

研究者番号: 50207792

國安 明彦 (KUNYASU AKIHIKO)

熊本大学・医学薬学研究部・准教授

研究者番号: 90241348

川原 浩一 (KAWAHARA KOHICHI) (2007年度まで)

熊本大学・医学薬学研究部・助教

研究者番号: 10347015