

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06636

研究課題名(和文)アルツハイマー病発症原因「脳内炎症」の天然レチノイドX受容体アゴニストによる制御

研究課題名(英文) Regulation of brain inflammation, a causative factor in Alzheimer's disease, by natural retinoid X receptor agonists

研究代表者

井上 誠 (Inoue, Makoto)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：50191888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在、アルツハイマー病(AD)型認知症に対する有効な治療薬は存在していない。本研究では有効性が指摘されてきたが副作用や諸課題のため薬物としての開発が進んでいなかったレチノイドX受容体(RXR)アゴニストに着目し、特に当研究室で開発したRXRアゴニスト60HAの生物学的特徴を検討した。60HAはミクログリアの炎症に対して極初期における抗炎症作用と炎症収束促進作用を併せ持ち、AD発症の主原因である脳内炎症の抑制作用が期待された。60HAは生物学的利用能も高く、RXRアゴニストによく見られる高TG血症や甲状腺機能低下症などの副作用を示さず、安全性の高いAD治療薬候補化合物であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規RXRアゴニスト60HAが抗炎症作用と炎症収束促進作用を有する可能性を見出し、生物学的利用能の高さを考慮すると、ADの主原因と考えられるようになってきた脳内炎症を効果的に抑制できるRXRアゴニストである可能性が示唆された。また、60HAはこれまでに開発されたRXRアゴニストに頻りに観察された高TG血症、甲状腺機能低下症などの副作用を示さないRXRアゴニストとして、AD治療薬候補として非常に有望であることを示唆する結果を多く明らかにすることができた。今後、60HAがAD治療薬として臨床で応用できるような研究を進め、社会実装できることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Currently, there are no effective therapeutic drugs available for Alzheimer's disease (AD) dementia. In this study, we focused on retinoid X receptor (RXR) agonists, which have been suggested to be effective but have not progressed as drug candidates due to side effects and other issues. Specifically, we investigated the biological characteristics of 60HA, an RXR agonist developed in our laboratory. 60HA exhibited both early-stage anti-inflammatory effects and inflammation resolution-promoting effects on microglial inflammation, indicating its potential to suppress brain inflammation, a primary cause of AD onset. Additionally, 60HA demonstrated high bioavailability and did not exhibit common side effects associated with RXR agonists, such as hypertriglyceridemia and hypothyroidism, establishing it as a promising and safe candidate compound for AD treatment.

研究分野：Pharmaceutical Sciences

キーワード：retinoid X receptor RXR agonist nuclear receptor Alzheimer's disease microglia inflammation adverse effect

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) 型認知症が急増している超高齢化社会の我が国において、AD の予防法の確立と治療薬の開発は、AD 患者を減少させ、患者やその家族の生活の質の向上を図り、患者の介護による経済的・社会的負担を軽減させるために重要かつ喫緊の課題になっている。これまで AD 治療薬の開発は「アミロイドカスケード仮説」に基づき、アミロイド (A) の凝集・沈着の抑制を目指したものが殆どであった。しかし、A 沈着を減少させる薬物や抗 A 抗体の有効性が臨床研究において証明されず、AD 治療薬の開発の方向転換が余儀なくされてきた。その後、「アミロイド オリゴマー仮説」が提唱され、AD 患者の認知障害が臨床的に顕在化する前より多彩な生理活性及び細胞毒性を示す A オリゴマーの存在が脳内で観察されることから、AD 診断基準で分類されるプレクリニカル期 (臨床症状発現前 AD) あるいは軽度認知障害期からの予防及び治療が重要であると考えられるようになってきた。そして、既存薬の早期投与の効果を検討する研究や A オリゴマーの毒性軽減を目指した創薬が始まった。近年の研究ではプレクリニカル期にはすでに低強度の炎症と考えられる病理学的所見が脳内で観察されており、加齢、細菌感染、神経障害、ストレスなど様々な原因により脳内炎症が惹起されている可能性が示唆され、AD 発症の真の原因として脳内炎症が注目されるようになってきた。特に脳内の組織マクロファージであるミクログリアは脳内炎症の惹起に中心的な役割を果たしていることがわかってきた。ミクログリアは多様な細胞集団を形成しており、脳内環境により脳保護的あるいは脳障害的に働き、疾患関連ミクログリアや炎症・抗炎症関連ミクログリアとして分類されている。すなわち、このような現状から、AD 治療薬の開発において適切な時期にミクログリアの機能を調節し脳内炎症の発症を抑制する、あるいは、炎症を収束させることが可能になれば、AD 発症を効果的に抑制あるいは遅延させることができると考えられ、新たな治療薬の重要な開発戦略になると考えられる。

2. 研究の目的

リガンド依存的に遺伝子転写を制御する核内受容体は、AD 治療薬を開発するための分子標的として、特に、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPAR)、肝 X 受容体 (LXR)、レチノイン酸受容体、及び、レチノイド X 受容体 (RXR) は精力的に研究が行われてきた。しかし、それらの合成アゴニストは重篤な副作用や脳への移行率の低さのため、治療薬としての開発には成功していない。特に合成 RXR アゴニストであるベキサロテン (Bex) は AD モデルマウスにおいて広範な研究が行われてきたが、認知機能の改善作用と A 沈着の減少作用に相関がなく、アミロイドカスケード仮説に基づく AD 改善作用はほぼ否定された。さらに、Bex は高頻度で高トリグリセリド (TG) 血症や甲状腺機能低下症などの重篤な副作用を引き起こし、AD 治療への応用は難しいと考えられてきた。しかし、「脳炎症仮説」の観点より治療薬の開発戦略を考えた際、RXR アゴニストは、神経細胞の成長促進作用、軸索突起の成長作用などに加え、抗炎症作用などを有しており、RXR は AD 治療薬開発のための重要な分子標的であると考えられた。そこで本研究では RXR アゴニストに焦点を絞り、これまでに当研究室で薬用植物ホオノキの地下部より得た magnaldehyd B の構造を基に合成した 6-hydroxy-3-(3-propyl-[1,1'-biphenyl])-3-propanoic acid (60HA) の生物活性の特徴を明らかにするとともに、ミクログリアに及ぼす作用を詳細に調べることで、効果的に脳内炎症を抑制する方法を確立するとともに安全性の高い薬物を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

RXR アゴニスト 60HA の生物学的特徴を調べるために、ミクログリア様 BV-2 細胞と MG5 細胞を用いて、60HA が遺伝子発現に及ぼす作用を RNA-seq 法、RT-qPCR 法等で詳細に調べた。両ミクログリア細胞株を用いて、リポ多糖、炎症性サイトカインなどが惹起する炎症反応に対する 60HA の作用を調べるとともに、それらの作用機序を解析した。60HA のバイオアベイラビリティを調べるために、60HA と Bex を単回経口投与した後に、経時的に血中及び脳内濃度を LC-MS/MS で測定した。RXR アゴニストに頻繁に見られる副作用を検討するために 60HA と Bex をマウスに 14 日間経口投与して、高 TG 血症や甲状腺機能低下症の発症に及ぼす影響について調べた。最後に近年開発された AD モデルマウスである APP^{NL-G-F} KI AD マウスの脳内炎症に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) ミクログリア様 MG5 細胞を 60HA あるいは Bex で 6 時間処理した後に細胞内の mRNA 発現に

及ぼす効果を RNA-seq で解析した。その結果、mRNA 発現量が 2 倍以上あるいは 1/2 以下に変動した遺伝子を Gene Ontology (GO) 解析したところ、両 RXR アゴニストで変動した多くの遺伝子は、脂質代謝や炎症反応に関連した GO term 「homeostatic process」「cell chemotaxis」「chemical homeostasis」に分類された。特に、60HA は Bex に比べ、「chemotaxis」「response to stimuli」に分類された遺伝子が多く、Bex に比べて炎症の惹起、収束に関連した遺伝子群の制御により深く関与している可能性が示唆された。また、KEGG 解析では、両 RXR アゴニストは「cytokine and cytokine signaling pathways」「diseases associated with chronic inflammation」「cancer」に関連した経路の遺伝子群の制御に関与していることがわかった。また、ミクログリアの機能に関連した遺伝子群に関して RT-qPCR 法で解析した結果、両 RXR アゴニストは食欲関連遺伝子 *Tgm2*, *Axl*, *Mertk*, *Cd36* 及び神経保護・炎症収束作用が期待される *Ccl6*, *Mt1/2* の mRNA 発現を増加させた。特に *Ccl6* 及び *Mt1/2* mRNA はミクログリア系細胞で発現が誘導されるという報告はなく、RXR アゴニストによる新たな炎症反応の制御機構が存在する可能性が示唆された。それらの作用は LXR や RAR アゴニストの共存下で増強された。

(2) 近年ケモカインの一つである CCL6 が炎症収束に関与している可能性が報告されたことから、60HA による *Ccl6* mRNA の発現誘導作用を検討した。その結果 60HA は RAR アゴニスト及び LXR アゴニストの共存下で *Ccl6* mRNA 量を相乗的に増加させ、RAR/RXR ヘテロダイマー、LXR/RXR ヘテロダイマーを介した作用であることが強く示唆された。さらに、60HA は GM-CSF あるいは IL-3 の共存下で *Ccl6* mRNA 量を相乗的に増加させ、核内受容体とサイトカインのシグナル伝達系のクロストークが *Ccl6* mRNA の発現誘導に関与していることが示唆された。In vivo における作用を検討したところ、60HA を C57BL/6 マウスに経口投与することにより 2~6 時間の早期に海馬、大脳皮質で *Ccl6* mRNA の発現量が増加することがわかった。さらに、APP^{NL-G-F} KI AD モデルマウスでは、正常マウスに比べて脳内での *Ccl6* mRNA 発現量が増加しており、60HA の経口投与によりそれらはさらに上昇し、炎症を収束するために発現が制御されている可能性が推察された。さらに、AD 患者及び AD モデルマウスの脳内において、GM-CSF や IL-3 の発現量が上昇していることが報告されていることより、RXR アゴニストの投与により脳内でそれらの相乗作用により炎症の収束が促進されることが示唆され、これまでにない新しい治療法の開発に繋がる可能性が考えられた。

(3) RXR アゴニストの抗炎症作用に関していくつかの報告はあるが、詳細な作用機序についての報告はない。そこで 60HA の抗炎症作用を詳細に調べた。その結果、60HA はリポ多糖 (LPS)、インターロイキン-1 (IL-1) などで刺激した BV-2 細胞で誘導される炎症性サイトカインや炎症メディエーター合成酵素の mRNA 産生を 0.01~1 μM の濃度で強く抑制し、その抑制作用は RXR アントゴニストで阻害された。さらにこの作用は LPS 及び IL-1 刺激後 30 分~1 時間で観察され、これまでの RXR アゴニストに関する報告にない作用であった。同様な作用は Bex でも 0.01~1 μM で観察され、60HA は Bex と同等な強度で抗炎症作用を示すことがわかった。一方、他の核内受容体 (PPAR / /、LXR、RAR、FXR、Nurr1) アゴニストではこのような短時間、低濃度で同様な抑制作用は見られず、60HA は RXR モノマーあるいは RXR ホモダイマーを介して炎症シグナル伝達系に作用して抗炎症作用を示すことが示唆された。また、60HA の作用機序を調べたところ、炎症性サイトカインの転写因子である NF- κB の核内移行に影響を及ぼさないこと、SUMO 化阻害剤により 60HA の IL-1 による炎症を抑制する作用が阻害されることなどから、60HA の抗炎症作用の機序の一部に PPAR や LXR で報告されているような transrepression による転写因子の阻害機構の存在が推測された。一方、60HA は BV-2 細胞及び MG5 細胞に対して、60HA 処理後 12~36 時間に *arginase-1*, *Ccl6*, *Ccl17*, *Ccl22* など、抗炎症あるいは炎症収束に働くと考えられる遺伝子の mRNA 量を増加させた。IL-4 が M2 ミクログリアに作用して、抗炎症性サイトカインやケモカインを誘導することは報告されているが、60HA が活性化する遺伝子は、*arginase-1* 以外は IL-4 が活性化する遺伝子群とは異なっていた。以上総合的に考えると、60HA は炎症の発症を極初期に抑制する作用と進行した炎症を早期に収束させる作用を併せ持つ、これまでの抗炎症剤で報告されていない炎症調節作用を有する可能性が示唆された。

(4) 60HA と Bex の薬物動態を比較検討するために、両 RXR アゴニストをマウス経口投与後、経時的に血液と大脳皮質を採取し、60HA と Bex の血清及び大脳皮質濃度を LC/MS/MS で分析した。60HA は重水素標識した 60HA を合成し内部標準として使用した。その結果、60HA は血清及び大脳皮質において投与 30 分後に、Bex は 2 時間後に T_{max} に達し、60HA の血清での C_{max} は 139nmol/ml、脳での C_{max} は 3.58nmol/g であり、それぞれ Bex の C_{max} の 6.6 倍と 1.9 倍であった。また、60HA の血清での AUC₀₋₆ は 177nmol·h/ml で Bex に比べ 2 倍ほど大きかった。一方、60HA の大脳皮質での AUC₀₋₆ は 4.63nmol·h/g で Bex の 65% 程度であり、60HA の血中から脳内への移行率は 2.62% で Bex より若干低かった。一方、投与 6 時間後の血清及び大脳皮質に残存する 60HA 及び Bex の濃度は、60HA がそれぞれ C_{max} の 12.2% と 11.3% であったのに対して、Bex は C_{max} の 50.2% 及び 49.4% であり、60HA は Bex に比べて体内から速やかに排泄されることが明らかになった。以上の結果より、60HA は Bex に比べて腸管で速やかに吸収された後、血中及び脳内でより高濃度に達し、遺伝子の転写を活性化できる RXR アゴニストであることがわかった。また、Bex に比べて体内に蓄積することが少ない安全性の高い RXR アゴニストであることがわかった。

(5)皮膚T細胞リンパ腫治療薬として臨床で使用されている Bex は、高頻度で高TG血症、甲状腺機能低下症などの重篤な副作用を引き起こすことが知られている。そこで、60HA と Bex を等モル濃度の用量で 14 日間 C57BL/6 マウスに経口投与して副作用の発症に及ぼす作用について調べた。その結果、Bex は有意に体重、肝臓重量、血清 TG 濃度を増加させるとともに、血清中の甲状腺刺激ホルモンと甲状腺ホルモン T4 量を低下させた。興味深いことに 60HA は Bex の様な作用は示さなかった。そこで Bex の副作用を誘発する作用機序を調べるために、肝臓の脂質合成系酵素の mRNA の発現を調べたところ、Bex 投与群ではステアロイル-CoA 不飽和化酵素-1 mRNA の有意な増加が観察され、TG 合成の促進が示唆された。また、Bex は核内受容体レチノイン酸受容体に対するアゴニスト活性を EC50 値 1 μ M 以下で示すこと、また、RXR アイソフォーム RXR の RXR に対する相対的なアゴニスト活性が Bex は 60HA に比べると高いこと、Bex は体外への排泄が遅く、血中及び脳内に長時間高濃度で保持されることなどが副作用の誘発に関与しており、逆に、それらの活性を示さない、あるいは、弱い活性しか示さない 60HA は Bex より安全性の高い RXR アゴニストであることが示唆された。

(6)4~25 ヶ月齢の AD 発症モデル APP^{NL-G-F} KI マウスを用いて、海馬と大脳皮質における炎症性サイトカインや貪食能、神経保護に関与する遺伝子の mRNA 発現量を調べたところ、炎症性サイトカインの mRNA レベルはこれまでの報告とは異なり、経時的に大きな変化が観察されなかったが、貪食能あるいは神経保護に関与する遺伝子の mRNA は 10 ヶ月齢以降で有意に増加した。そこで、15 ヶ月齢の APP^{NL-G-F} KI マウスに 60HA 及び Bex を単回経口投与し、mRNA 発現に及ぼす効果を検討したところ、60HA と Bex で *Cc16* と *Tgm2* mRNA 発現量の増加が、60HA では *Tgf* mRNA 発現量の増加が観察され、異物・死細胞の貪食能の亢進、神経保護作用、さらに、炎症の収束作用を示す可能性が推察された。

[結論]本研究を通して、新規 RXR アゴニスト 60HA は、合成 RXR アゴニストの Bex とほぼ同等の強度の RXR アゴニスト活性を有しているが、Bex とは異なり RAR アゴニスト活性を殆ど示さず、また、RXR に対するアゴニスト活性が低いといった特徴を持った RXR アゴニストであることがわかった。ミクログリア細胞の遺伝子発現に及ぼす効果を調べた結果より、60HA は Bex と同様な遺伝子群の発現制御に関与する一方、Bex とは異なる遺伝子群の発現制御に関与していることがわかった。脳内炎症に及ぼす作用を検討するために、ミクログリア細胞に対する 60HA の抗炎症作用を検討したところ、炎症の発症を極初期に抑制する作用と活性化された炎症反応を早期に収束する作用を併せ持ち、これまでの抗炎症剤で報告されていない炎症調節作用を有する可能性が示唆された。60HA の生物学的利用能を調べたところ、60HA は Bex に比べて腸管で速やかに吸収された後、血中及び脳内でより高濃度に達し、遺伝子の転写を活性化できる、体内に蓄積することが少ない RXR アゴニストであることがわかった。さらに、60HA は Bex が示すような副作用を誘発せず、安全性の高い AD 治療薬候補化合物であることが明らかになった。今後、各種 AD モデル動物での効果の検証とヒトでの効果の検証を行うことにより、これまででない低分子化合物の AD 治療薬の開発が実現する可能性が強く示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田浩嗣、坪井知恵、中島健一、山口英士、伊藤彰近、井上誠
2. 発表標題 新規レチノイドX受容体アゴニストのミクログリアに及ぼす作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田浩嗣、坪井智恵、中島健一、山口英士、伊藤彰近、井上誠
2. 発表標題 ミクログリア細胞における新規RXRアゴニストの抗炎症作用
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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