

アルツハイマー病治療薬としての非環式レチノイドのポテンシャル探索 (30-37)

主任研究者 小縣 綾 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (特任研究員)

研究要旨

レチノイドは、ビタミン A の活性本体である all-trans-レチノイン酸 (ATRA) とそれと同等の活性を示す化合物の総称である。ATRA は、生体内において、細胞の増殖・分化、生体の恒常性維持、形態形成に関わる重要な生体内ホルモンであり、日本においては白血病治療薬として用いられている。近年、ATRA を含むレチノイドに、アルツハイマー病に対する薬理効果が報告され注目を集めている。すなわち、レチノイドが標的とする核内受容体の活性化によって、アミロイド β の産生や凝集が減少し、さらに、マイクログリアの貪食能が亢進することが報告されている。しかし、ATRA は光に不安定であり容易に構造異性化するため、治療薬として有用性に乏しいと考えられる。そのため、類似の構造を有し化学的に安定な構造である非環式レチノイドのアルツハイマー病治療薬としてのポテンシャルを探索する。

今回、研究協力者らが ACR の ¹¹C 標識体の合成に成功した。そして、ラットおよびサルに ¹¹C 標識 ACR を投与後、陽電子断層撮像法 (PET) を実施したところ、高い脳内放射能を観察することができた。これは、ACR もしくはその放射性代謝物の高い脳内移行性を示唆するものであるが、血中・脳内における放射能を有する化合物の構造は明らかではないため、血中及び脳内における代謝物分析により検証する必要がある。さらに、ACR はアルツハイマー病に対して ATRA と同様の薬理作用があるか明らかではないため、本研究では ACR の脳内移行性と薬理作用を詳細に評価する。

主任研究者

小縣 綾 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 (特任研究員)

A. 研究目的

ATRA や ACR などのレチノイド類は、主にかん領域で抗癌剤として研究が進められている生体内ホルモンであるが、アルツハイマー病治療薬としての可能性も秘めている。特に、ATRA はアルツハイマー病モデルマウスにおいてアミロイド β の蓄積の減少

や認知機能の回復が認められている (Yun Ding, et al., *J. Neurosci.*, 2008)。ACR は、その ATRA と比較して光に対して化学的に安定な構造であり、安価で安定した供給が見込まれるため、ATRA と同等の薬理作用が認められれば、アルツハイマー病治療薬の候補化合物としてより有用である可能性があると考えられる。本研究では、ACR の脳内移行性と薬理作用を詳細に評価することで、ACR のアルツハイマー病治療薬としてのポテンシャルを探索することを目的とする。

B. 研究方法

本研究は以下の 3 つの項目について評価を実施する。本年度は、そのうち ACR の *in vitro* 評価について主に実施した。

1) ACR の ^{11}C 標識体を用いた PK 評価

過去、研究協力者らが ACR の ^{11}C 標識体を合成に成功している。そのため、この ^{11}C 標識 ACR をラット (CrI:cd(SD)rat, 9 週齢, male) 及びアカゲザル (放医研にて実施) に静脈投与し PET 撮像を実施することで、その脳内移行性を評価した。 ^{11}C 標識 ACR を SD ラットに投与後、経時的採血及び radio-HPLC を用いて血中及び脳内の代謝物を分析することで、脳内で観察された放射能が ACR に由来するかを同定した。

2) ACR の *in vitro* 薬理評価

ACR が他のレチノイド類と同等の薬理作用を示すか評価した。まず、幹細胞における神経細胞への分化誘導能を ATRA と同等に示すかを評価した。その後、初代培養神経細胞や器官培養細胞において幼若細胞の軸索の伸長やシナプス形成への影響、APP の切断パターンや α 及び β セクレターゼの遺伝子発現量への影響を検証する。

3) モデル動物を用いた薬理評価

脳出血モデルマウス及びパーキンソン病モデルマウスを用いて、ミクログリアを介した神経保護的な作用が ATRA と同等もしくはそれ以上の薬理効果を示すか、検討する (熊本大学)。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」や指針、ガイドラインに基づき、当センター動物実験取扱規定を遵守し、実施した。また、本研究における動物実験は国立長寿医療研究センター 実験動物倫理委員会の承認を得た (平成 31 年度承認番号 動 31-31)。

C. 研究結果

1) ACR の ^{11}C 標識体を用いた PK 評価

研究協力者らには、脳内への ACR の取り込み量の評価、部位特異的集積の有無の解明を目的とした ACR の ^{11}C 標識体合成に成功している。そのため、この ^{11}C 標識 ACR を SD ラ

ット (CrI:CD(SD)rat, 9 週齢, male, 257 g) 及びカニクイザル (放医研にて実施, male, 3.26 kg) に静脈投与し PET 撮像を実施することで、その脳内移行性を評価した。また、¹¹C 標識 ACR を SD ラットに投与後、経時的採血及び radio-HPLC を用いて血中及び脳内の代謝物分析を実施した。その結果、ラット及びカニクイザルにおいて高い脳移行性を示した (図 1)。脳内には血漿中と比較して、投与 60 分後において SD ラットでは約 1.3 倍、カニクイザルでは約 3.0 倍、放射性化合物が存在していることを示した。

しかし、ラットにおける経時的採血による血漿中代謝物分析の結果から、尾静脈投与 10 分後でほとんどの ¹¹C 標識 ACR が高極性化合物に代謝されていることが示された。また、脳内の代謝物分析から、尾静脈投与 30 分後において、ラット脳内では血漿中と同じ ¹¹C 標識 ACR の高極性化合物 (代謝物 A) のみが存在することが示された (図 2)。

現在、他施設 (岐阜薬科大学) と協力し、LC/MS/MS による代謝物 A の構造決定を実施している (図 2)。

2) ACR の *in vitro* 薬理評価

ACR が他の ATRA をはじめとするレチノイド類と同等の薬理作用を示すか評価した。まず、肝細胞における神経細胞への分化誘導能を ATRA と比較して評価するために、Ntera2 を培養し ATRA (10 μM) もしくは ACR (1.0-100 μM) を用いて、神経細胞への分化誘導が起こるか検証した。その結果、10 μM の投与で ATRA は ATRA と同様に神経細胞への分化誘導を確認できた。そして、ATRA および ACR で分化誘導した神経細胞において、NMDA に対する反応性が同等であることを、カルシウムイメージングによって確認した。

一方で、初代培養神経細胞や器官培養細胞において幼若細胞の軸索の伸長やシナプス形成への影響を検証中である。

一方、初代培養神経細胞や器官培養細胞において幼若細胞の軸索の伸長やシナプス形成への影響を検証中である。

3) モデル動物を用いた薬理評価

脳出血モデルマウス及びパーキンソン病モデルマウスを用いて、ミクログリアを介した神経保護的な作用が ATRA と同等もしくはそれ以上の薬理効果を示すか、検討するための

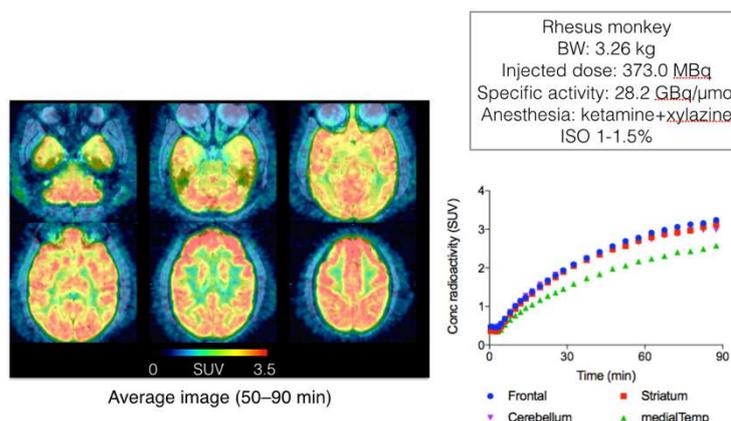


図 1. ¹¹C 標識 ACR サルイメーキング結果

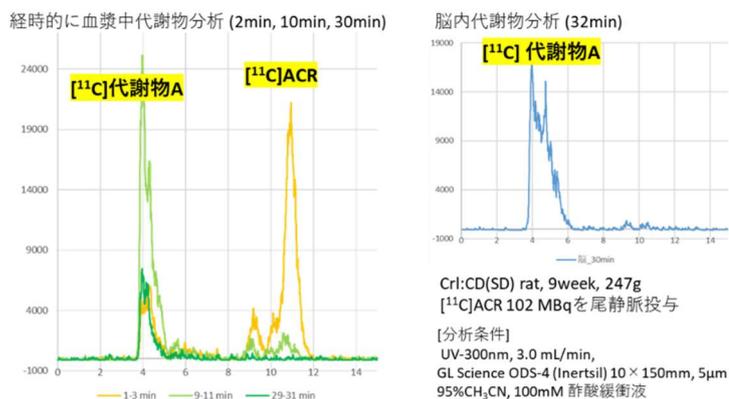


図 2. ¹¹C 標識 ACR 代謝物分析結果

協力を熊本大学から得た。モデル動物への投与量決定のため、まずそれぞれの組織モデルを用いて検討を行う。アルツハイマー病モデルについては、上記評価結果がポジティブであった場合に実施を検討する。

D. 考察と結論

^{11}C 標識 ACR をラット及びアカゲザルに静脈投与し、PET 撮像を実施したところ、脳内において高い脳内放射能が観察された。この結果から、ACR がヒトにおいても高い脳内移行性を有することが期待される。しかし、脳内で観察された放射能は ACR ではなく、より高極性な代謝物であった。ACR は静脈投与されると、すぐに高極性代謝物に代謝され、脳内に取り込まれることが示された。そのため、脳内にはほぼ存在しない ACR の薬理作用は薬の有効性を反映しない可能性があり、ACR のみを用いた *in vitro* 評価では不十分と考えられる。よって、ACR の脳内代謝物の構造決定および代謝物の合成、代謝物を用いた *in vitro* 評価を行い、ACR を疾患モデルマウスに慢性投与することで、ACR もしくは代謝物が薬理作用を示すのか検証する。一方で、ACR の *in vitro* での評価も実施しており、肝細胞における神経細胞への分化誘導能は ATRA 同様にあり、NMDA 受容体の発現もカルシウムイメージングによって確認できた。今後、生体内で代謝物に薬理効果はなく、ACR のみが薬理効果を示す可能性もあるため、引き続き *in vitro* における薬理評価を実施する。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

非標識 ACR が既知化合物であるため、物質特許の取得はできないが用途特許もしくは ^{11}C 標識化合成方法で特許出願を検討している。