

長寿医療研究開発費 2020年度 総括研究報告（総合報告）

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、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、更にミクログリアの貪食能が亢進することが報告されたのをはじめ、ATRA を含むレチノイドは、アルツハイマー病に対して薬理効果を示すことが報告され注目を集めている。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、本研究では、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 (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。

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）

研究協力者

木村 泰之 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部（室長）

古山 浩子 国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部（外来研究員）

鈴木 正昭 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）

木村 哲也 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（室長）（2018-2019年度）

木村 展之 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（室長）（2018-2019年度）

呼和 哈斯 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部（流動研究員）（2018年度）

研究期間 2018年4月1日～2021年3月31日

A. 研究目的

ATRA や ACR などのレチノイド類は、主なが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)。

一方で、ACR は 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。そのため、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な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。過去、研究協力者である鈴木らは、ATRA をはじめとする複数のレチノイドの ^{11}C 標識体合成に成功している。そのため、脳移行性の評価については ACR の ^{11}C 標識体合成を実施し、ラットおよびサルにおいて陽電子断層撮像法 (PET) を用いて評価する。

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した。

1) ACR の ^{11}C 標識体を用いた PK 評価 (2018~2019年度)

過去、研究協力者らが ACR の ^{11}C 標識体の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, 8-9 週齢, male) 及びアカゲザル (放医研にて実施) に尾静脈投与し PET 撮像を実施することで、その脳内移行性を評価した。

加えて、ラットにおいては ^{11}C 標識 ACR を投与後、経時的に採血を実施し、radio-HPLC を用いて血中及び脳内の放射性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 (2019~2020年度)

ACR が他のレチノイド類 (ATRA) 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 と比較してどの程度示すかを評価した。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について検証した。

3) モデル動物を用いた薬理評価 (2020年度)

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、検討した (熊本大学にて実施)。

(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 30 年度承認番号 動 30-13、平成 31 年度承認番号 動 31-31、令和 2 年度承認番号 動 2-47）。

C. 研究結果

1) ACR の ^{11}C 標識体を用いた PK 評価

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 標識体合成を実施した。そして、合成した ^{11}C 標識 ACR をラット (CrI:CD(SD)rat, 8-9 週齢, male) 及びカニクイザル (放医研にて実施, male, 3.26 kg) に尾静脈投与し 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、 ^{11}C 標識 ACR をラットに投与後、経時的に採血を実施し、radio-HPLC を用いて血中及び脳内の放射性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 ^{11}C 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(図 2)。また、尾静脈投与 30 分後における脳内の代謝物分析では、脳内には血漿中と同じ ^{11}C 標識 ACR の高極性化合物 (代謝物 A) のみが存在していることが示された。

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 の構造決定を進めている。

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を評価するため、幹細胞における神経細胞への分化誘導能を示すかを評価し、ATRA と比較した。まず、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

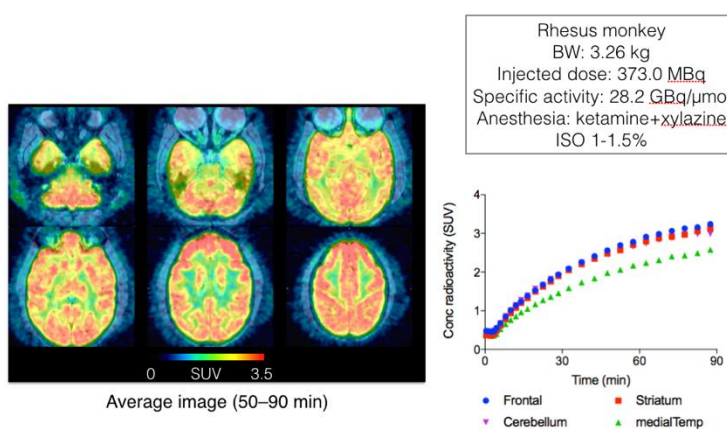


図 1. ^{11}C 標識 ACR サルイメーシング結果

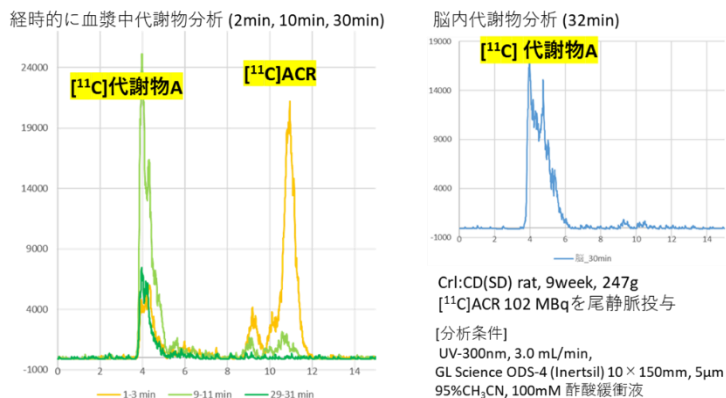
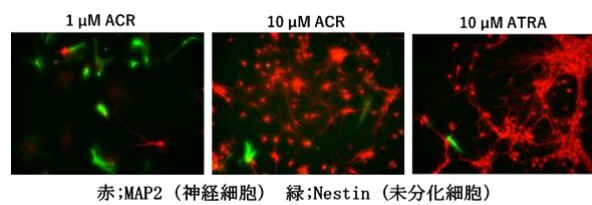


図 2. ^{11}C 標識 ACR 代謝物分析結果

ところ、10 μ M の投与で ACR は ATRA と同様に神経細胞への分化誘導を確認できた(図 3)。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。



赤:MAP2 (神経細胞) 緑:Nestin (未分化細胞)
図 3. 神経細胞への分化誘導能の検証

また、初代培養神経細胞において、ACR による APP の切断パターンへの影響を検証したところ、現状では初代培養神経細胞において、ATRA 及び ACR による APP の切断パターンの有意な変化は観察されなかった。

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、検討を進めている(熊本大学)。また、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予定である。

D. 考察と結論

本研究では、生体内ホルモンであるレチノイド類の一種である ACR が経口投与可能なアルツハイマー病治療薬となることを期待して、ACR の脳内移行性及びアミロイド β の蓄積の減少、認知機能の回復などのアルツハイマー病病理への影響や薬効を評価した。

脳内移行性を評価するため、 ^{11}C 標識 ACR を合成し、ラット及びアカゲザルに尾静脈投与し、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。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ため、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。

一方で、*in vitro* での評価において、ACR も ATRA 同様に幹細胞から神経細胞への分化誘導能が確認され、カルシウムイメージングによって NMDA 受容体の発現も確認された。しかし、初代培養神経細胞において、ACR による APP の切断パターンへの影響を検証したところ、現状では初代培養神経細胞において、ATRA 及び ACR による APP の切断パターンの有意な変化は観察されなかった。そのため、ACR は ATRA 同様に分化誘導能を有するが、アルツハイマー病病理への影響を示す *in vitro* 評価結果は得られなかった。

そのため、今後は 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* 評価を行うとともに、*in vivo* では 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。良好な結果が得られれば、ACR は安価で安定した供給が見込めるアルツハイマー病治療薬候補となり、アルツハイマ

一病の根本治療薬開発に極めて有用な情報となりうる。

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

2020年度

- ・ [11C]標識非環式レチノイド、中枢神経系活性化剤及びそれらの製造方法
発明者：鈴木正昭、伊藤健吾、木村泰之、小縣綾、池沼宏、木村哲也、木村展之、
古山浩子、石井英樹、張明栄、河村和紀、南本敬史、永井裕司、香月博志

出願日：2020年11月20日

出願番号：2020-193167

出願人：国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし