

実験的ラット神経傷害モデルの確立とアルツハイマー病治療薬
およびその候補物質の効果に関する薬理学的研究

2015年

野下 敬史

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。なお、報文内容の転載許可は、各出版社から取得済みである。

- 1) Effect of nicotine on neuronal dysfunction induced by intracerebroventricular infusion of amyloid- β peptide in rats. Takafumi Noshita, Norihito Murayama, Shizuo Nakamura, Eur Rev Med Pharmacol Sci. 19, 334-343, 2015 [第1章]
- 2) Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. Shizuo Nakamura, Norihito Murayama, Takafumi Noshita, Ryoko Katsuragi, Tomochika Ohno, Eur J Pharmacol. 548, 115-22, 2006 [第2章]
- 3) Effect of bFGF on neuronal damage induced by sequential treatment of amyloid β and excitatory amino acid *in vitro* and *in vivo*. Takafumi Noshita, Norihito Murayama, Tetsushi Oka, Ryoko Ogino, Shizuo Nakamura, Eur J Pharmacol. 695, 76-82, 2012 [第3章]

目次

緒言.....	4
第1章　A β 誘発ラット神経傷害モデルにおけるニコチンの効果.....	6
第1節　緒言.....	6
第2節　実験材料および方法.....	7
(1) 動物.....	7
(2) A β ₁₋₄₂ 誘発神経傷害モデルの作製.....	7
(3) 薬物の投与.....	7
(4) モリス式水迷路試験.....	7
(5) 受動的回避学習試験.....	8
(6) 脳組織の分取.....	8
(7) ChAT 活性.....	9
(8) HC-3 結合能.....	9
(9) 統計学的解析.....	9
第3節　実験結果.....	10
第1項 ラット神経傷害モデルにおけるニコチンの効果.....	10
(1) モリス式水迷路試験.....	10
(2) 受動的回避学習試験.....	12
(3) ChAT 活性.....	12
(4) HC-3 結合能.....	13
第4節　考察.....	15
第5節　小括.....	17
第2章　A β および興奮性アミノ酸によって誘発される神経傷害モデルの構築.....	18
第1節　緒言.....	18
第2節　実験材料および方法.....	19
(1) 動物.....	19
(2) 神経細胞の調製.....	19
(3) 培養細胞における神経細胞死の評価.....	19
(4) A β ₁₋₄₀ およびイボテン酸誘発神経傷害モデルの作製.....	19
(5) 薬物の投与.....	20
(6) モリス式水迷路試験.....	21
(7) PTBBS 結合能.....	21
(8) 組織学的検索.....	21

(9) 統計学的解析.....	21
第3節 実験結果.....	22
第1項 A β およびグルタミン酸により誘起される神経細胞傷害.....	22
第2項 A β およびイボテン酸により誘起されるラット神経傷害.....	22
(1) モリス式水迷路試験.....	22
(2) PTBBS 結合能.....	24
第3項 ラット神経障害モデルにおけるメマンチンおよび MK-801 の効果.....	24
(1) メマンチンの効果.....	24
(2) MK-801 の効果.....	25
第4節 考察.....	30
第5節 小括.....	32
第3章 A β /興奮性アミノ酸誘発ラット神経傷害モデルにおける bFGF の効果.....	33
第1節 緒言.....	33
第2節 実験材料および方法.....	34
(1) 動物.....	34
(2) 神経細胞の調製.....	34
(3) 培養細胞における神経細胞死の評価.....	34
(4) A β ₁₋₄₀ およびイボテン酸誘発神経傷害モデルの作製.....	34
(5) 薬物の投与.....	34
(6) モリス式水迷路試験.....	34
(7) PTBBS 結合能.....	34
(8) ChAT 活性.....	34
(9) HC-3 結合能.....	34
(10) 統計学的解析.....	35
第3節 実験結果.....	36
第1項 <i>In vitro</i> 試験.....	36
第2項 ラット神経傷害モデルにおける bFGF の効果.....	37
(1) モリス式水迷路試験.....	37
(2) 生化学的試験.....	39
第4節 考察.....	40
第5節 小括.....	42
総括	43
謝辞	44
引用文献	45

なお、本文中および図表中で用いた略号は以下のとおりである。

A β :	Amyloid β
ACh:	Acetylcholine
AD:	Alzheimer's disease
APP:	Amyloid precursor protein
bFGF:	Basic fibroblast growth factor
ChAT:	Choline acetyltransferase
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
HC-3:	Hemicolinium-3
HBSS:	Hanks' balanced salt solution
MTT:	Thiazolyl blue tetrazolium bromide
nAChR:	Nicotinic acetylcholine receptor
NMDA:	N-methyl-D-aspartate
PTBBS:	Peripheral type benzodiazepine binding site

緒言

アルツハイマー病 (AD) は認知症の一つであり、潜行性に発症し緩徐に進行する神経変性疾患である [1, 2]。AD の罹患率は加齢とともに増加し、2010 年の報告では全世界で 3,500 万人以上が罹患しているとされる [3]。AD における中核的な症状の一つは記憶障害であり、発症初期にはエピソード記憶 (ある特定の時間・空間に起こった生活や社会的出来事の記憶) が障害され、次いで意味記憶 (知識に相当する記憶) にも徐々に障害が及ぶが、手続き記憶 (意識には上らない技能の記憶) は比較的末期まで障害を免れる [4]。AD 患者では、これらの記憶障害に続き、空間認知障害、言語障害、計算障害等の認知機能障害が加わってくる [4]。AD に特徴的な病理所見としては神経細胞死に基づく脳組織の萎縮があり、また組織学的な変化としては神経原線維変化や老人斑と呼ばれるアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の蓄積が挙げられる [5]。これらの病理学的変化は内嗅皮質や海馬に始まり、側頭葉皮質や頭頂葉皮質、その後、前頭葉皮質に広がっていくことが明らかとなっており [6]、この病変部の進展は AD の症状の変化に対応している。

AD の脳においては、アセチルコリン (ACh) の合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の活性低下 [7, 8] や、ACh 量の減少 [9, 10] が知られており、従来、本疾患の病態に ACh の産生不全が関わると考えられてきた (コリン仮説)。一方、グルタミン酸は、脳における主要な興奮性神経伝達物質の一つであるが、AD においては、その受容体の一つである N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体が過剰に活性化されており、病態との関わりが示唆されている (グルタミン酸仮説)。実際に AD 患者では、脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が増加しており [11]、また AD 患者の死後脳ではグルタミン酸トランスポーターの発現が低下している [12]。さらに、 $A\beta$ は、AD 患者の脳において老人斑として蓄積することから、AD の病態形成に深く関与していると考えられている ($A\beta$ 仮説) [13, 14]。この仮説を支持する知見として、家族性 AD 患者において $A\beta$ の生成に関わる $A\beta$ 前駆蛋白質 (amyloid precursor protein, APP) や、 γ -セクレターゼ複合体の活性中心を形成するプレセニリンの遺伝子に変異が見出されている。

AD の治療薬は上述した 3 つの仮説に基づき開発されてきた。コリン仮説に対しては、ACh の分解を抑制することによりコリン作動性神経を賦活化するコリンエステラーゼ阻害薬 (ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン) が上市され広く使用されている。また、グルタミン酸仮説を基に、グルタミン酸の受容体の一つである NMDA 受容体遮断薬 (メマンチン) が開発され、AD に適用されている。さらに現在、AD の治癒や寛解を目指し、 $A\beta$ 仮説による、 $A\beta$ や関連する蛋白質を標的とした薬剤や神経細胞保護因子の臨床開発が行われている [15]。

これまでに、多種多様な AD の動物モデルが報告されているが、完全に AD の病態を反映した動物モデルは存在しない [16]。近年、 $A\beta$ に関連した遺伝子変異の情報を基に遺伝子改変動物が作製され、動物疾患モデルとして汎用されている [17]。しかしながら、このような遺伝子改変動物では、進行性の $A\beta$ の蓄積やアミロイド血管症やアストロサイトの増加、グリオシス、軽度な海馬の萎縮、および認知機能障害は認められるものの、AD 患者に見られるような顕著な神経細胞の脱落は観察されない [16]。ま

た、これらの遺伝子改変動物はあくまで家族性 AD のモデルであって、AD の 90 % 以上を占める孤発性 AD を必ずしも反映しているとは言えない。さらに、遺伝子改変動物は、維持や繁殖の煩雑さを考えると、治療薬のスクリーニング系として多用するには限界がある。一方、古くから AD の動物モデルとして使用されてきたものとして、老化モデルと神経傷害モデルがある。老化モデルとしては、24 カ月齢を越えた Fischer344 系雄性ラットを用いるものや老化促進モデルマウスなどが知られている [18, 19]。老化モデルは AD の危険因子である老化により自然発生し加齢依存性の行動異常や神経化学的变化を示すが、加齢自体に時間を要することや疾患特異的な変化は認められないことなどの問題点がある。神経傷害モデルとしては、A β やストレプトゾドシンを脳内に注入するものやコリン仮説に基づいて作製された前脳基底部破壊ラットなどが知られている [20, 21]。神経障害モデルは正常動物から作製可能で、認知症に関連した部位の変性を惹起することができるが、逆に脳全体的に多様な病理変化を再現することは出来ない。

動物モデルにおいて記憶とその過程である学習を評価する手法は多数報告されている [22]。モリス式水迷路試験は、動物が円形の水槽の水面下に隠されたプラットフォームを探索し記憶する能力を評価する試験である [23, 24]。本評価では周囲の景色を手掛かりにした連想的小および空間的な学習と記憶が評価でき、また本評価における学習・記憶機能は海馬依存的であることが示されている [25]。一方、受動的回避試験は、動物が電気ショックを避けるためにチャンバーの移動を回避することを学習・記憶する試験で、海馬に依存した連想的学習・記憶機能を評価することができる [26]。これら 2 つの学習・記憶実験は、AD 患者で見られる海馬に関連した学習・記憶障害を評価できると考えられることから、AD モデルの行動評価系として広く用いられている。実際に多くの AD の動物モデルにおいて、モリス式水迷路実験や受動的回避実験における障害が認められることが報告されている [22]。

本研究では、現在使用されている AD 治療薬が必ずしも十分満足されていないことや、その原因の一端が AD の動物モデルが必ずしも適切でないことを鑑み、新たな動物モデルの構築を試みるとともに、既存の AD 治療薬やその候補物質の評価を行った。まず第 1 章では、A β を脳内に注入することによって惹起したラット神経傷害モデルを用い、ニコチン性 ACh 受容体 (nAChR) 作動薬であるニコチンの効果を 2 つの行動試験 (モリス式水迷路および受動的回避学習評価) と生化学的試験により検討し、ニコチンがコリン作動性神経の機能亢進を介して学習・記憶障害を改善することを明らかにした。第 2 章では、A β および興奮性アミノ酸が、*in vitro* および *in vivo* において相乗的な神経細胞傷害作用を示すことを明らかにした上で、A β と興奮性アミノ酸を組み合わせる新たなラット神経傷害モデルを作製した。さらに、このラット神経傷害モデルを用いて、既存薬であるメマンチンが神経傷害および学習・記憶障害を改善することを確認した。第 3 章では、basic fibroblast growth factor (bFGF) が同様に同モデルにおける神経傷害と学習・記憶障害に対して有効であることを示した。本研究で得られた知見は、A β と興奮性アミノ酸の併用によって惹起する神経細胞傷害モデルの有用性を示すとともに、メマンチンに加え、ニコチンおよび bFGF が AD 治療薬としての可能性を有していることを示唆するものである。

第1章 A β 誘発ラット神経傷害モデルにおけるニコチンの効果

第1節 緒言

ADのコリン仮説では、ADの病因にAChの産生不全が関与すると考えられている。AChの受容体にはイオンチャネル型と代謝調節型の2種が存在し、各々に対してニコチンとムスカリンが作動薬として作用することから、ニコチン受容体 (nAChR) およびムスカリン受容体と呼ばれている。nAChRはイオンチャネル型受容体、一方ムスカリン受容体は代謝調節型受容体であり、いずれも中枢および末梢神経系に広く発現している。nAChRは5つのサブユニットで構成される5量体として機能し、これまでに α ($\alpha 1 - \alpha 10$)、 β ($\beta 1 - \beta 4$)、 γ 、 δ 、 ϵ の17種のサブユニットが同定されている [27-30]。一方、ムスカリン受容体には5種類のサブタイプ (M1-5) が存在する。

nAChR作動薬であるニコチンはタバコの葉に含まれる天然物質である。コリン仮説に加え、ADの発症と喫煙との間に負の相関があるとの報告に基づき [31]、古くからADを対象としたニコチンの臨床試験が進められてきた。しかし、ニコチンがAD患者における認知機能を亢進したという報告がある一方 [32]、ほとんど改善効果を示さなかったとする報告もあり [33]、ニコチンのAD治療薬としての有用性は必ずしも結論付けられていない。なお、非臨床研究においてニコチンは、種々の刺激によって誘発される神経細胞傷害に対し保護活性を示すだけでなく [34, 35]、ADの遺伝子改変動物モデル (変異型APPを発現するトランスジェニックマウス) を用いた検討において、nAChRの発現を亢進し行動障害を改善することなどが報告されている [36]。

本章では、ラット神経傷害モデルにおける学習・記憶障害に対するニコチンの効果をモリス式水迷路試験および受動的回避試験により検討した。ラット神経傷害モデルとしては、A β を3日間脳室内投与することによりコリン作動性神経傷害や学習・記憶障害が進行的に増悪化するモデル [37]を用いた。その結果、ニコチン (A β 注入開始の3週間後から1日1回、0.2 mg/kgの用量で9週間腹腔内投与) は、同モデルにおける学習・記憶障害を改善し、その作用にはコリン作動性神経の機能亢進が関与していることが示唆された。本知見は、ニコチンがAD治療に有効であることを支持するとともに、その作用メカニズムの一端を提示するものである。

第2節 実験材料および方法

(1) 動物

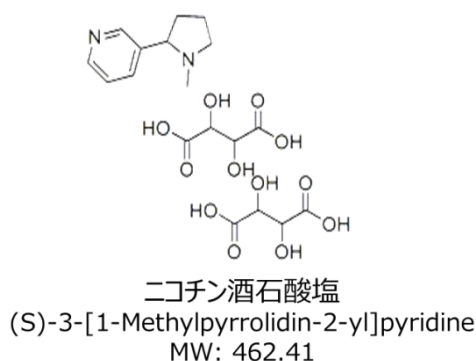
本研究における動物実験は、アスピオファーマ株式会社（その前身であるサントリー株式会社生物医学研究所等を含む）の動物実験実施基準に従い、また、同社の動物倫理委員会において承認を受けた上で実施した。雄性 F344/DuCrj ラット（試験開始時 18 週齢、320-360 g）はチャールズリバー株式会社より入手し実験に供した。動物は 12 時間毎の明暗周期（午前 7 時から午後 7 時までが明期）の下で飼育し、餌と水は常に自由に摂取させた。行動実験はすべて午前 8 時 30 分から午後 4 時 30 分の間に行った。

(2) A β ₁₋₄₂ 誘発神経傷害モデルの作製

A β ₁₋₄₂ 誘発神経傷害モデルは A β ₁₋₄₂（ANASPEC 社）を滅菌蒸留水に溶解して 1 mg/ml 溶液を調製し、雄性 F344/DuCrj ラットの右側脳室（ブレグマより、後方 1.2 mm、右方 1.5 mm、深さ 4.0 mm）に注入することにより作製した。なお、A β ₁₋₄₂ 溶液の注入は、ラットをペントバルビタール（40 mg/kg, i.p.）麻酔下で脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨露出後、ブレグマ-ラムダを水平にして、上記部位にガイドカニューレを挿入し、osmotic mini-pump（Alzet 1003D, Alza 社）を用いて、20 μ g/body の用量で 3 日間に亘って持続的に行った。偽手術群にはガイドカニューレの挿入のみを行った。

(3) 薬物の投与

ニコチン酒石酸塩（(S)-3-[1-Methylpyrrolidin-2-yl]pyridine, RBI 社、以下ニコチン）は生理食塩水に溶解し、A β ₁₋₄₂ 脳室内注入開始の 3 週間後から行動試験の最終日まで、0.2 mg/kg の用量で 1 週間に 5 日（月～金）、1 日 1 回、腹腔内投与した。このニコチンの用量は、過去に実施された薬理試験結果を参考に設定した [38]。対照群（Vehicle 群）にはニコチン溶液の代わりに生理食塩水を同様に投与した。



(4) モリス式水迷路試験

モリス式水迷路試験は既報 [23] に従って実施した。水迷路装置としては、直径 132 cm、高さ

60 cm のステンレススチール製の円筒状水槽に深さ 45 cm までスキムミルク (0.8 kg) を溶かした乳白色の水 (温度 $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) を満たした上で、水槽を 4 等分したいずれかの四分円の中央の水面下 2 cm にアクリル製のプラットフォーム (直径 10 cm) を設置したものをを用いた。水槽の周りには、ラットの視覚的な手がかりとなるカレンダー、ケージ、コンピューター、白黒の図形などを配置し、実験期間を通じてこれらの位置は固定し、また、プラットフォームの位置も獲得試行の間は一定とした。水槽壁にはラットを入水させる出発点を東西南北の位置に計 4 箇所設定した。

獲得試行は、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 注入 87 日後より 1 日 4 試行、連日 4 日間実施した。各試行では、ラットを出発点の一つから水槽内に入水させ、ラットがプラットフォームへ到達するまでの時間 (逃避潜時; escape latency) を測定した。ラットはプラットフォーム上に 10 秒間放置した後、ケージに戻した。ラットが 120 秒以内にプラットフォームに到達できなかった場合は、その時点で試行終了とし、逃避潜時は 120 秒とした。同日内の 4 試行は 60 秒間隔で行い、各入水の際には準無作為の順に 4 箇所すべての出発点を用いた。

保持試行は、最終獲得試行が終了した 2 時間後以降に実施し、プラットフォームを除去して再度 60 秒間水槽内を泳がせ、プラットフォームのあった場所を横切る回数 (annulus crossings) を測定した。

両試行における水槽内でのラットの行動は、video tracking system (VIOS-88, Bio-medica 社) を用いて記録し、コンピューター (PC-9801, NEC) を用いて escape latency および annulus crossings 解析した。

(5) 受動的回避学習試験

受動的回避学習試験は、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 注入の 80 日後より step-through 型の実験装置を用いて行った。同装置は明室 (縦 20 cm、横 10 cm、高さ 15 cm) と暗室 (縦 25 cm、横 25 cm、高さ 25 cm) から構成され、両部屋は板で仕切り、また床には電気ショックを与えるためのグリッドを設置した。

獲得試行では、ラットを明室に配置し、その後暗室との間の仕切り板を取り外しラットが自由に暗室に移動できるようにした。ラットが暗室に入ると、仕切り板を閉じて、グリッドに逃避不能な 0.6 mA、3 秒間の電気ショック (Shockgenerator-Scrambler, Bio-medica 社) を与えた。この訓練はラットが明室に 150 秒留まるまで実施し、ラットが電気ショックを受けた回数を学習能力の指標として記録した。

保持試行は、獲得試行の 96 時間後に実施し、明室にラットを配置してからラットが暗室に入るまでの反応潜時 (step-through latency) を計測し記憶能力の指標とした。ただし反応潜時は最大 300 秒とし、300 秒以内に暗室に入らない場合はその時点で試験を終了した。

(6) 脳組織の分取

すべての行動薬理実験が終了した後に、ラットをペントバルビタールにより安楽死させ、その直後に前部大脳皮質、後部大脳皮質、海馬、線条体を分取して、 -80°C に冷凍保存し ChAT 活性および hemicholinium-3 (HC-3) 結合能の測定に供した。

(7) ChAT 活性

ChAT 活性の測定は Fonnum らの方法 [39]に従って実施した。まず、脳組織サンプルを 20 倍容量の氷冷した 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 緩衝液 (pH 7.4, 0.5% Triton X-100 を含む) を用いてホモジナイズした。この組織ホモジネート液 (蛋白量として約 70 µg) に、10 µM (以下、濃度はすべて最終濃度) [^{14}C]-acetyl coenzyme A (Acetyl CoA; 148.0 MBq/mmol, NEN 社)、25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)、600 mM sodium chloride、40 mM EDTA、100 µM physostigmine、8 mM choline bromide、200 µM acetyl CoA を加え全量を 100 µl とした後、37°C で 30 分インキュベートした。その後、10 mg のテトラフェニルほう素を含む 2 ml のアセトニトリルおよび 10 ml のシンチレーション混合液を加えて [^{14}C]-ACh を抽出した。ChAT 活性は、抽出液中の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより求め、nmol/mg/mg protein/h の単位に換算した後、偽手術群との比で表示した。

(8) HC-3 結合能

HC-3 結合の測定は Manaker ら [40] の方法に従って実施した。脳組織サンプルを 20 倍容量の氷冷した 10 mM sodium-potassium phosphate 緩衝液 (pH 7.4) を用いてホモジナイズした。組織ホモジネート液は、結合反応液 (最終組成は 150 mM NaCl、2 nM [^3H]-HC-3、 ± 10 µM unlabeled HC-3) を加えて全量を 200 µl とし、25°C で 30 分間インキュベートした。インキュベーション後、直ちに反応混合液を 0.1% polyethylenimine に予め浸したグラスファイバーフィルター (GF/B) を用いてろ過し、氷冷した 5 ml の上記緩衝液で 3 回洗浄した。 [^3H]-HC-3 の結合能は、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定することにより求め、fmol/mg protein の単位に換算した後、偽手術群との比で表示した。

(9) 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計学的解析は、モリス式水迷路試験の獲得試行については二元配置分散分析、その他の測定については一元配置分散分析を行った後、Dunnett's test (SAS System Release 9.2) により行い、 $p < 0.05$ 以上のデータを統計学的に有意差があると判断した。

第3節 実験結果

第1項 ラット神経傷害モデルにおけるニコチンの効果

(1) モリス式水迷路試験

モリス式水迷路試験の結果を Fig. 1 に示す。A β を脳室内に注入した群 (●) では、偽手術群 (○) に対し、いずれの測定日においても escape latency (逃避潜時) が有意に延長し、学習障害が誘導されたことが確認された (Fig. 1A)。ニコチン (0.2 mg/kg) を A β 注入開始の3週間後から9週間、1日1回、1週間に5日間腹腔内投与した群 (□) では、獲得試行3日目、4日目の escape latency の延長が有意に抑制された (Fig. 1A)。最終獲得試行終了の2時間後に行った保持試行において、A β を脳室内に注入した群 (Vehicle 群) では、偽手術群 (Sham 群) に対し、annulus crossing (プラットフォーム位置の横切り回数) が有意に低下したことから、記憶障害が生じていることが確認された (Fig.1 B)。ニコチンを投与した群 (Nicotine 群) の annulus crossing は Vehicle 群に対して高値を示し、ニコチンが本モデルにおける記憶障害を改善する可能性があることが示された (Fig. 1B)。

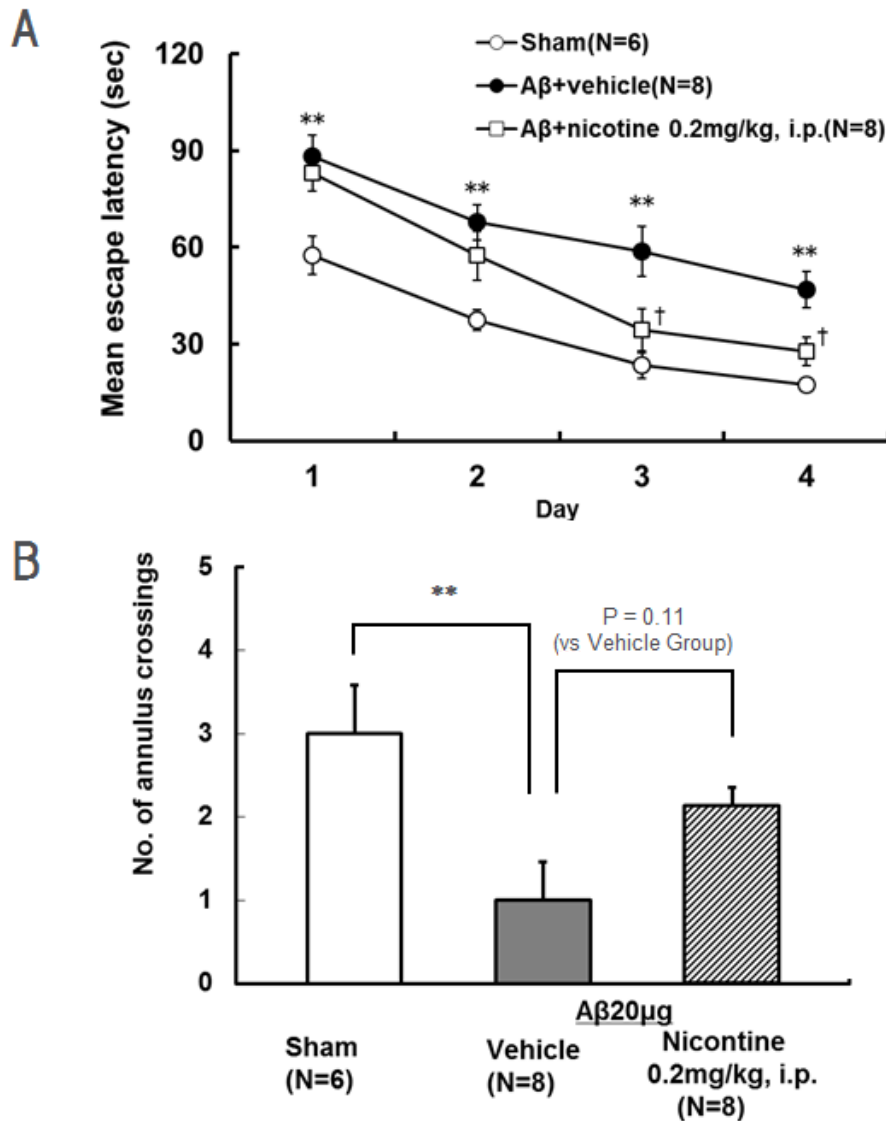


Fig. 1 Effect of nicotine on learning and memory deficit in Morris water maze performance in rat cognitive dysfunction model induced by intracerebroventricular infusion of Aβ₁₋₄₂

Aβ₁₋₄₂ (20 μg) was continuously infused into right ventricle for 3 days by attachment of an infusion kit to an osmotic mini-pump. Nicotine (0.2 mg/kg, i.p.) was administered once a day, 5 days a week, beginning 3 weeks after the start of Aβ₁₋₄₂ infusion until the last day of behavioral assessment. A: Acquisition trials were performed for 4 days on days 87–90 after the start of Aβ₁₋₄₂ infusion. B: A probe trial was conducted for 60 s at 2 h after the final acquisition test. Data represents the mean ± S.E.M. Number of rats used is indicated in parentheses. ** $p < 0.01$ vs Sham, † $p < 0.05$ vs Vehicle (Dunnett's test)

(2) 受動的回避学習試験

受動的回避学習試験の結果を Fig. 2 に示す。A β 注入開始の 80 日後に行った獲得試行において、A β を脳室内に注入した群 (Vehicle 群) と偽手術群 (Sham 群) の間では、電気ショックを受けた回数の差異は認められず (Fig. 2A)、本試験では A β 注入による学習障害惹起は確認されなかった。また、ニコチン (0.2 mg/kg) を A β 注入開始の 3 週間後から 9 週間、1 日 1 回、1 週間に 5 日間腹腔内投与した群 (Nicotine 群) では、電気ショック回数に顕著な変化は認められなかった (Fig. 2A)。84 日後に行った保持試行においては、A β を脳室内に注入した群 (Vehicle 群) では、偽手術群 (Sham 群) と比較して、有意差は認められなかったものの、step-through latency (反応潜時) が短縮する傾向が見られ (Fig. 2B, $p=0.28$)、軽微な記憶障害が生じていると考えられた。この step-through latency の短縮に対し、ニコチンを投与した群 (Nicotine 群) では改善傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 1B, $p=0.11$)。

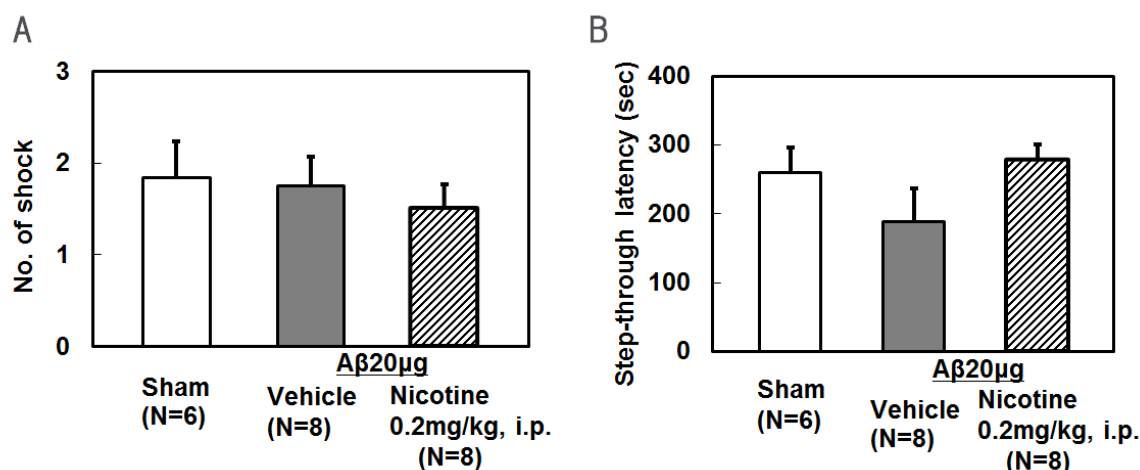


Fig. 2 Effect of nicotine on learning and memory deficit in passive avoidance performance in rat cognitive dysfunction model induced by intracerebroventricular infusion of A β ₁₋₄₂

A β ₁₋₄₂ (20 μ g) was continuously infused into right ventricle for 3 days by attachment of an infusion kit to an osmotic mini-pump. Nicotine (0.2 mg/kg, i.p.) was administered once a day, 5 days a week, beginning 3 weeks after the start of A β ₁₋₄₂ infusion until the last day of behavioral assessment. The acquisition and retention trials were performed 80 days and 84 days after the start of A β ₁₋₄₂ infusion, respectively. A: Number of shocks during an acquisition trial. B: Step-through latency during a retention trial. Each column represents the mean \pm S.E.M. Numbers of rats used are shown in parentheses. (Dunnett's test)

(3) ChAT 活性

A β の注入開始から 90 日後に分取した脳組織を用い ChAT 活性を測定した結果を Fig. 3 に示す。A β を脳室内に注入することにより (Vehicle 群)、前部大脳皮質、後部大脳皮質および海馬の ChAT 活性は偽手術群 (Sham 群) と比較してほとんど変化しなかったが (Fig. 3A, B, C)、線条体の ChAT 活性は軽微ではあるが有意に低下した (Fig. 3D)。ニコチン (0.2 mg/kg) を A β 注入開始の 3 週間

後から9週間、1日1回、1週間に5日間腹腔内投与することにより (Nicotine 群)、線条体の ChAT 活性の低下は回復せず (Fig. 3D)、また、前部大脳皮質、後部大脳皮質および海馬の ChAT 活性にも影響を及ぼさなかった (Fig. 3A, B, C)。

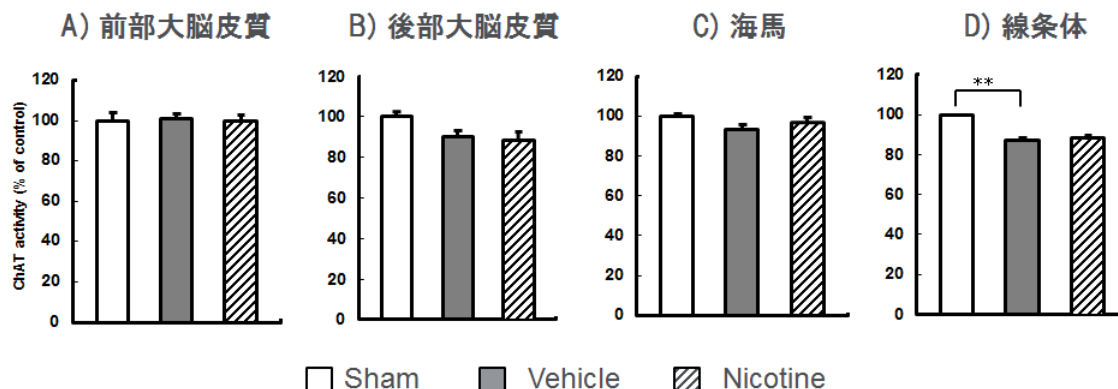


Fig. 3 Effect of nicotine on ChAT activity in various regions of the brain in rat cognitive dysfunction model induced by intracerebroventricular infusion of A β ₁₋₄₂

A β ₁₋₄₂ (20 μ g) was continuously infused into right ventricle for 3 days by attachment of an infusion kit to an osmotic mini-pump. Nicotine (0.2 mg/kg, i.p.) was administered once a day, 5 days a week, beginning 3 weeks after the start of A β ₁₋₄₂ infusion until the last day of behavioral assessment. On the day 90, after the learning and memory studies of water maze tasks were completed, ChAT activities in anterior cortex (A), posterior cortex (B), hippocampus (C) and striatum (D) were measured as described in Materials and Methods. The data represent the mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ vs Sham (Dunnett's test)

(4) HC-3 結合

A β の注入開始から 90 日後に分取した脳組織を用い HC-3 結合能を測定した結果を Fig. 4 に示す。A β を脳室内に注入することにより (Vehicle 群)、線条体の HC-3 結合能は偽手術群 (Sham 群) と比較し明確な変化を示さなかったが (Fig. 4D)、前部大脳皮質、後部大脳皮質および海馬の HC-3 結合能は有意に低下した (Fig. 4A-C)。ニコチン (0.2 mg/kg) を A β 注入開始の 3 週間後から 9 週間、1日1回、1週間に5日間腹腔内投与することにより (Nicotine 群)、前部大脳皮質および海馬の HC-3 結合能の低下は有意に回復した (Fig. 4A, C)。ニコチンの効果は後部大脳皮質においても見られたが (Fig. 4B、統計学的な有意差はなし)、線条体においてはほとんど見られなかった (Fig. 4D)。

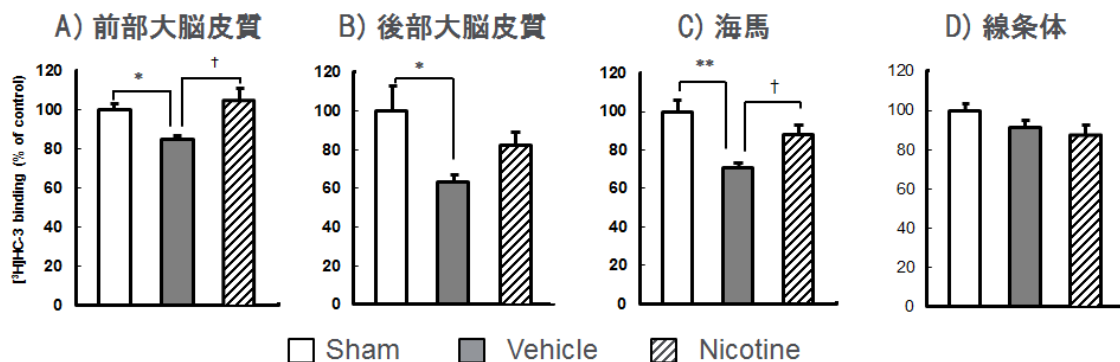


Fig. 4 Effect of nicotine on HC-3 binding in various regions of the brain in rat cognitive dysfunction model induced by intracerebroventricular infusion of A β ₁₋₄₂

A β ₁₋₄₂ (20 μ g) was continuously infused into right ventricle for 3 days by attachment of an infusion kit to an osmotic mini-pump. Nicotine (0.2 mg/kg, i.p.) was administered once a day, 5 days per week, beginning 3 weeks after the start of A β ₁₋₄₂ infusion until the last day of behavioral assessment. On the day 90, after the learning and memory studies of water maze tasks were completed, HC-3 bindings in anterior cortex (A), posterior cortex (B), hippocampus (C) and striatum (D) were measured as described in Materials and Methods. The data represent the mean \pm S.E.M. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs Sham, † p < 0.05 vs Vehicle (Dunnett's test)

第4節 考察

第1章では、ラットを用いたモリス式水迷路試験において、ニコチンがA β によって誘発される学習障害および記憶障害を改善することが示された。ニコチン（またはnAChR作動薬）が動物モデルにおけるエピソード記憶や作業記憶を改善することは他の研究者からも複数報告されている。例えば、A β を14日間脳室内投与することにより誘発されるラット神経傷害モデルにおいて、ニコチンを6週間皮下投与すると、放射状水迷路試験における学習および短期記憶障害が改善することが報告されている [41]。さらに、Boessらは、老齢ラットを用いた試験で、 $\alpha 7$ nAChR作動薬が水迷路試験における作業記憶障害を改善することを報告している [42]。本研究の結果を含めこれらの結果は、ニコチンやnAChR作動薬が、ADを含む神経変性疾患に対して有効である可能性を示唆する。

本章の試験においては、A β 注入により脳内のHC-3結合能の低下が認められ、この低下はニコチン投与により後部大脳皮質および海馬で改善された。その一方で、ニコチンはA β によって誘発されるChAT活性（コリン作動性神経終末数の指標）の低下に対しては効果を示さなかった。HC-3はコリン作動性神経終末におけるコリンの再取り込み部位のマーカーであり、またコリン再取り込みはAChの合成における律速段階であることから [40]、これらの結果は、ニコチンはコリン作動性神経の神経終末数に影響を与えることなく、A β によって誘発されるコリン作動性神経の機能低下を改善することにより空間認知機能障害を改善した可能性を示唆している。

ChATとHC-3結合部位は、いずれもコリン作動性神経に発現しているにもかかわらず、本試験でこれら2つのマーカーの変動が異なっていたことは興味深い。NG108-15細胞（マウス・ラット雑種神経芽細胞腫）を用いた検討においてA β が、細胞傷害性を示さない μ Mレベル以下の濃度でHC-3感受性のコリン再取り込み機能を阻害することが報告されていることから [43]、本章で見られた*in vivo*におけるA β に対するChAT活性とHC-3結合能の反応性の違いは、A β が直接的にHC-3感受性のコリン再取り込みを阻害したことにより生じた可能性が考えられる。ChAT活性とHC-3結合能のデータに関しては、両者の発現が脳の部位で異なっていたことも興味深い、現時点でその理由は不明である。

ニコチンはA β や興奮性アミノ酸によって誘発される神経細胞傷害に対して保護作用を示す。例えば、ラット初代培養神経細胞を用いた検討でA β によって誘発される細胞傷害に対してニコチンが保護作用を示しその作用は $\alpha 4\beta 2$ nAChR遮断薬のDh β Eにより遮断されることが報告されている [44]。また、ラット初代培養神経細胞を用いた検討でA β とグルタミン酸の組み合わせによって誘発される細胞傷害に対してニコチンが保護作用を示し、その作用は $\alpha 7$ nAChR遮断薬の α -ブンガロトキシンにより遮断されることが報告されている [45]。本章で見られたニコチンの作用には、これらの報告で示されているような $\alpha 7$ や $\alpha 4\beta 2$ nAChRを介したニコチンの保護作用が関与している可能性も考えられる。

ニコチンの学習・記憶障害改善作用のメカニズムとしては更に、ニコチン投与による神経伝達物質の放出の影響の可能性も考えられる。nAChRはシナプス前の神経終末に発現し、他の代謝型、イオンチャネル型受容体と相互作用することにより [46, 47]、グルタミン酸、 γ アミノ酪酸、ドーパミン、

ノルアドレナリン、グリシンなどの様々な神経伝達物質の放出を修飾していることが報告されており [48-55]、更にこれらの神経伝達物質の放出がニコチンの認知機能亢進作用に必須であることを示唆するデータも示されている [56, 57]。また、ニコチンは、正常ラットを用いた検討においても注意力を促進する効果があることが報告されている [58, 59]。今回、正常ラットの記憶・学習機能に対するニコチンの効果は検討していないため、そのような作用が本検討で認められたニコチンの効果に関与している可能性は否定できない。

以上、第1章では、ラットにおいて、ニコチンの反復投与により、 $A\beta$ によって誘発される学習および記憶障害が改善することが確認され、その作用にコリン作動性神経の賦活化が関与している可能性が示された。ニコチンの全身投与は、末梢性の作用など副作用の懸念が指摘されており [60, 61]、現在、ニコチン以外の nAChR 作動薬の探索・開発が進められている。本章の知見は、AD 治療におけるこれらの nAChR 作動薬の有用性を示唆するものである。

第5節 小括

第1章においては、A β をラット脳室内に注入する神経傷害モデルを用い、ニコチンの効果を検討した。その結果、下記の知見を得ることが出来た。

- A β をラット脳室内に注入した結果、A β 注入開始87-90日後に実施したモリス式水迷路試験において学習・記憶障害が認められ、これらの障害は、ニコチン（0.2 mg/kg）をA β 注入開始の3週間後から1日1回9週間、腹腔内投与することにより有意に改善した。
- 同モデルにおいて、90日目の前部大脳皮質、後部大脳皮質および海馬では、コリン作動性神経のプレシナプスのマーカーであるHC-3結合が低下し、この低下はニコチンの投与によって有意に改善した。
- 同モデルにおいて、90日目の線条体ではコリン作動性神経細胞のマーカーであるChAT活性が低下したが、この低下はニコチンの投与によって改善しなかった。
- 以上、ニコチンは、A β によって誘発される学習・記憶障害を改善し、その作用にはコリン作動性神経の機能亢進が関与していることが示唆された。

本章の知見は、AD患者に対してニコチンなどのnAChR作動薬が、コリン作動性神経を賦活化することにより有効性を示す可能性を示すものである。

第2章 A β および興奮性アミノ酸によって誘発される神経傷害モデルの構築

第1節 緒言

A β はAD患者の脳に老人斑として蓄積する蛋白質である。A β には複数の分子種が知られているが、主としてC末端が短いA β_{1-40} と長いA β_{1-42} に大別され、いずれもAPPから、 β -セクレターゼによる β 切断と γ -セクレターゼによる γ 切断を経て産生される。A β の病態生理学的な役割は必ずしも明確ではないが、これまでに*in vitro*において神経細胞傷害を惹起することや、その作用のメカニズムとして活性酸素の産生 [62, 63] や一酸化窒素の産生 [63, 64]、細胞内カルシウムの恒常性の破綻 [63, 65, 66] が関与していることが示されている。さらにA β は、*in vivo*においても神経細胞傷害を誘導するとの報告があるが、これに関しては相反する報告もある [67-69]。従って、A β の神経細胞傷害作用に着目した*in vivo*神経傷害モデルは、ADの動物モデルとして有用と考えられる半面、再現性の観点から課題が指摘されてきた。

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、高濃度では神経細胞死を誘導することから、ADなどの神経変性疾患の発症に関わっていると考えられている。また、ADにおけるグルタミン酸の関与を支持する知見としてA β との相互作用が挙げられる。例えば、ラット初代培養神経細胞を用いた検討において、A β がアストロサイトによるグルタミン酸の取り込み機能を低下させることや [70]、A β がグルタミン酸によって誘発される興奮細胞毒性を亢進し、この興奮細胞毒性がNMDA受容体遮断薬によって抑制されること が報告されている [66, 71]。さらに*in vivo*においてA β が、グルタミン酸と同じ興奮性アミノ酸であるイボテン酸の細胞傷害作用を亢進することが示されている [72, 73]。

そこで、ADの病態に関わると考えられているA β とグルタミン酸の相互作用を想定し、両者を併用した評価系の構築を試みた。その結果、*in vitro*および*in vivo*においてA β と興奮性アミノ酸が相乗的に作用し神経細胞傷害を誘導することが確認され、また、A β と興奮性アミノ酸の併用により誘発するラット神経傷害モデルが明確な学習・記憶障害を示すことを確認した。さらに、本神経傷害モデルを用い、メマンチンおよびMK-801の作用を検討した。メマンチンはNMDA受容体に対する非競合的遮断薬であり、コリンエステラーゼ阻害薬（ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン）とともに、本邦においてAD治療薬として使用されている薬剤の一つである。メマンチンは、ラット神経細胞を用いた*in vitro*試験においてNMDA受容体の活性化によって生じる電流に対して膜電位依存性の阻害作用を示すが、別のNMDA受容体遮断薬であるNK-801とは異なり、その作用の発現や消失が速やかであるという特徴を持っている [74, 75]。メマンチンはまた、ラット海馬スライスのシナプス伝達の長期増強の形成に対して濃度依存的な抑制作用を示すものの、NMDA受容体チャネルを阻害する濃度付近ではほとんど影響しないことが確認されているが、MK-801はNMDA受容体チャネルを阻害する濃度付近でもシナプス伝達の長期増強に対して抑制作用を示すことが報告されている [76]。本モデルにおいて、メマンチンは神経細胞傷害を抑制し、学習・記憶障害を改善したが、MK-801は神経細胞傷害を抑制したものの、同じ用量で学習・記憶障害は改善せず、むしろ悪化させた。これらの作用の違いは、NMDA受容体チャネルを阻害する濃度での長期増強阻害作用の有無によるものと考えられる。本モデルにおいて、既に臨床で用いられているメマンチンの有効性が確認されたことは、AD治療薬評価モデルとしての本モデルの有用性を支持する結果である。

第2節 実験材料および方法

(1) 動物

本研究における動物実験は、アスピオファーマ株式会社（その前身であるサントリー株式会社生物医学研究所等を含む）の動物実験実施基準に従い、また、同社の動物倫理委員会において承認を受けた上で実施した。Slc:Wistar 妊娠ラットは日本エスエルシー株式会社より入手し、*in vitro* 細胞培養実験に供した。また、雄性 F344/DuCrj ラット（試験開始時 10 週齢、220-250 g）はチャールズリバー株式会社より入手し、*in vivo* 試験に供した。動物は 12 時間毎の明暗周期（午前 7 時から午後 7 時までが明期）の下で飼育し、餌と水は常に自由に摂取させた。行動実験はすべて午前 8 時 30 分から午後 4 時 30 分の間に行った。

(2) 神経細胞の調製

Slc:Wistar 妊娠ラットの妊娠 18 日目に胎児を摘出し、大脳皮質領域を実体顕微鏡下で分取した後、蛋白質分解酵素（papain）を用いて神経細胞を分散した。得られた神経細胞は、5% Nu-Serum、2% B-27 を含む Neurobasal に懸濁し、Poly-D-Lysine 96 well プレーートの各 well に約 140 細胞/mm² の密度で播種後、CO₂ インキュベーター（37°C、10% CO₂）で培養した。培養 3 日目に、グリア細胞の増殖を抑制する目的で 1 μ M の AraC を各 well に添加した。なお、培養 7 日目に一部の培養細胞を MAP-2 法により染色し、グリア細胞に対する神経細胞の比率が 90% 以上であることを確認し使用した。

(3) 培養細胞における神経細胞死の評価

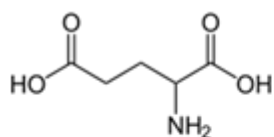
上記 (2) で調製した初代培養大脳皮質神経細胞の培養 6-8 日目に 1.0 μ M の A β ₂₅₋₃₅ (Peptide Institute 社、HBSS に溶解) を添加し、24、48 もしくは 72 時間培養した後、L-グルタミン酸 (2-Aminopentanedioic acid, Sigma-Aldrich 社、以下グルタミン酸) 10 または 30 μ M を添加した。グルタミン酸添加の 24 時間後に、10 μ l の thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) 溶液 (5 mg/mL) を各 well に添加し、10 分間培養した後、培養上清を除去してプレートを室温にて 24 時間乾燥した。各 well に 200 μ l の dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加して、還元された MTT を溶解し、プレートリーダーを用い 570 nm における吸光度を測定した後、対照として同時に測定した 650 nm における吸光度を差し引いた値を生細胞活性とした（データは A β もグルタミン酸も添加しない control 群に対する % で表示した）。

(4) A β ₁₋₄₀ およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルの作製

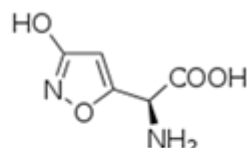
A β ₁₋₄₀ (Peptide Institute 社) は 2 μ M HCl/saline に溶解した後、37°C で 7 日間インキュベートし、4 μ g/ μ l の A β 溶液を作製した。イボテン酸 (α -Amino-3-hydroxy-5-isoxazoleacetic acid, Sigma-Aldrich 社) はリン酸緩衝生理食塩水に溶解して、0.6 μ g/ml のイボテン酸溶液を作製した。

雄性 F344/DuCrj ラットをペントバルビタール (50 mg/kg, i.p.) 麻酔下に脳定位固定装置に固定し、頭蓋骨露出後、ブレグマ-ラムダを水平にして、両側海馬 (ブレグマより、後方 3.0 および

4.5mm、矢状縫合より左右それぞれ側方 2.0 および 3.5mm、ブレグマよりそれぞれ深さ 3.0 および 3.5mm の 4 箇所) に、インフュージョンポンプに接続した 10 μ l 用マイクロシリンジ (30G 注射針付) を介して A β 溶液を 0.25 μ l/min の流速で 4 分間注入した (総量: 4 μ g/1 μ l)。シリンジはその後 2.5 分間留置させた後、取り外し、頭皮を縫合して術創を閉じ、ケージに戻した。2 日後、同様にイボテン酸 (0.3 μ g /0.5 μ l) を 0.125 μ l/min の流速で 4 分間注入し、術後、ラットをケージに戻した。なお、術後の飼育は、常に餌と水を自由に摂取することができる状態で行った。



L-グルタミン酸
 2-Aminopentanedioic acid
 MW: 147.13



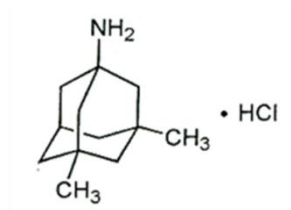
イボテン酸
 α -Amino-3-hydroxy-5-isoxazoleacetic acid
 MW: 158.11

(5) 薬物の投与

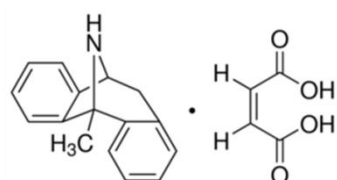
メマンチン塩酸塩 (1-Amino-3,5-dimethyladamantane hydrochloride, memantine, Merz Pharma 社、以下メマンチン) は、生理食塩水に溶解し、10 または 20 mg/kg/day の用量で、A β_{1-42} 海馬内注入の 24 時間後から 6 週間、ラットの背部皮下に植え込んだ osmotic mini-pump (Alzet, Model 2ML2, Alza 社) を用いて持続注入した。Osmotic mini-pump は 2 週間毎に入れ替えた。このメマンチンの用量は、ヒトでの用法用量 (20 および 30 mg/day, p.o.) で投与した後の定常状態時の血清中濃度 (各々、0.374 および 0.529 μ M) やラットにおいて神経細胞保護作用を示す用法用量 (2.0 mg/kg/day, s.c. infusion) における血漿中濃度 (1.2 μ M) に基づき設定した [77]。

MK-801 マレイン酸水素塩 ((+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-debenzocyclohepten-5,10-imine maleate, Sigma-Aldrich 社、以下 MK-801) は、生理食塩水に溶解し、0.624 mg/kg/day の用量で、A β_{1-42} 海馬内注入の 24 時間後から 6 週間、上記と同様の方法で持続注入した。この MK-801 の用法用量は、事前に実施した薬理試験の結果、0.132 mg/kg/day の用量では神経細胞保護作用および学習・記憶改善作用が認められなかったこと、1.248 mg/kg/day の用量では毒性作用により 7 日以内にラットが死亡したことを参考に設定した。

対照群 (Vehicle 群) には、生理食塩水を上記と同様の方法で持続注入した。



メマンチン塩酸塩
 1-amino-3,5-dimethyladamantane
 hydrochloride
 MW: 215.77



MK-801 マレイン酸水素塩
 (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-
 debenzocyclohepten-5,10-imine maleate
 MW: 337.37

(6) モリス式水迷路試験

モリス式水迷路試験は、第1章、第2節(4)に記載した方法により実施した。但し、獲得試行は、A β 注入35日後より実施した。

(7) Peripheral type benzodiazepine binding site (PTBBS) 結合能

海馬における神経細胞死を評価する目的で、Demerle-Pallardy らの方法 [78] を用い、グリオーシスのマーカーである PTBBS 結合能を測定した。まず、モリス式水迷路試験終了後、ラットをペントバルビタールにより安楽死させ、その直後に左側の海馬を採取して、-80°Cで冷凍保存した。採取した海馬は40倍容量の氷冷した緩衝液(50 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH7.4)を用いてホモジナイズした。このホモジネート液に2 nM の $[^3\text{H}]$ -PK11195 ((1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide; 3163.5 GBq/mmol, NEN 社)を加え、25°Cで60分間インキュベートした。インキュベーション後直ちに、0.1% polyethylenimine に予め浸したグラスファイバーフィルター (GF/B) を用いて反応液をろ過し、氷冷した5 ml の緩衝液で3回洗浄した。PTBBS 結合能は、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 1900CA, Packard 社)を用いて測定することにより求め、特異的結合は、全結合量から、1 μM の非標識 PK11195 存在下で反応させて得た非特異的結合量を差し引くことにより算出した。さらに、Smith らの方法 [79] を用いて蛋白濃度を測定し、蛋白量あたりの放射活性を fmol/mg protein の単位に換算した後、偽手術群との比で表示した。

(8) 組織学的検索

モリス式水迷路試験終了後に右側の海馬を採取して、10%ホルマリンを含む0.1 M のリン酸緩衝液に24時間浸し、更にその後、20%のショ糖を含む0.1 M のリン酸緩衝液に48-72時間浸した後、凍結包埋した。包埋組織は、A β_{1-40} およびイボテン酸注入部位を中心に厚さ15 μm の冠状断面の連続切片を作製し、Cresyl violet 染色により神経細胞傷害を組織学的に解析した。

(9) 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計学的解析は、モリス式水迷路試験の獲得試行については二元配置分散分析、その他の測定については一元配置分散分析を行った後、Turkey-Kramer もしくはDunnett's テストにより (EXSUS Ver. 7.5.2) により行い、 $p < 0.05$ 以上のデータを統計学的に有意差があると判断した。

第3節 実験結果

第1項 A β およびグルタミン酸により誘起される神経細胞傷害

ラット初代培養神経細胞を用い、A β またはグルタミン酸を単独で、あるいはA β とグルタミン酸を組合せて添加することにより惹起される神経細胞傷害について検討した。Fig. 5 に示すように、ラット初代培養大脳皮質神経細胞にA β (1 μ M)、もしくはグルタミン酸 (10, 30 μ M) を各々単独で添加した結果、MTT 活性の低下がみられ、有意な神経細胞傷害が認められた (Fig. 5A)。また、A β を添加した 48 時間後にグルタミン酸を添加すると、A β またはグルタミン酸を単独で添加したときに比べ、より顕著な神経細胞傷害が認められた (Fig. 5A)。A β とグルタミン酸の組合せによる神経細胞傷害の強さは、A β の前処置時間の長さに応じて変化し、前処置時間が 48 時間の時に最大となった (Fig. 5B)。

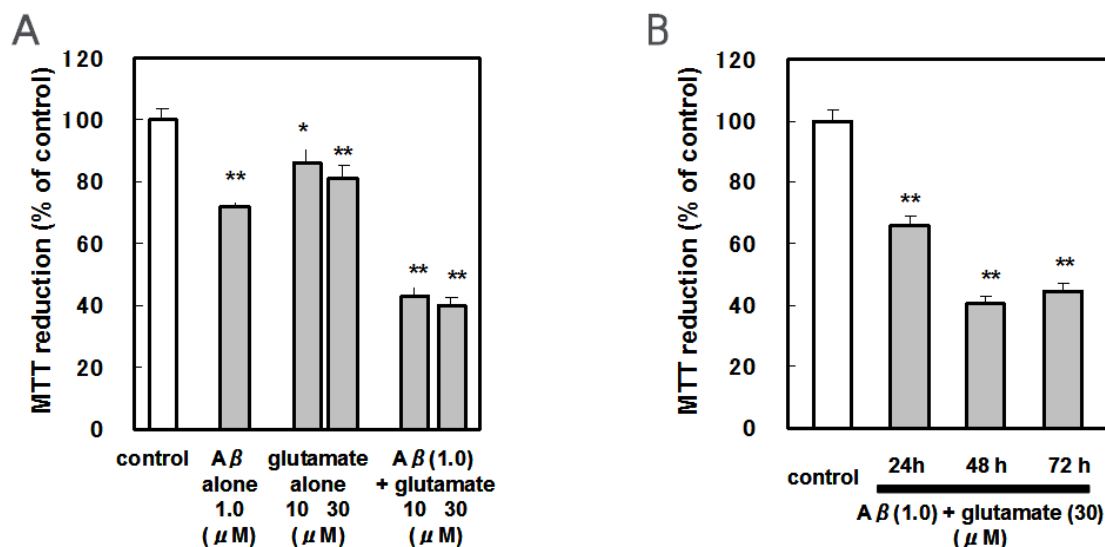


Fig. 5 Neurotoxic effects of A β and/or glutamate in rat primary cortical neurons

Primary rat cortical neurons were cultured with A β_{25-35} for 48h and then glutamate was added to the culture. Neuronal damage was estimated by MTT assay 48h after the glutamate addition unless otherwise indicated. A: Neurotoxic effects of A β_{25-35} (1.0 μ M) and glutamate (10, 30 μ M). B: Effects of pretreatment time with A β_{25-35} (1.0 μ M) on the neurotoxic effect of glutamate (30 μ M). Data represent the mean \pm S.E.M. Number of wells used is indicated in parentheses. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Control (neither A β nor glutamate was added) (Dunnett's test)

第2項 A β およびイボテン酸により誘起されるラット神経傷害

(1) モリス式水迷路試験

ラット海馬にA β またはイボテン酸を単独で、あるいはA β とイボテン酸を組み合わせて注入す

ることにより惹起される学習・記憶障害について検討した。Fig. 6 に示すように、モリス式水迷路試験の獲得試行において、A β を単独で海馬に注入した群 (□)、またはイボテン酸を単独で海馬に注入した群 (▲) では、偽手術群 (○) に対し、有意な escape latency の延長は認められなかったが、A β 注入の 48 時間後にイボテン酸を注入した群 (●) では、獲得試行 2 日目、3 日目、4 日目の escape latency が有意に延長し、学習障害が生じていることが確認された (Fig. 6A)。最終獲得試行終了の 2 時間後に行った保持試行において、A β を単独で海馬に注入した群 (A β alone 群)、またはイボテン酸を単独で海馬に注入した群 (Ibotenate alone 群) では、偽手術群 (Sham 群) に対し、annulus crossing (プラットフォーム位置の横切り回数) の有意な低下は認められなかったが、A β 注入の 48 時間後にイボテン酸を注入した群 (A β +Ibotenate 群) では、annulus crossing が有意に低下したことから、記憶障害が生じていることが確認された (Fig. 6B)。

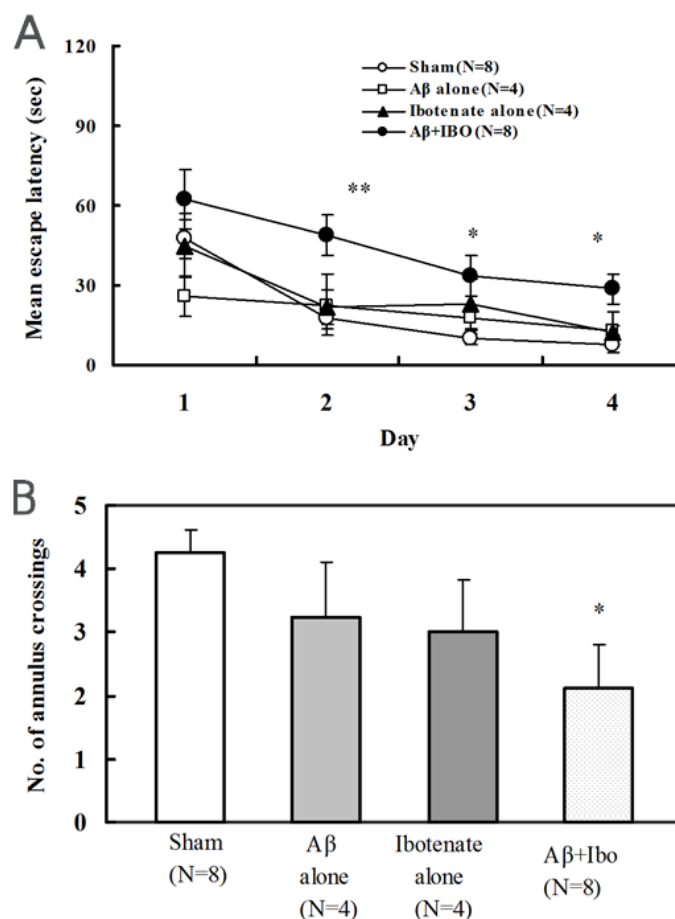


Fig. 6 Effects of intrahippocampal injections of A β and ibotenate alone and in combination on water maze performance in rats

A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l), ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l), or A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l) plus ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l) was bilaterally injected into the hippocampus of rats. A; The water maze task was performed for 4 days on days 35 - 38 after the injection of A β . B; A probe trial was conducted for 60 s at 2 h after the final acquisition test. Each symbol and column represents the mean \pm S.E.M. Number of rats used is shown in parentheses. * p < 0.05 vs Sham (Dunnett's test).

(2) PTBBS 結合能

モリス水迷路試験終了後に採取した海馬を用い、神経細胞傷害マーカーである PTBBS 結合能を測定した結果を Fig. 7 に示す。A β alone 群、または Ibotenate alone 群では、Sham 群に対し、PTBBS 結合能の有意な増加は認められなかったが、A β +Ibotenate 群では、PTBBS 結合能の有意な増加が認められ、海馬において神経細胞傷害が惹起されていることが確認された (Fig. 7)。

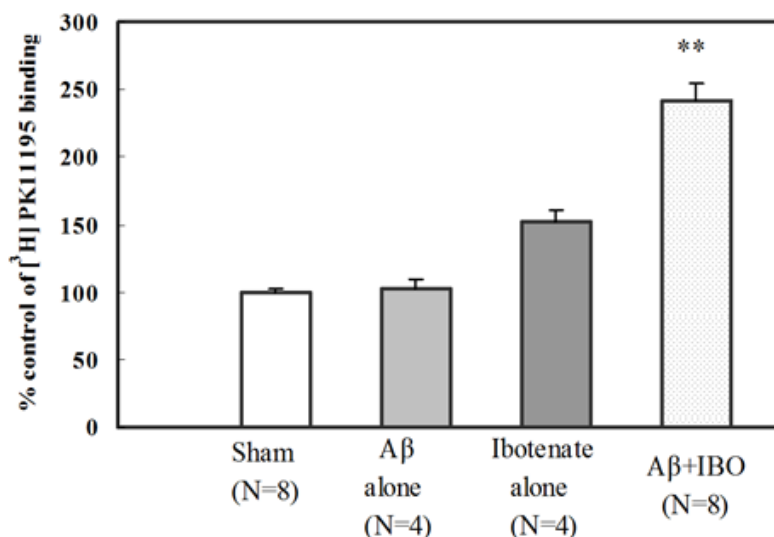


Fig. 7 Effects of intrahippocampal injections of A β and ibotenate alone and in combination on neuronal damage in rats

A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l), ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l), or A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l) plus ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l) was bilaterally injected into the hippocampus of rats. Levels of the peripheral-type benzodiazepine-binding site in the left hippocampus weeks after the injection of A β ₁₋₄₀ were measured using [³H] PK11195 as a specific radio-ligand. The absolute [³H] PK11195 binding value of sham rats was 166.6 ± 3.03 fmol/mg protein. Each symbol and column represents the mean \pm S.E.M. Number of rats used is shown in parentheses.

** $p < 0.01$ vs Sham (Dunnett's test)

第3項 ラット神経傷害モデルにおけるメマンチンおよびMK-801の効果

(1) メマンチンの効果

第2項で構築した A β およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルにおけるメマンチンの効果をモリス式水迷路試験により評価した結果、また、モリス式水迷路試験終了後に採取した左側海馬を用い、神経細胞障害マーカーである PTBBS 結合能を測定した結果を Fig.8 に示す。モリス式水迷路試験の獲得試行において、同モデルに対して Vehicle を投与した群 (●) では、偽手術群 (○) と比較し、獲得試行2日目、3日目、4日目の escape latency が有意に延長し、この escape latency

の延長は、メマンチンを 10 mg/kg/day (△) または 20 mg/kg/day (▲) の用量で投与することによって抑制され (Vehicle 群と比較し、10 mg/kg/day では獲得試行の 2, 3, 4 日目において、また 20mg/kg/day では 3 日目において有意差が認められた)、メマンチンの学習障害改善作用が確認された (Fig. 8A)。最終獲得試行終了の 2 時間後に行った保持試行においては、Vehicle を投与した群 (Vehicle 群) では、偽手術群 (Sham 群) に対し、annulus crossing (プラットフォーム位置の横切り回数) の有意な低下が認められ、この低下は、メマンチンを 10 mg/kg/day または 20 mg/kg/day の用量で投与することにより抑制され (統計学的有意差はなし)、メマンチンが本モデルにおける記憶障害を改善する傾向があることが示された (Fig. 8B)。また、モリス式水迷路試験終了後に採取した左側の海馬を用い、神経細胞傷害マーカーである PTBBS 結合能を測定した結果、Vehicle 群では Sham 群に対し、PTBBS 結合能の有意な増加が認められ、この PTBBS 結合能の増加は、メマンチンを 10 mg/kg/day または 20 mg/kg/day の用量で投与することによって有意に抑制され、メマンチンが本モデルにおける神経細胞傷害を改善することが示された (Fig. 8C)。

モリス式水迷路試験終了後に採取した右側の海馬を用い、Cresyl violet 染色により組織学的解析を行った結果を Fig. 10 に示す。Vehicle 群では海馬 CA1 および CA3 領域を中心に神経細胞の顕著な脱落が確認されたが、メマンチンを 10 mg/kg/day または 20 mg/kg/day の用量で投与した群では神経細胞脱落はほとんど観察されず、メマンチンが神経細胞傷害を改善していることが定性的に示された (Fig. 10A)。

(2) MK-801 の効果

Aβ およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルにおける MK-801 の効果をモリス式水迷路試験により評価した結果、また、モリス式水迷路試験終了後に採取した左側海馬を用い、神経細胞障害マーカーである PTBBS 結合能を測定した結果を Fig.9 に示す。獲得試行では、同モデルにおいて Vehicle を投与した群 (●) では、偽手術群 (○) に比較して escape latency が延長し (Fig. 9A, 獲得試行 2 日目、3 日目において有意差)、この escape latency の延長は、MK-801 を 0.624 mg/kg/day (■) の用量で投与することによって抑制されず、MK-801 による学習障害改善作用は認められなかった (Fig. 9A)。最終獲得試行終了の 2 時間後に行った保持試行において、Vehicle を投与した群 (Vehicle 群) では、偽手術群 (Sham 群) に比べ、annulus crossing (プラットフォーム位置の横切り回数) の有意な低下が認められ (Fig. 9B)、この annulus crossing の低下は、MK-801 を 0.624 mg/kg/day (MK-801 0.624 mg 群) の用量で投与することによって抑制されず、MK-801 の記憶障害改善作用は認められなかった (Fig. 9B)。一方、神経傷害マーカーの検討では、Vehicle 群では Sham 群に対し、PTBBS 結合能の有意な増加が認められ、神経細胞傷害が惹起されていることが確認され、この傷害に対し、MK-801 を 0.624 mg/kg/day (MK-801 0.624 mg 群) の用量で投与すると、有意に PTBBS 結合能の増加が抑制され、MK-801 が本モデルにおける神経細胞傷害を改善することが示された。

モリス式水迷路試験終了後に採取した右側の海馬を用い、Cresyl violet 染色により組織学的検索

を行った結果を Fig. 10 に示す。Vehicle 群では海馬 CA1 および CA3 領域を中心に神経細胞の顕著な脱落が確認されたが、MK-801 0.624 mg 群では神経細胞の顕著な脱落は観察されず、MK-801 が神経細胞傷害を改善していることが定性的に示された (Fig. 10B)。

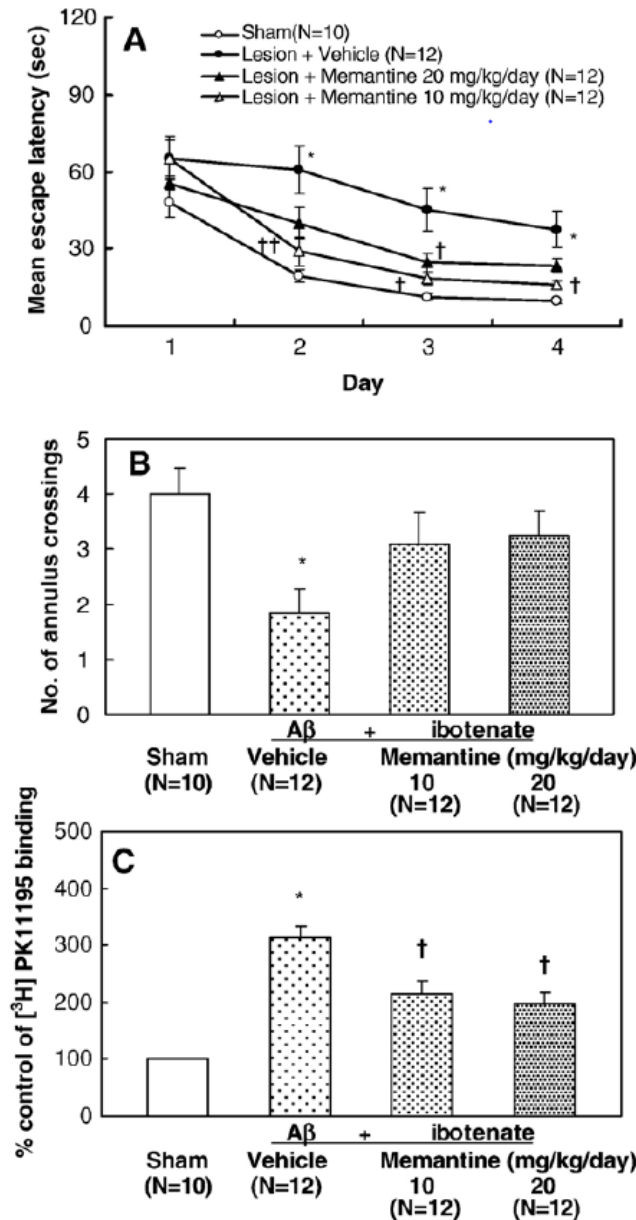


Fig. 8 Effects of memantine on neuronal damage in rats subjected to bilateral sequential injections of Aβ₁₋₄₀ and ibotenate into the hippocampus.

Aβ₁₋₄₀ (4 μg/1 μl) was bilaterally injected into the hippocampus of rats, and subsequently ibotenate (0.3 μg/0.5 μl) was injected into the same sites 48 h after the Aβ₁₋₄₀ treatment. Memantine (10, 20 mg/kg/day) or saline was subcutaneously infused for 6 weeks starting 24 h after the Aβ₁₋₄₀ injection. A; The water maze task was performed for 4 days on days 35–38 after the injection of Aβ₁₋₄₀. B; A probe trial was conducted for 60 s at 2 h after final the acquisition test. C; Levels of the peripheral-type benzodiazepine-binding site in the left hippocampus 6 weeks after the injection of Aβ₁₋₄₀ were measured using [³H] PK11195 as a specific radio-ligand. Each symbol and column represents the mean ± S.E.M. Number of rats used is shown in parentheses. * $p < 0.05$ vs Sham, † $p < 0.05$ vs Vehicle (Tukey–Kramer's test)

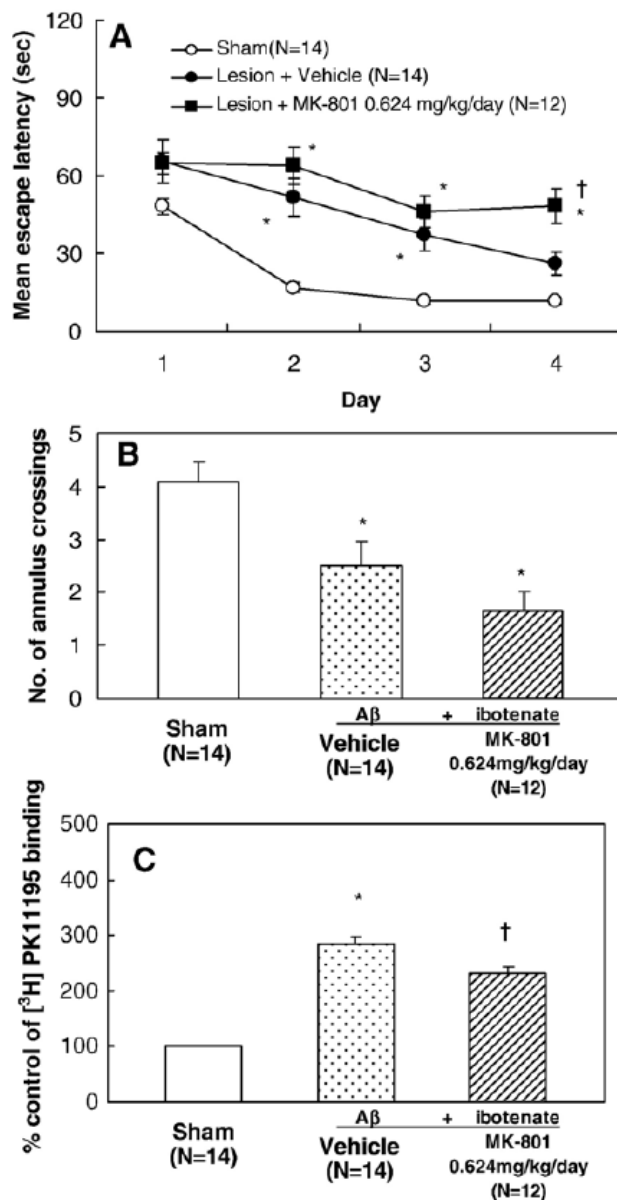


Fig. 9 Effects of MK-801 on water maze performance in rats subjected to bilateral sequential injections of A β ₁₋₄₀ and ibotenate into the hippocampus.

A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l) was bilaterally injected into the hippocampus of rats, and subsequently ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l) was injected into the same sites 48 h after the A β ₁₋₄₀ treatment. MK-801 (0.624 mg/kg/day) or saline was subcutaneously infused for 6 weeks starting 24 h after the A β ₁₋₄₀ injection. A; The water maze task was performed for 4 days on days 35–38 after the injection of A β ₁₋₄₀. B; A probe trial was conducted for 60 s at 2 h after final the acquisition test. C; Levels of the peripheral-type benzodiazepine-binding site in the left hippocampus 6 weeks after the injection of A β ₁₋₄₀ were measured using [³H]-PK11195 as a specific radio-ligand. MK-801 (0.624 mg/kg/day) was administered by subcutaneous infusion for 6 weeks starting 24 h before the A β ₁₋₄₀ injection. Each symbol and column represents the mean \pm S.E.M. Number of rats used is shown in parentheses. * $p < 0.05$ vs Sham, † $p < 0.05$ vs Vehicle (Tukey–Kramer's test)

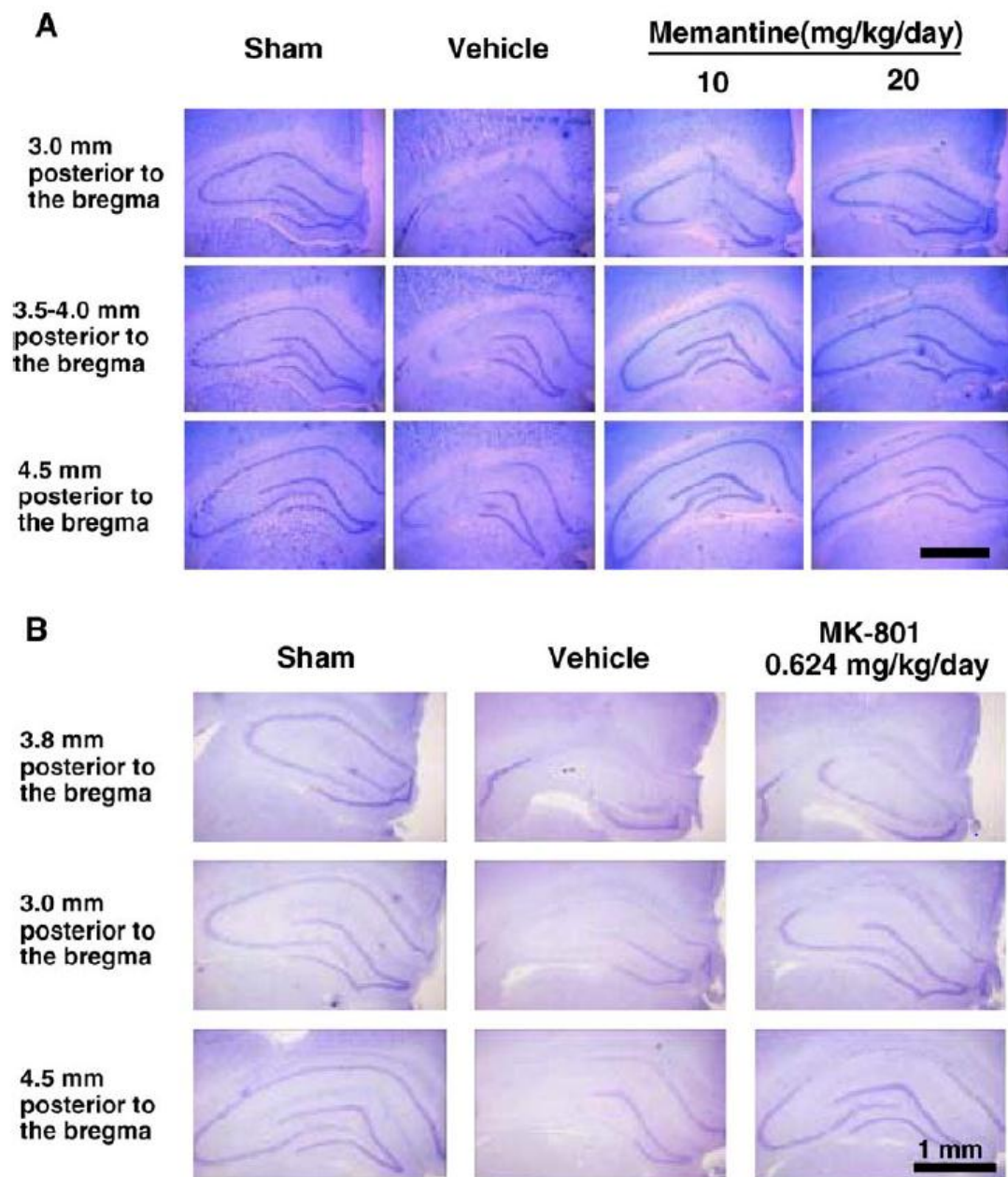


Fig. 10 Effects of memantine and MK-801 on neuronal damage in the right hippocampus in rats subjected to bilateral sequential injections of A β ₁₋₄₀ and ibotenate into the hippocampus (Cresyl violet staining).

A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l) was bilaterally injected into the hippocampus of rats, and subsequently ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l) was injected into the same sites 48 h after the A β ₁₋₄₀ treatment. Memantine (10, 20 mg/kg/day), MK-801 (0.624 mg/kg/day) or saline was administered by subcutaneous infusion for 6 weeks starting 24 h before the A β ₁₋₄₀ injection. Scale bar: 1 mm.

第4節 考察

第2章では、まず *in vitro* および *in vivo* において A β と興奮性アミノ酸の組み合わせにより惹起される神経細胞傷害を解析した。*In vitro* の検討では、初代培養大脳皮質神経細胞に興奮性アミノ酸であるグルタミン酸を添加する48時間前に A β を添加すると、A β またはグルタミン酸を単独で添加したときに比べ、より顕著な神経細胞傷害が認められ、A β の前処置がグルタミン酸に対する神経細胞の感受性を亢進することが示された。このような A β とグルタミン酸の相乗効果は、これまでにいくつか報告されており、そのメカニズムとして、A β 処置による細胞内へのカルシウム流入の亢進に基づく神経細胞の脆弱性亢進が示唆されている [66]。すなわち、A β 凝集体は、細胞膜表面において活性酸素を生成させ、細胞膜の脂質過酸化反応を亢進することにより、イオン輸送性 ATPase ならびにグルコースやグルタミン酸のトランスポーター機能を阻害する aldehyde 4-hydroxynonenal を産生させ [80, 81]、その結果、細胞膜の脱分極やカルシウムの流入、および細胞エネルギーの枯渇を誘発すると考えられている [82]。また、別の考え方として、A β 自体が細胞膜上に pore を形成することにより、細胞内カルシウムの恒常性を破綻させる可能性も指摘されている [83]。

In vivo の検討では、グリア細胞によるグルタミン酸トランスポーターの影響を回避するため、興奮性アミノ酸としてイボテン酸を用いた。ラット海馬に A β または興奮性アミノ酸であるイボテン酸を単独で注入した場合、神経細胞傷害およびモリス式水迷路における学習・記憶障害は認められなかったが、イボテン酸注入の48時間前に A β を注入することにより、神経細胞傷害およびモリス式水迷路試験における顕著な学習・記憶障害が認められた。A β による神経細胞傷害作用はこれまでに *in vitro* および *in vivo* の系で報告されているが [84, 85]、*in vivo* における A β の神経細胞傷害作用に関する報告は必ずしも一致しておらず [67-69]、A β 投与によって惹起する学習・記憶障害モデルは再現性の点で課題があると考えられてきた。一方、これまでに、*in vivo* において A β がイボテン酸の細胞傷害を亢進することが報告されていたことから [72, 73]、本研究ではこれらの報告に基づき、A β を注入してから48時間後にイボテン酸を注入することによって、より顕著な学習・記憶障害が誘発されることを想定し実験を行った。その結果、期待通り顕著な学習・記憶障害が誘導されるモデルを構築することが出来た。

次に、上記の *in vivo* の検討で構築した、ラット海馬に A β およびイボテン酸を組み合わせ注入することにより惹起される学習・記憶障害モデルを用い、メマンチンおよび MK-801 の作用を検討した。その結果、メマンチンが神経細胞傷害 (PTBBS 結合能の上昇および組織学的変化) を抑制し、学習・記憶障害を改善することが示された。本試験におけるメマンチンの投与後の定常状態での血清濃度は、10 および 20 mg/kg/day 投与群で、各々 52-64 ng/ml ($0.32 \pm 0.012 \mu\text{M}$) および 150-199 ng/ml ($1.01 \pm 0.061 \mu\text{M}$) であった。これらの血清中濃度は、*in vitro* における神経細胞保護作用を有する濃度 ($0.3 \mu\text{M}$) に近く、また臨床での本剤の投与量における血清中濃度に近い値である [77]。一方、MK-801 は、神経細胞傷害を抑制したものの、同じ用量で学習・記憶障害を改善せず、むしろ悪化させた。メマンチンは、MK-801 とは異なり、NMDA 受容体阻害作用が膜電位依存的であり、またその作用の消失が速やかであることが報告されている [74, 75]。今回の試験における両者の効果の違いはこの作用に関

係しているものと考えられる。

MK-801 が学習・記憶機能を悪化させるメカニズムとしては MK-801 によるシナプスの可塑性阻害が考えられる。例えば、MK-801 は NMDA 受容体を阻害する用量で長期増強の形成を抑制し [76]、またキノリン酸を用いた内嗅皮質破壊により惹起される 8 方向放射迷路試験における空間参照記憶を悪化させることが報告されている [86]。これらの結果は、MK-801 が神経細胞保護作用を示す用量でシナプス可塑性を阻害し学習・記憶障害を誘発することを示唆する。また、今回データは示していないが、正常ラットを用いた検討で、メマンチン (20 mg/kg/day) は正常ラットのモリス式水迷路試験における獲得試行および探索試行の結果に影響を与えなかったが、MK-801 (0.624 mg/kg/day) は獲得試行における escape latency を有意に悪化し、探索試行における annulus crossing を有意に減少させた。すなわち、メマンチンは生理的な学習・記憶機能には影響することなく神経細胞保護作用を示すことにより学習・記憶障害を改善するが、MK-801 は神経細胞保護作用を示す用量で生理的な学習・記憶機能を障害すると考えられる。

以上、本章では、*in vitro* および *in vivo* における検討で、A β と興奮性アミノ酸が相乗的に作用し神経細胞傷害を誘導することが確認された。また、A β とイボテン酸の組み合わせによって誘発されるラット神経傷害モデルを用いてメマンチンの効果を検討し、メマンチンが本モデルにおける神経細胞傷害、および学習・記憶障害を改善することが示された。既に臨床で用いられているメマンチンの学習・記憶障害改善効果が確認されたことは、AD 治療薬評価モデルとしての本モデルの有用性を示すものである。

第5節 小括

第2章においては、ラット初代培養神経細胞にA β またはグルタミン酸を単独で、あるいはA β とグルタミン酸を組み合わせることで添加することにより惹起される神経細胞傷害や、ラット海馬にA β またはイボテン酸を単独で、あるいはA β とイボテン酸を組み合わせることで注入することにより惹起される神経細胞傷害および学習・記憶障害を検討し、下記の知見を得ることが出来た。

- A β (1 μ M) およびグルタミン酸 (10, 30 μ M) は各々、ラット初代培養神経細胞に対し有意な神経細胞傷害を惹起した。また、A β 処置の48時間後にさらにグルタミン酸を作用させたところ、A β またはグルタミン酸単独の場合に比べ、より顕著な神経細胞傷害が認められた。
- A β (4 μ g/1 μ l)、またはイボテン酸 (0.3 μ g/0.5 μ l) をラット海馬に注入した結果、神経細胞傷害マーカーであるPTBBS結合能の上昇や、モリス式水迷路試験における学習・記憶障害は、ほとんど見られないかまたは軽度であった。一方、A β およびイボテン酸を組み合わせることで注入したところ、PTBBS結合能の有意な上昇およびモリス式水迷路試験における顕著な学習・記憶障害が観察された。
- メマンチン (10, 20 mg/kg) は、ラットの海馬にA β を注入しその48時間後にイボテン酸を同様に注入する神経傷害モデルにおいて、神経細胞傷害 (PTBBSの上昇および組織学的変化) を抑制し、またモリス式水迷路試験における学習・記憶障害を改善した。
- 同モデルにおいて、メマンチンと同じNMDA受容体拮抗剤であるMK-801は、メマンチンと同様、神経細胞傷害を抑制したものの、モリス式水迷路試験における学習・記憶障害は抑制しなかった。

以上の知見は、A β と興奮性アミノ酸が相乗的に作用し神経細胞傷害や学習・記憶障害を誘導することを示しており、A β とイボテン酸の組み合わせによって誘発される神経傷害モデルにおいて、既存のAD治療薬であるメマンチンの学習障害改善効果が確認されたことは、本モデルのAD治療薬評価モデルとしての有用性を支持するものである。

第3章 A β /興奮性アミノ酸誘発ラット神経傷害モデルにおける bFGF の効果

第1節 緒言

bFGF (別名 FGF-2) は 154 個のアミノ酸から成る分子量約 18kDa の分泌型蛋白質であり、FGF ファミリーに属する [87]。哺乳類において FGF ファミリーメンバーは、これまでに 23 種類 (FGF1 – FGF23) が報告されており、また FGF の受容体は 4 種類 (FGFR1 – FGFR4) が同定されている。bFGF の高親和性受容体である FGFR1 は、内皮細胞や血管平滑筋細胞、神経細胞、グリア細胞など多種の細胞に発現しており、bFGF はこれらの細胞の生存や増殖、分化に重要な役割を果たしていると考えられている。bFGF は、FGFR1 受容体に結合した後、その受容体の二量体化やそれによる受容体分子内チロシンキナーゼの活性化、およびそれに続く phospholipase C γ (PLC γ) や MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinases) 経路の活性化を介してその生物活性を発揮すると考えられている [87]。bFGF はまた、受容体と複合体を形成した後、エンドサイトーシスにより細胞内に入り、細胞質や核内で機能することも知られている。

bFGF は多様な生物活性を有していることから、古くからその医薬品への応用が考えられ検討されてきた。例えば、遺伝子組み換え型 bFGF は既に、線維芽細胞や血管内皮細胞に対する増殖作用を作用メカニズムとした褥瘡治療薬 (スプレー剤) として使用されている。bFGF はまた神経細胞に対して細胞保護作用 [88] や神経突起伸展作用 [89] を有することが示されており、*in vivo* においても一過性および永久脳虚血モデル [90,91] や脳外傷モデル [92] において有効性を示すことが報告されている。さらに、これらの結果を基に脳梗塞を対象とした臨床試験も実施されている[93]。

本章では、bFGF の AD 治療薬としての可能性を検討する目的で、第2章で構築した A β および興奮性アミノ酸によって惹起される神経傷害モデルを用い bFGF の効果を検討した。その結果、bFGF は A β および興奮性アミノ酸によって惹起される *in vitro* の神経細胞傷害を改善するだけでなく、両者の併用で誘導される *in vivo* における神経傷害および学習・記憶障害を改善することが示された。本章の知見は、bFGF が神経細胞保護作用により AD 患者において有益な効果を示す可能性を示唆するものである。

第2節 実験材料および方法

(1) 動物

本研究における動物実験は、アスビオファーマ株式会社（その前身であるサントリー株式会社生物医学研究所等を含む）の動物実験実施基準に従い、また、同社の動物倫理委員会において承認を受けた上で実施した。Slc:Wistar 妊娠ラットは日本エスエルシー株式会社より入手し、*in vitro* 細胞培養実験に供した。また、雄性 F344/DuCrj ラット（試験開始時 10 週齢、220-250 g）はチャールズリバー株式会社より入手し、*in vivo* 試験に供した。動物は 12 時間毎の明暗周期（午前 7 時から午後 7 時までが明期）の下で飼育し、餌と水は常に自由に摂取させた。行動実験はすべて午前 8 時 30 分から午後 4 時 30 分の間に行った。

(2) 神経細胞の調製

神経細胞の調製は、第 2 章、第 2 節 (2) に記載した方法により実施した。

(3) 培養細胞における神経細胞死の評価

培養細胞における神経細胞死の評価は、第 2 章、第 2 節 (3) に記載した方法により実施した。遺伝子組み換え型ヒト bFGF（BD Biosciences 社）は 0.3-3 ng/ml の濃度でグルタミン酸添加の 24 時間前に、また MK-801（Sigma-Aldrich 社）は、1-30 nM の濃度でグルタミン酸と同時に添加した。

(4) A β ₁₋₄₀ およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルの作製

A β ₁₋₄₀ およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルの作製は、第 2 章、第 2 節 (4) に記載した方法により実施した。

(5) 薬物の投与

A β ₁₋₄₀ およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルにおいて、A β を注入し 1 日間通常飼育を行った後、A β の注入と同様の方法により、bFGF 溶液（25 ng/1 μ l）を海馬内 4 箇所へ注入した。対照群（Vehicle 群）には、bFGF 溶液の代わりに生理食塩水を同様の方法により注入した。

(6) モリス式水迷路試験

モリス式水迷路試験は、第 1 章、第 2 節 (4) に記載した方法により実施した。但し、獲得試行は、A β 注入 14 日後より実施した。

(7) PTBBS 結合能

PTBBS 結合能の測定は、第 2 章、第 2 節 (7) に記載した方法により実施した。

(8) ChAT 活性

ChAT 活性の測定は、第 1 章、第 2 節 (7) に記載した方法により実施した。

(9) HC-3 結合能

HC-3 結合の測定は、第 1 章、第 2 節 (8) に記載した方法により実施した。

(10) 統計学的解析

データは平均値±標準誤差で表示した。統計学的解析は、モリス式水迷路試験の獲得試行については二元配置分散分析、その他の測定については一元配置分散分析を行った後、Dunnett's test (SAS System Release 9.2) により行い、 $p < 0.05$ 以上のデータを統計学的に有意差があると判断した。

第3節 実験結果

第1項 *In vitro*試験

第2章で構築した *in vitro* における A β およびグルタミン酸誘発神経細胞傷害モデルを用い bFGF の効果を評価した。Fig. 11 に示すように、ラット初代培養大脳皮質神経細胞に A β (1 μ M) およびグルタミン酸 (20 μ M) を添加することにより顕著な神経細胞傷害が認められた (Fig. 11A, B)。この傷害に対し、bFGF (0.3-3 ng/ml) をグルタミン酸添加の 24 時間前に添加した結果、濃度依存的な細胞傷害改善作用が認められた (Fig. 14A)。同様に、MK-801 (1-30 nM) をグルタミン酸添加と同時に添加することによっても、濃度依存的な細胞傷害改善作用が認められた (Fig. 11B)。

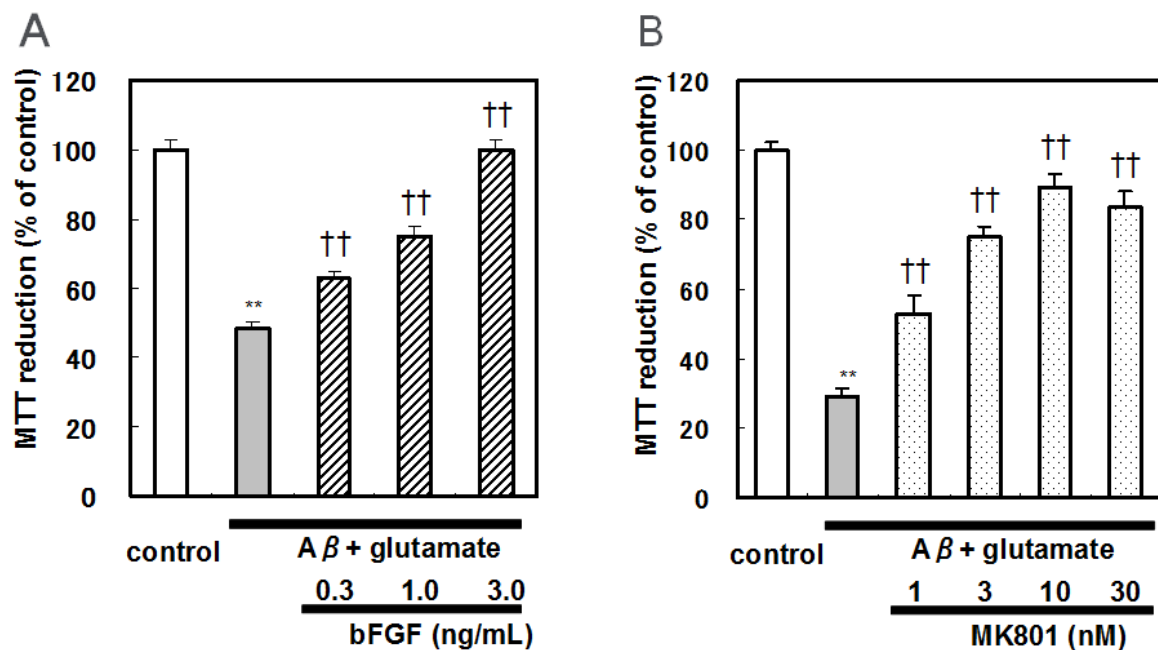


Fig. 11 Effects of bFGF and MK-801 on neurotoxicity induced by A β and glutamate in rat primary cortical neurons

Primary rat cortical neurons were cultured in the presence of A β_{25-35} (1.0 μ M) for 48 h, and then glutamate (20 μ M) was added to the culture. bFGF (0.3 - 3 ng/ml) (A) was added to the culture 24 h before the addition of glutamate, and MK-801 (1 - 30nM) (B) was added to the culture simultaneously with glutamate. Neuronal damage was estimated by MTT assay 48h after the glutamate treatment. In control, the cells were cultured without A β_{25-35} /glutamate, and neither MK-801 nor bFGF was added to the culture. Data represents the mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ vs Control, †† $p < 0.05$ vs A β /glutamate (Dunnett's test)

第2項 ラット神経傷害モデルにおける bFGF の効果

(1) モリス式水迷路試験

第2章で構築した A β およびイボテン酸誘発ラット神経傷害モデルにおける bFGF の効果をモリス式水迷路試験により評価した。Fig. 12 に示すように、獲得試行において、同モデルに対して Vehicle を投与した群 (●) では、偽手術群 (○) と比較し、獲得試行 2 日目、3 日目、4 日目の escape latency が有意に延長し、この escape latency の延長は、bFGF を 25 ng/1 μ l の用量で投与 (□) することによって、抑制される傾向が認められ (4 日目において $p = 0.09$, vs Vehicle 群)、bFGF が本モデルにおける学習障害を改善する可能性が示唆された (Fig. 12A)。

最終獲得試行終了の 2 時間後に行った保持試行においては、Vehicle を投与した群 (Vehicle 群) では、偽手術群 (Sham 群) に対し、annulus crossing (プラットフォーム位置の横切り回数) の有意な低下が認められ、この低下は、bFGF を 25 ng/1 μ l の用量で投与することにより (bFGF 群)、有意差はないものの高値を示し (抑制率は 51%)、bFGF が本モデルにおける記憶障害を改善する可能性があることが示唆された (Fig. 12B)

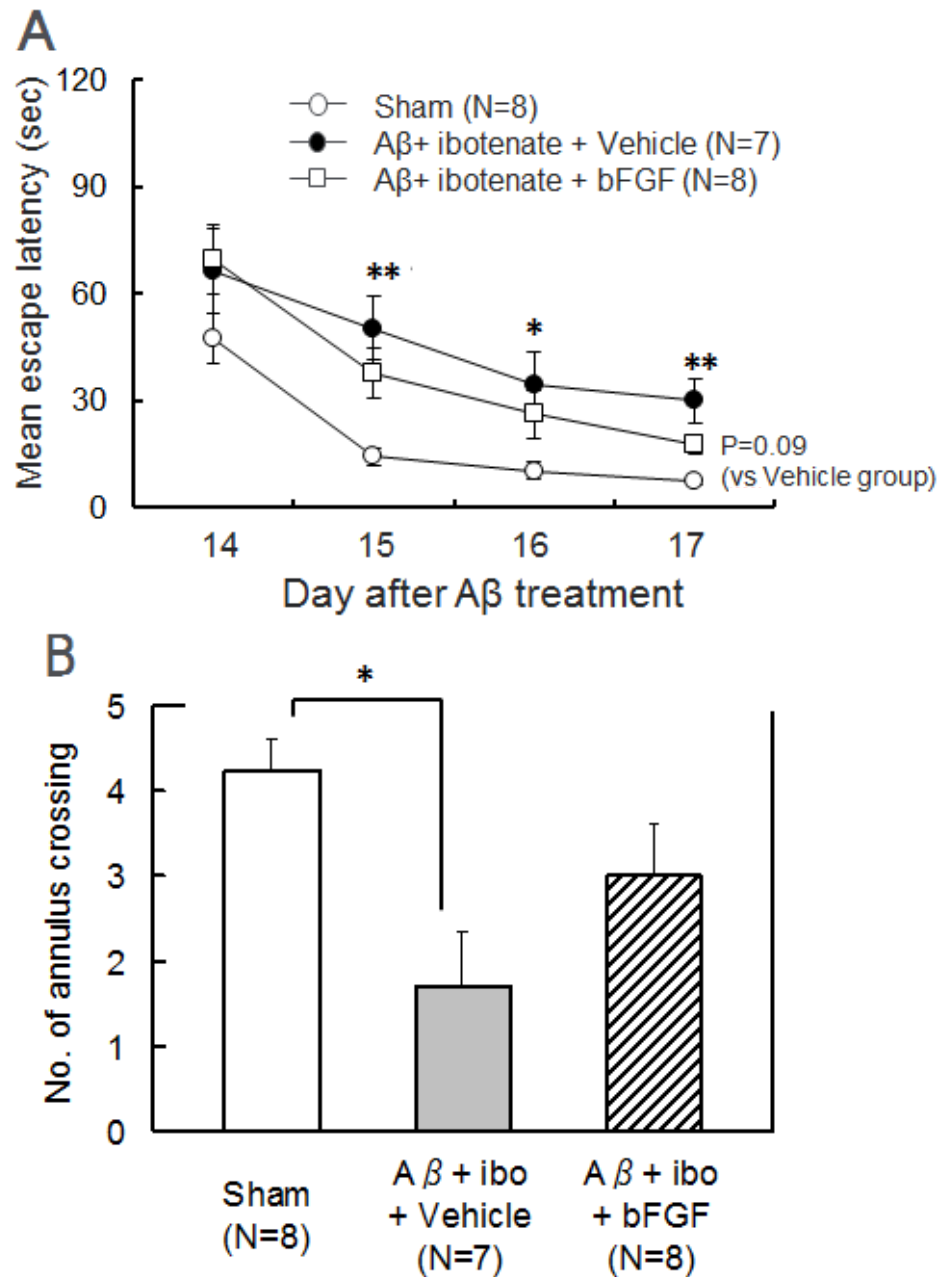


Fig. 12 Effect of bFGF on water maze performance in rats subjected to bilateral sequential injections of A β_{1-40} and ibotenate into the hippocampus.

A β_{1-40} (4 μ g/1 μ l) was bilaterally injected into the hippocampus of rats, and subsequently ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l) was injected into the same sites 48 h after the A β_{1-40} treatment. bFGF solution (25 ng/1 μ l) or saline (1 μ l) was injected into the same site 24 h after the A β_{1-40} injection. A: Acquisition trials were performed for 4 days on the days 14 - 17 after the injection of A β . B: A probe trial was conducted for 60 s at 2 h after the final acquisition test. Data represent the mean \pm S.E.M. Number of rats used is indicated in parentheses. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Sham (Dunnett's test)

(2) 生化学的試験

行動試験終了後に採取した海馬を用い、PTBBS 結合能 (神経細胞傷害マーカー)、ChAT 活性 (コリン作動性神経終末マーカー)、および HC-3 結合能 (コリン作動性神経終末におけるコリン再取り込み部位マーカー) を測定した。Fig. 13 に示すように、Vehicle 群では Sham 群に対し、PTBBS 結合能の有意な増加が認められ、この PTBBS 結合能の増加は、bFGF を 25 ng/1 μ l の用量で海馬内注入 (bFGF 群) することによって有意に抑制された (Fig. 13A)。一方、ChAT 活性および HC-3 結合能は、Vehicle 群では Sham 群に対し有意な低下が認められたが (Fig. 13B, C)、これらの低下に対し、bFGF は有意な改善効果を示さなかった (Fig. 13B, C)。

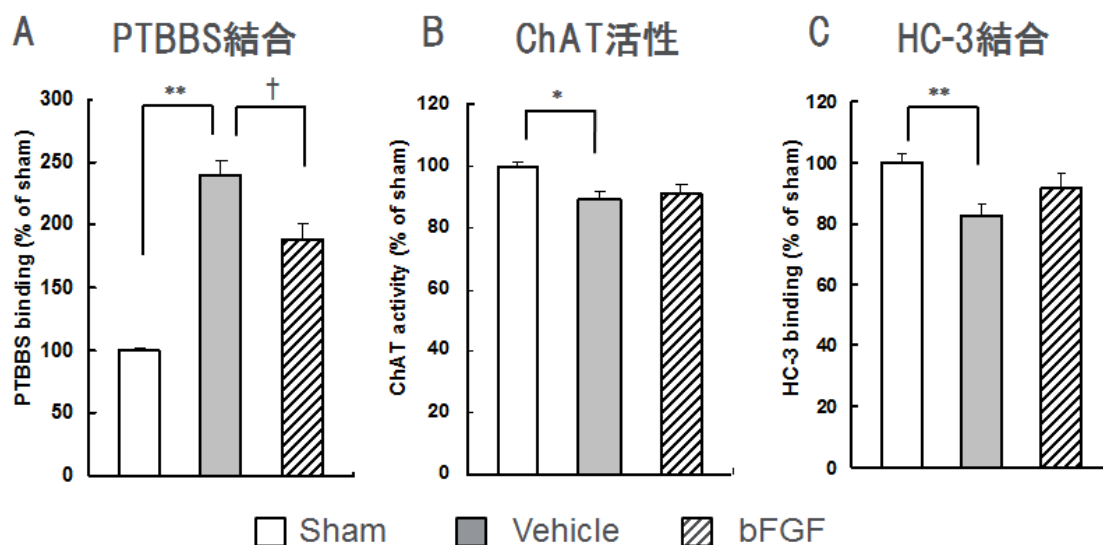


Fig. 13 Effect of bFGF on neuronal damage in rats subjected to bilateral sequential injections of A β ₁₋₄₀ and ibotenate into the hippocampus.

A β ₁₋₄₀ (4 μ g/1 μ l) was bilaterally injected into the hippocampus of rats, and subsequently ibotenate (0.3 μ g/0.5 μ l) was injected into the same sites 48 h after the A β ₁₋₄₀ injection. bFGF solution (25 ng/1 μ l) or saline (1 μ l) was injected into the same site 24 h after the A β ₁₋₄₀ injection. On the day 17, after the learning and memory tasks were completed, PTBBS (A), ChAT (B) and HC-3 binding (C) in the left hippocampus were measured. The data represent the mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Sham, † $p < 0.05$ vs Vehicle (Dunnett's test)

第4節 考察

第3章では、第2章で構築した A β および興奮性アミノ酸を組み合わせにより惹起される *in vitro* 神経傷害モデルおよびラット学習・記憶障害モデルを用い bFGF の効果を検討した。その結果、bFGF は両モデルにおいて神経細胞傷害を抑制し、また *in vivo* における学習・記憶障害を改善することが示された。bFGF の認知機能改善効果についてはこれまでに、ラット外傷性脳損傷モデルを用いた実験で報告されているが [92]、本研究は A β および興奮性アミノ酸により惹起される認知機能障害モデルに対して bFGF が有効であることを示した初めての報告である。AD においては、神経細胞毒性を示す A β の蓄積 [94] や興奮性アミノ酸受容体の過剰活性化 [66] が神経細胞死に関与していることが報告されていることや既に AD の治療に使われているメマンチンが同じ *in vivo* モデルに効果を示すこと（第2章）を考えると、本章で得られた結果は、bFGF の AD 治療薬としての有用性を示唆するものである。

bFGF が細胞死を抑制することは、神経細胞のみならず、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞など様々な細胞で報告されており [95]、このような bFGF の細胞保護作用には細胞内カルシウム濃度の恒常性維持作用が関与していると考えられている [95]。さらに、この bFGF の細胞内カルシウム濃度の恒常性維持作用には、カルシウム結合蛋白質である Calbindin-D 28k の発現誘導が関与していることが報告されている [96, 97]。実際、今回データは示していないが、著者が実施した大脳皮質由来神経細胞を用いた予試験において、bFGF が Calbindin-D 28k の発現を亢進し、さらに A β およびグルタミン酸によって誘発される細胞内カルシウム濃度の上昇を抑制することを確認している。

bFGF の細胞保護作用には、Calbindin-D 28k に加え、抗酸化酵素や抗アポトーシス蛋白が関与している可能性も考えられる [96]。例えば、bFGF は、抗酸化酵素であるカタラーゼの産生を亢進することが報告されている [98]。また、bFGF は神経細胞において、Bcl-2 や Bax の発現量の調節を介して、一酸化窒素によって誘発されるアポトーシス抑制することが報告されている [99]。なお、この bFGF による Bcl-2 の発現亢進作用は、ヒト B 細胞白血病細胞株 [100] や NIH-3T3（マウス胎仔由来線維芽細胞株）[101]を用いた検討でも報告されている。

ラットを用いた *in vivo* 試験では、bFGF は A β およびイボテン酸により惹起される学習・記憶障害を抑制した。一方、これまでに、正常ラットに bFGF を行動実験の訓練の 15 分前に皮下投与することにより長期記憶が亢進することや [102]、正常ラットに bFGF を2週間脳室内注入することにより、海馬歯状回での神経細胞新生が亢進すること [103]が報告されている。これらの知見は、bFGF が神経機能障害ラットと同様、正常ラットの学習・記憶機能を亢進する可能性を示している。本研究において、正常ラットにおける bFGF の作用を検討していないため、本モデルにおける正常ラットに対する bFGF の効果は不明であり、そのような作用が A β およびイボテン酸により惹起される学習・記憶障害に対する bFGF の効果に寄与している可能性は否定できない。

bFGF はまた、*in vivo* 試験において、A β およびイボテン酸によって惹起される PTBBS 結合能の増加を抑制した。PTBBS 結合能は一般に脳傷害後に顕著に増加する。またグリオース（神経膠症）を反映するといわれており、信頼性の高い脳傷害のマーカーと考えられる。末梢性ベンゾジアゼピン

結合部位である PTBBS は、ミクログリアに比較的多くが存在しており [104]、したがって、bFGF による PTBBS 結合能の増加抑制は、bFGF が神経細胞保護作用を示した結果、脱落した神経細胞の排除のために集積するミクログリアが減少したことを反映していると考えられる。しかしながら、bFGF が、AD 病態の発症や進行に関与していると考えられているミクログリアの活性化 [81, 105] 自体に対し作用した可能性も否定は出来ない。

本試験において、コリン作動性神経系マーカー (ChAT, HC-3) に対する bFGF の効果は確認されなかったが、その理由の一つとして、試験に用いたモデルにおけるコリン神経の傷害が軽度であった可能性が考えられる。大脳基底核 (内側中隔核、ブローカ対角帯核、マイネルト基底核等) から前脳皮質、海馬に投射するコリン作動性神経は、人や実験動物における学習・記憶に重要と考えられており [106]、実際、コリン作動性神経傷害が学習機能に及ぼす影響が迷路試験などを用いて報告されている [107, 108]。本試験において、A β およびイボテン酸は、コリン作動性神経核が存在する内側中隔核ではなく、内側中隔核からコリン作動性神経が投射する海馬に注入したため、コリン作動性神経は十分な傷害を受けず傷害が軽度であったため、bFGF の作用が検出されなかったのかも知れない。また、別の理由として、今回用いた bFGF の用量が不十分であった可能性が考えられる。*In vitro* における検討では、bFGF は 3 ng/ml の濃度で完全な神経細胞保護作用を示したため、*in vivo* における検討では、5 ng/1 μ l (= 5,000 ng/ml) の用量は適切であると考えた。しかしながら、Srivastava らが bFGF の学習・記憶改善効果やコリン作動性神経傷害改善効果を確認した試験では、bFGF は 500 ng/2 μ l の用量で海馬歯状回に注入されており [109]、本試験の用量よりもかなり高い。*In vivo* におけるコリン作動性神経に対する bFGF の効果に関してはさらなる解析が必要である。

本研究では、A β およびイボテン酸によって誘発される神経細胞傷害に対する bFGF の神経細胞保護作用に注目した。近年、A β が、神経細胞傷害を惹起しない条件下で学習・記憶に関与する長期増強 [110] やシナプス形成 [111] を阻害することが示されている。一方、bFGF は、海馬神経細胞の神経突起伸展や分岐形成を促進するのみならず [112, 113]、長期増強を促進することが報告されている [114]。これらの知見を考え合わせると、bFGF による学習・記憶機能の改善に神経細胞保護作用以外の作用メカニズムが関与している可能性も考えられる。

以上、本章では A β および興奮性アミノ酸によって惹起される神経細胞傷害モデルを用い bFGF の効果を検討した。その結果、bFGF は、A β および興奮性アミノ酸によって惹起される *in vitro* の神経細胞傷害を改善するだけでなく、両者の併用で誘導される *in vivo* における神経傷害および学習障害を改善することが示された。本章の知見は、bFGF が神経細胞保護作用により AD 患者において有益な効果を示す可能性を示唆するものである。

第5節 小括

第3章においては、A β および興奮性アミノ酸を組み合わせにより惹起される神経細胞傷害モデル (*in vitro* および *in vivo*) を用い、bFGF の作用を検討し、下記の知見を得ることが出来た。

- bFGF は、A β 添加の48時間後にグルタミン酸 (30 μ M) を添加する *in vitro* 神経細胞傷害評価系において、グルタミン酸処置の24時間前に添加することにより、0.3~3.0 ng/mL の範囲で濃度依存的な抑制効果を示し、3.0 ng/mL において、ほぼ完全な阻害作用を示した。
- bFGF (25 μ g/1 ml) は、A β およびイボテン酸を48時間間隔でラット海馬に注入するモデルにおいて、神経細胞傷害マーカーである PTBBS の上昇を有意に抑制し、モリス式水迷路における学習・記憶障害に対し改善傾向を示した。

以上の結果は、bFGF が AD 患者において有益な効果を示す可能性を示唆するものである。

総括

本研究ではまず、 $A\beta$ によって惹起されるラット神経傷害モデルを用い、nAChR 作動薬であるニコチンの効果を行動試験および生化学的試験により検討した。その結果、ニコチンはコリン作動性神経の機能亢進を介して学習・記憶障害を改善することが判明した。

次に、 $A\beta$ および興奮性アミノ酸が、*in vitro* および *in vivo* において、相乗的な神経細胞傷害作用を示すことを検証した上で、 $A\beta$ と興奮性アミノ酸を組み合わせで惹起する *in vitro* 神経細胞傷害モデルおよびラット学習・記憶障害モデルを構築した。そして、 $A\beta$ と興奮性アミノ酸によって誘発されるラット神経傷害モデルを用いメマンチンが神経傷害および学習障害を改善することを確認するとともに、bFGF が、 $A\beta$ および興奮性アミノ酸によって惹起される *in vitro* の神経細胞傷害を改善するだけでなく、両者の併用で誘導される *in vivo* における神経傷害および学習・記憶障害を改善することを示した。

本研究の知見は、 $A\beta$ と興奮性アミノ酸の併用によって惹起される神経細胞傷害モデルの有用性を示すとともに、メマンチンに加え、ニコチンおよびbFGF が AD 治療薬としてのポテンシャルを有していることを示唆するものである。

謝辞

本論文の作成にあたり、本研究に関して有益な御指導と御校閲を賜りました京都薬科大学 山本 昌教授に謹んで感謝の意を表します。また、本論文をご精読いただき有益なコメントをいただきました京都薬科大学 赤路 健一教授、加藤 伸一教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究を遂行する上で多大なる御教示と御援助を賜りました大野 知親博士、中村 静雄博士、村山 宣人氏、葛城 涼子氏、岡 哲志氏、井上 照好氏に心から感謝致します。また、本論文の作成に際し、御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました福田 好晃博士に深く感謝致します。

本研究に御協力いただきましたアスビオファーマ株式会社の方々に厚くお礼申し上げます。

引用文献

1. Fratiglioni, L., D. De Ronchi, and H. Aguero-Torres, *Worldwide prevalence and incidence of dementia*. Drugs & aging, 1999. **15**(5): p. 365-75.
2. Small, G.W., et al., *Diagnosis and treatment of Alzheimer disease and related disorders. Consensus statement of the American Association for Geriatric Psychiatry, the Alzheimer's Association, and the American Geriatrics Society*. Jama, 1997. **278**(16): p. 1363-71.
3. Querfurth, H.W. and F.M. LaFerla, *Alzheimer's disease*. The New England journal of medicine, 2010. **362**(4): p. 329-44.
4. 認知症 最新医学 別冊, 2010.
5. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
6. Braak, H. and E. Braak, *Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes*. Acta neuropathologica, 1991. **82**(4): p. 239-59.
7. Perry, E.K., et al., *Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's and Parkinson's diseases*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 1987. **50**(6): p. 806-9.
8. Quirion, R., et al., *Neurotransmitter and receptor deficits in senile dementia of the Alzheimer type*. The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques, 1986. **13**(4 Suppl): p. 503-10.
9. Kadir, A., et al., *PET imaging of cortical IIC-nicotine binding correlates with the cognitive function of attention in Alzheimer's disease*. Psychopharmacology, 2006. **188**(4): p. 509-20.
10. Nordberg, A., *Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications*. Biological psychiatry, 2001. **49**(3): p. 200-10.
11. Masliah, E., et al., *Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease*. Annals of neurology, 1996. **40**(5): p. 759-66.
12. Rothman, S.M. and J.W. Olney, *Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years*. Trends in neurosciences, 1995. **18**(2): p. 57-8.

13. Hardy, J., *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis: an update and reappraisal*. Journal of Alzheimer's disease : JAD, 2006. **9**(3 Suppl): p. 151-3.
14. Mattson, M.P., *Pathways towards and away from Alzheimer's disease*. Nature, 2004. **430**(7000): p. 631-9.
15. Singh, S., et al., *Current therapeutic strategy in Alzheimer's disease*. European review for medical and pharmacological sciences, 2012. **16**(12): p. 1651-64.
16. Ribeiro, F.M., et al., *Animal models of neurodegenerative diseases*. Rev Bras Psiquiatr, 2013. **35 Suppl 2**: p. S82-91.
17. LaFerla, F.M. and K.N. Green, *Animal models of Alzheimer disease*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2012. **2**(11).
18. Barnes, C.A., L. Nadel, and W.K. Honig, *Spatial memory deficit in senescent rats*. Canadian journal of psychology, 1980. **34**(1): p. 29-39.
19. Takeda, T., et al., *A new murine model of accelerated senescence*. Mechanisms of ageing and development, 1981. **17**(2): p. 183-94.
20. Lannert, H. and S. Hoyer, *Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats*. Behavioral neuroscience, 1998. **112**(5): p. 1199-208.
21. Miyamoto, M., et al., *Lesioning of the rat basal forebrain leads to memory impairments in passive and active avoidance tasks*. Brain research, 1985. **328**(1): p. 97-104.
22. Webster, S.J., et al., *Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models*. Frontiers in genetics, 2014. **5**: p. 88.
23. Morris, R., *Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat*. Journal of neuroscience methods, 1984. **11**(1): p. 47-60.
24. Morris, R.G., et al., *Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions*. Nature, 1982. **297**(5868): p. 681-3.
25. Morris, R.G., et al., *Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5*. Nature, 1986. **319**(6056): p. 774-6.

26. van der Poel, A.M., *Ethological study of the behaviour of the albino rat in a passive-avoidance test*. Acta physiologica et pharmacologica Neerlandica, 1967. **14**(4): p. 503-5.
27. Drisdel, R.C. and W.N. Green, *Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2000. **20**(1): p. 133-9.
28. Elgoyhen, A.B., et al., *alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(6): p. 3501-6.
29. Millar, N.S. and C. Gotti, *Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors*. Neuropharmacology, 2009. **56**(1): p. 237-46.
30. Role, L.W., *Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels*. Current opinion in neurobiology, 1992. **2**(3): p. 254-62.
31. Lee, P.N., *Smoking and Alzheimer's disease: a review of the epidemiological evidence*. Neuroepidemiology, 1994. **13**(4): p. 131-44.
32. Newhouse, P.A., et al., *Intravenous nicotine in Alzheimer's disease: a pilot study*. Psychopharmacology, 1988. **95**(2): p. 171-5.
33. White, H.K. and E.D. Levin, *Four-week nicotine skin patch treatment effects on cognitive performance in Alzheimer's disease*. Psychopharmacology, 1999. **143**(2): p. 158-65.
34. Guan, Z.Z., W.F. Yu, and A. Nordberg, *Dual effects of nicotine on oxidative stress and neuroprotection in PC12 cells*. Neurochemistry international, 2003. **43**(3): p. 243-9.
35. Hejmadi, M.V., et al., *Neuroprotection by nicotine against hypoxia-induced apoptosis in cortical cultures involves activation of multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes*. Molecular and cellular neurosciences, 2003. **24**(3): p. 779-86.
36. Shim, S.B., et al., *Nicotine leads to improvements in behavioral impairment and an increase in the nicotine acetylcholine receptor in transgenic mice*. Neurochemical research, 2008. **33**(9): p. 1783-8.
37. Nakamura, S., et al., *Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide*. Brain research, 2001. **912**(2): p. 128-36.

38. Tani, Y., et al., *Pharmacological characterization of nicotinic receptor-mediated acetylcholine release in rat brain--an in vivo microdialysis study*. European journal of pharmacology, 1998. **351**(2): p. 181-8.
39. Fonnum, F., *A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase*. Journal of neurochemistry, 1975. **24**(2): p. 407-9.
40. Manaker, S., C.M. Wieczorek, and T.C. Rainbow, *Identification of sodium-dependent, high-affinity choline uptake sites in rat brain with [3H]hemicholinium-3*. Journal of neurochemistry, 1986. **46**(2): p. 483-8.
41. Srivareerat, M., et al., *Chronic nicotine restores normal Abeta levels and prevents short-term memory and E-LTP impairment in Abeta rat model of Alzheimer's disease*. Neurobiology of aging, 2011. **32**(5): p. 834-44.
42. Boess, F.G., et al., *The novel alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist N-[(3R)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-yl]-7-[2-(methoxy)phenyl]-1-benzofuran-2-carboxamide improves working and recognition memory in rodents*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2007. **321**(2): p. 716-25.
43. Novakova, J., et al., *Chronic treatment with amyloid beta(1-42) inhibits non-cholinergic high-affinity choline transport in NG108-15 cells through protein kinase C signaling*. Brain research, 2005. **1062**(1-2): p. 101-10.
44. Kihara, T., et al., *Stimulation of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors inhibits beta-amyloid toxicity*. Brain research, 1998. **792**(2): p. 331-4.
45. Kihara, T., et al., *alpha 7 nicotinic receptor transduces signals to phosphatidylinositol 3-kinase to block A beta-amyloid-induced neurotoxicity*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(17): p. 13541-6.
46. Marchi, M. and M. Grilli, *Presynaptic nicotinic receptors modulating neurotransmitter release in the central nervous system: functional interactions with other coexisting receptors*. Progress in neurobiology, 2010. **92**(2): p. 105-11.
47. Wonnacott, S., *Presynaptic nicotinic ACh receptors*. Trends in neurosciences, 1997. **20**(2): p. 92-8.
48. Dickinson, J.A., J.N. Kew, and S. Wonnacott, *Presynaptic alpha 7- and beta 2-containing nicotinic acetylcholine receptors modulate excitatory amino acid release from rat prefrontal*

- cortex nerve terminals via distinct cellular mechanisms*. Molecular pharmacology, 2008. **74**(2): p. 348-59.
49. Khadrawy, Y.A., K.A. El-Shamy, and S.I. Mohamed, *Nicotine restores monoamine neurotransmitter changes in the cortex and hippocampus of reserpinized rats as a model of depression*. European review for medical and pharmacological sciences, 2011. **15**(8): p. 863-70.
 50. Marshall, D., et al., *Tetrodotoxin-sensitivity of nicotine-evoked dopamine release from rat striatum*. Neuropharmacology, 1996. **35**(11): p. 1531-6.
 51. Marshall, D.L., P.H. Redfern, and S. Wonnacott, *Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by in vivo microdialysis: comparison of naive and chronic nicotine-treated rats*. Journal of neurochemistry, 1997. **68**(4): p. 1511-9.
 52. Toth, E., E.S. Vizi, and A. Lajtha, *Effect of nicotine on levels of extracellular amino acids in regions of the rat brain in vivo*. Neuropharmacology, 1993. **32**(8): p. 827-32.
 53. Zappettini, S., et al., *Presynaptic nicotinic alpha7 and non-alpha7 receptors stimulate endogenous GABA release from rat hippocampal synaptosomes through two mechanisms of action*. PloS one, 2011. **6**(2): p. e16911.
 54. Zappettini, S., et al., *Pre-synaptic nicotinic receptors evoke endogenous glutamate and aspartate release from hippocampal synaptosomes by way of distinct coupling mechanisms*. British journal of pharmacology, 2010. **161**(5): p. 1161-71.
 55. Zappettini, S., et al., *Different presynaptic nicotinic receptor subtypes modulate in vivo and in vitro the release of glycine in the rat hippocampus*. Neurochemistry international, 2011. **59**(5): p. 729-38.
 56. Parikh, V., et al., *Glutamatergic contributions to nicotinic acetylcholine receptor agonist-evoked cholinergic transients in the prefrontal cortex*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2008. **28**(14): p. 3769-80.
 57. Sarter, M., V. Parikh, and W.M. Howe, *nAChR agonist-induced cognition enhancement: integration of cognitive and neuronal mechanisms*. Biochemical pharmacology, 2009. **78**(7): p. 658-67.
 58. Hahn, B. and I.P. Stolerman, *Nicotine-induced attentional enhancement in rats: effects of*

- chronic exposure to nicotine*. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 2002. **27**(5): p. 712-22.
59. Stolerman, I.P., et al., *Nicotine in an animal model of attention*. European journal of pharmacology, 2000. **393**(1-3): p. 147-54.
 60. Brunetti, M., et al., *Aripiprazole, alcohol and substance abuse: a review*. European review for medical and pharmacological sciences, 2012. **16**(10): p. 1346-54.
 61. Liu, Z., et al., *Effect of nicotine withdrawal on pain sensitivity in rats to mechanical stimulation and thermal stimulation*. European review for medical and pharmacological sciences, 2014. **18**(18): p. 2759-65.
 62. Harris, M.E., et al., *beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease*. Neuroreport, 1995. **6**(14): p. 1875-9.
 63. Malyshev, I.Y., et al., *Possible use of adaptation to hypoxia in Alzheimer's disease: a hypothesis*. Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, 2005. **11**(8): p. HY31-8.
 64. Sutton, E.T., G.R. Hellermann, and T. Thomas, *beta-amyloid-induced endothelial necrosis and inhibition of nitric oxide production*. Experimental cell research, 1997. **230**(2): p. 368-76.
 65. Crawford, F., et al., *Characteristics of the in vitro vasoactivity of beta-amyloid peptides*. Experimental neurology, 1998. **150**(1): p. 159-68.
 66. Mattson, M.P., et al., *beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1992. **12**(2): p. 376-89.
 67. Podlisny, M.B., et al., *Synthetic amyloid beta-protein fails to produce specific neurotoxicity in monkey cerebral cortex*. Neurobiology of aging, 1992. **13**(5): p. 561-7.
 68. Rush, D.K., S. Aschmies, and M.C. Merriman, *Intracerebral beta-amyloid(25-35) produces tissue damage: is it neurotoxic?* Neurobiology of aging, 1992. **13**(5): p. 591-4.
 69. Stein-Behrens, B., et al., *Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat*. Neurobiology of aging, 1992. **13**(5): p. 577-9.

70. Matos, M., et al., *Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades*. Neuroscience, 2008. **156**(4): p. 898-910.
71. Tremblay, R., et al., *Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2000. **20**(19): p. 7183-92.
72. Dorman, W.A., et al., *Bilateral injections of beta A(25-35) + IBO into the hippocampus disrupts acquisition of spatial learning in the rat*. Neuroreport, 1993. **5**(2): p. 165-8.
73. Morimoto, K., et al., *Co-injection of beta-amyloid with ibotenic acid induces synergistic loss of rat hippocampal neurons*. Neuroscience, 1998. **84**(2): p. 479-87.
74. Parsons, C.G., R. Gruner, and J. Rozental, *Comparative patch clamp studies on the kinetics and selectivity of glutamate receptor antagonism by 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline (NBQX) and 1-(4-amino-phenyl)-4-methyl-7,8-methyl-endioxyl-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI 52466)*. Neuropharmacology, 1994. **33**(5): p. 589-604.
75. Parsons, C.G., et al., *Patch clamp studies on the kinetics and selectivity of N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by memantine (1-amino-3,5-dimethyladamantan)*. Neuropharmacology, 1993. **32**(12): p. 1337-50.
76. Frankiewicz, T., et al., *Effects of memantine and MK-801 on NMDA-induced currents in cultured neurones and on synaptic transmission and LTP in area CA1 of rat hippocampal slices*. British journal of pharmacology, 1996. **117**(4): p. 689-97.
77. Kornhuber, J. and G. Quack, *Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man*. Neuroscience letters, 1995. **195**(2): p. 137-9.
78. Demerle-Pallardy, C., et al., *Peripheral type benzodiazepine binding sites following transient forebrain ischemia in the rat: effect of neuroprotective drugs*. Brain research, 1991. **565**(2): p. 312-20.
79. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Analytical biochemistry, 1985. **150**(1): p. 76-85.
80. Bruce-Keller, A.J., et al., *4-Hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, damages*

- cholinergic neurons and impairs visuospatial memory in rats*. Journal of neuropathology and experimental neurology, 1998. **57**(3): p. 257-67.
81. Mark, R.J., et al., *Amyloid beta-peptide impairs glucose transport in hippocampal and cortical neurons: involvement of membrane lipid peroxidation*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1997. **17**(3): p. 1046-54.
 82. Keller, J.N., et al., *17Beta-estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid beta-peptide and iron*. Journal of neuroscience research, 1997. **50**(4): p. 522-30.
 83. Zhu, Y.J., H. Lin, and R. Lal, *Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2000. **14**(9): p. 1244-54.
 84. Kowall, N.W., et al., *In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment*. Neurobiology of aging, 1992. **13**(5): p. 537-42.
 85. Yankner, B.A., L.K. Duffy, and D.A. Kirschner, *Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides*. Science, 1990. **250**(4978): p. 279-82.
 86. Zajackowski, W., G. Quack, and W. Danysz, *Infusion of (+) -MK-801 and memantine -- contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion*. European journal of pharmacology, 1996. **296**(3): p. 239-46.
 87. Beenken, A. and M. Mohammadi, *The FGF family: biology, pathophysiology and therapy*. Nature reviews. Drug discovery, 2009. **8**(3): p. 235-53.
 88. Morrison, R.S., et al., *Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(19): p. 7537-41.
 89. Walicke, P.A., *Basic and acidic fibroblast growth factors have trophic effects on neurons from multiple CNS regions*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 1988. **8**(7): p. 2618-27.
 90. Jiang, N., et al., *Delayed intravenous administration of basic fibroblast growth factor (bFGF) reduces infarct volume in a model of focal cerebral ischemia/reperfusion in the rat*.

Journal of the neurological sciences, 1996. **139**(2): p. 173-9.

91. Yamada, K., et al., *Basic fibroblast growth factor prevents thalamic degeneration after cortical infarction*. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1991. **11**(3): p. 472-8.
92. Sun, D., et al., *Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury*. Experimental neurology, 2009. **216**(1): p. 56-65.
93. Bogousslavsky, J., et al., *Fiblast (trafermin) in acute stroke: results of the European-Australian phase II/III safety and efficacy trial*. Cerebrovasc Dis, 2002. **14**(3-4): p. 239-51.
94. Koh, J.Y., L.L. Yang, and C.W. Cotman, *Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage*. Brain research, 1990. **533**(2): p. 315-20.
95. Peluso, J.J., *Basic fibroblast growth factor (bFGF) regulation of the plasma membrane calcium ATPase (PMCA) as part of an anti-apoptotic mechanism of action*. Biochemical pharmacology, 2003. **66**(8): p. 1363-9.
96. Ay, H., et al., *Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke*. Cerebrovasc Dis, 1999. **9**(3): p. 131-5.
97. Pappas, I.S. and J.G. Parnavelas, *Neurotrophins and basic fibroblast growth factor induce the differentiation of calbindin-containing neurons in the cerebral cortex*. Experimental neurology, 1997. **144**(2): p. 302-14.
98. Liu, X., X.Z. Zhu, and X.Q. Ji, *Effect of basic fibroblast growth factor on focal ischemic injury and antioxidant enzyme activities*. Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica, 1999. **20**(3): p. 227-31.
99. Tamatani, M., et al., *Growth factors prevent changes in Bcl-2 and Bax expression and neuronal apoptosis induced by nitric oxide*. Cell death and differentiation, 1998. **5**(10): p. 911-9.
100. Konig, A., et al., *Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis*. Leukemia, 1997. **11**(2): p. 258-65.

101. Wieder, R., et al., *Low level expression of basic FGF upregulates Bcl-2 and delays apoptosis, but high intracellular levels are required to induce transformation in NIH 3T3 cells*. Growth Factors, 1997. **15**(1): p. 41-60.
102. Graham, B.M. and R. Richardson, *Acute systemic fibroblast growth factor-2 enhances long-term memory in developing rats*. Neurobiology of learning and memory, 2009. **91**(4): p. 424-30.
103. Rai, K.S., B. Hattiangady, and A.K. Shetty, *Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions*. The European journal of neuroscience, 2007. **26**(7): p. 1765-79.
104. Venneti, S., B.J. Lopresti, and C.A. Wiley, *The peripheral benzodiazepine receptor (Translocator protein 18kDa) in microglia: from pathology to imaging*. Progress in neurobiology, 2006. **80**(6): p. 308-22.
105. Di Francesco, L., et al., *14-3-3epsilon marks the amyloid-stimulated microglia long-term activation*. Proteomics, 2012. **12**(1): p. 124-34.
106. Bartus, R.T., et al., *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. Science, 1982. **217**(4558): p. 408-14.
107. Gibbs, R.B. and D.A. Johnson, *Cholinergic lesions produce task-selective effects on delayed matching to position and configural association learning related to response pattern and strategy*. Neurobiology of learning and memory, 2007. **88**(1): p. 19-32.
108. Leanza, G., A. Martinez-Serrano, and A. Bjorklund, *Amelioration of spatial navigation and short-term memory deficits by grafts of foetal basal forebrain tissue placed into the hippocampus and cortex of rats with selective cholinergic lesions*. The European journal of neuroscience, 1998. **10**(7): p. 2353-70.
109. Srivastava, N., et al., *Functional restoration using basic fibroblast growth factor (bFGF) infusion in Kainic acid induced cognitive dysfunction in rat: neurobehavioural and neurochemical studies*. Neurochemical research, 2008. **33**(7): p. 1169-77.
110. Barry, A.E., et al., *Alzheimer's disease brain-derived amyloid-beta-mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2011. **31**(20): p. 7259-63.

111. Ronicke, R., et al., *Early neuronal dysfunction by amyloid beta oligomers depends on activation of NR2B-containing NMDA receptors*. Neurobiology of aging, 2011. **32**(12): p. 2219-28.
112. Ikegaya, Y., et al., *Distance of target search of isolated rat hippocampal neuron is about 150 microm*. Neuroscience, 2000. **97**(2): p. 215-7.
113. Katsuki, H., Y. Itsukaichi, and N. Matsuki, *Distinct signaling pathways involved in multiple effects of basic fibroblast growth factor on cultured rat hippocampal neurons*. Brain research, 2000. **885**(2): p. 240-50.
114. Ishiyama, J., H. Saito, and K. Abe, *Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor promote the generation of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats*. Neuroscience research, 1991. **12**(3): p. 403-11.