

氏名 (生年月日) **野下敬史** (1973年4月12日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第195号

学位授与の日付 2015年9月30日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 (主査) 教授 山本 昌

(副査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 加藤 伸一

論文内容の要旨

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能が徐々に低下し失われていく神経変性疾患で、組織学的変化として神経原線維変化や老人斑と呼ばれるアミロイドβ蛋白 (Aβ) の異常蓄積を特徴としている。AβはADの発症に極めて重要な役割を担っていると考えられているが、ADにおける神経細胞死には、Aβに加え、グルタミン酸 (NMDA [N-methyl-D-aspartate] 受容体リガンド) が関与していると考えられている。例えば、AD患者の死後脳ではグルタミン酸トランスポーターの活性が低下しており、また、AD患者の脳脊髄液中ではグルタミン酸濃度が上昇している。ADにおいてはさらに、アセチルコリン (ACh) の関与が知られており、実際にAD患者ではニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の密度やそのリガンド ACh の量が減少している。ADにおけるこれらの病態メカニズムを反映して、NMDA 受容体リガンド (メマンチン) や ACh エステラーゼ阻害剤 (ドネペジル等) が AD 治療薬として使用されている。さらに、ADの治癒や寛解を目指し、Aβ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等の臨床開発が行われている。これらの薬剤の開発には、遺伝子改変モデル、老化モデル、神経傷害モデル等、多種多様なADの動物モデルが使用されるが、これまでに完全にADの病態を反映した動物モデルは存在しない。遺伝子改変モデルは、家族性ADの遺伝子変異等を導入したモデルで、Aβやタウ蛋白等の発現変化を再現することができるが、単一の遺伝子改変導入では神経変性の検出が困難である、維持・繁殖自体が困難である等の問題点がある。老化モデルは、ADの危険因子である老化自体により惹起する自然発症モデルであり、加齢依存的な行動異常や神経伝達物質の発現変化を伴う等の特徴があるが、自然発症までに加齢を要する、またAβやTau蛋白の発現異常などの疾患特異的な変化が見られない等の問題点がある。神経傷害モデルは、Aβやイボテン酸等を注入することにより惹起するモデルで、正常動物から作製可能、認知症関連部位の変性を再現できるなどの特徴があるが、問題点としては逆に部位限定的な変性で、必ずしも多様な病理変化を再現できないという点が挙げられる。本研究では、既存の神経傷害モデルであるAβを脳室内に注入することにより惹起されるラット神経傷害モデルを用い、nAChR アゴニストであるニコチンの効果を検討した。さらに、新たにAβとグルタミン酸等の興奮性アミノ酸の併用により惹起される神経傷害モデルを構築し、メマンチンおよび塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の効果を検討した。

【内容】

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

脳室内に A β を注入したラットでは、モリス式水迷路試験等における学習・記憶障害が誘発されることが報告されている。本研究では、A β (20 μ g/body) を脳室内に3日間持続注入したラットに対し、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、腹腔内投与した結果、A β 注入により惹起されるモリス式水迷路における学習・記憶障害が有意に改善した。A β の注入により、前部大脳皮質、後部大脳皮質および海馬において、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 (hemicholinium-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。一方、A β の注入により、線条体においてコリン作動性神経細胞のマーカーである ChAT (choline acetyltransferase) 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。

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

AD において重要な役割を担っていると考えられる A β および興奮性アミノ酸の併用効果を *in vitro* および *in vivo* で検討した。ラット初代培養神経細胞に対し、A β (1.0 μ M) 添加の48時間後にグルタミン酸 (30 μ M) を添加したところ、A β またはグルタミン酸を単独で添加した場合に比べ、より顕著な細胞傷害が認められた。次に、凝集させた A β およびイボテン酸をラット海馬に注入し、神経傷害および学習・記憶機能に対する効果を検討した。A β (4 μ g/1 μ l) 注入の48時間後にイボテン酸 (0.3 μ g/0.5 μ l) を注入したところ、A β またはイボテン酸を単独で注入した場合に比べ、より顕著な神経細胞傷害が認められ、モリス式水迷路試験においても顕著な学習・記憶障害が観察された。さらに、この A β およびイボテン酸により誘起する神経傷害モデルを用い、NMDA 遮断薬であるメマンチンおよび MK-801 の効果を検討した。ラットの海馬に A β およびイボテン酸を同様に注入することにより惹起される神経傷害は、イボテン酸注入の24時間前からメマンチン (10, 20 mg/kg) を6週間持続経皮投与することにより抑制された。メマンチンによる神経傷害改善作用は海馬における組織学的解析によっても確認された。メマンチンはまた、A β およびイボテン酸の投与によって惹起した学習・記憶障害を改善した。一方、MK-801 は神経傷害改善作用を示したものの、学習・記憶障害改善作用は示さなかった。これは、MK-801 はメマンチンとは異なり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によると考えられる。以上の結果から、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が示された。また、A β と興奮性アミノ酸を組み合わせて誘発する神経傷害モデルにおいて、既に臨床で用いられているメマンチンの学習障害改善効果が確認されたことから、本モデルの AD 治療薬評価モデルとしての有用性が示された。

A β および興奮性アミノ酸誘発神経細胞傷害モデルに対する bFGF の効果

A β および興奮性アミノ酸によって誘発される神経細胞傷害および学習障害に対する bFGF の効果を検討した。*In vitro* において A β (1.0 μ M) 添加の48時間後にグルタミン酸 (30 μ M) を添加する神経細胞傷害評価系において bFGF は、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。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神経傷害モデルにおいて、イボテン酸注入の24時間前に bFGF (25 ng/1 μ l) を海馬内に注入した結果、PTBBS の上昇は有意に抑制され、モリス式水迷路試験における学習・記憶障害に対し改善傾向を示した。以上の結果、bFGF が AD 患者に対し有益な効果を示す可能性が示唆された。

【結語】

本研究では、 $A\beta$ 単独または $A\beta$ と興奮性アミノ酸によって誘発される神経傷害モデルを用い、ニコチン、メマンチン、および bFGF の効果を検討した。本研究で得られた知見は、 $A\beta$ 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可能性を示唆するものである。

論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病 (AD) は、認知機能が徐々に低下し失われていく神経変性疾患で、組織学的変化として神経原線維変化や老人斑と呼ばれるアミロイド β 蛋白 ($A\beta$) の異常蓄積を特徴としている。現在、AD における病態メカニズムの解明が徐々に進展し、これらのメカニズム解明に伴って各種 AD 治療薬が開発され、一部の薬物は臨床応用されている。これらの薬剤の開発には、遺伝子改変モデル、老化モデル、神経傷害モデル等、多種多様な AD の動物モデルが使用される。

そこで本研究では、既存の神経傷害モデルである $A\beta$ を脳室内に注入することにより惹起されるラット神経傷害モデルを用い、nAChR アゴニストであるニコチンの効果を検討した。 $A\beta$ (20 $\mu\text{g}/\text{body}$) を脳室内に3日間持続注入したラットに対し、ニコチン (0.2 mg/kg) を $A\beta$ 注入開始の3週間後から1日1回9週間、腹腔内投与した結果、 $A\beta$ 注入により惹起されるモリス式水迷路における学習・記憶障害が有意に改善した。 $A\beta$ の注入により、前部大脳皮質、後部大脳皮質および海馬において、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 (hemicholinium-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。以上、ニコチンは $A\beta$ 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。

次に $A\beta$ 単独で注入した場合に比べ、より顕著な神経細胞傷害が認められる $A\beta$ およびイボテン酸により誘起する神経傷害モデルを用い、NMDA 遮断薬であるメマンチンの効果を検討した。ラットの海馬に $A\beta$ およびイボテン酸を同様に注入することにより惹起される神経傷害は、イボテン酸注入の24時間前からメマンチン (10, 20 mg/kg) を6週間持続経皮投与することにより抑制された。メマンチンはまた、 $A\beta$ およびイボテン酸の投与によって惹起した学習・記憶障害を改善した。以上の結果から、 $A\beta$ と興奮性アミノ酸を組み合わせる神経傷害モデルにおいて、既に臨床で用いられているメマンチンの学習障害改善効果が確認されたことから、本モデルの AD 治療薬評価モデルとしての有用性が示された。

さらに、 $A\beta$ および興奮性アミノ酸によって誘発される神経細胞傷害および学習障害に対する塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) の効果を検討した。*In vitro* において $A\beta$ (1.0 μM) 添加の48時間後にグルタミン酸 (30 μM) を添加する神経細胞傷害評価系において bFGF は、グルタミン酸処置の24時間前に添加することにより、濃度依存的な抑制効果を示した。 $A\beta$ 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神経傷害モデルにおいて、イボテン酸注入の24時間前に bFGF (25 ng/1 μl) を海馬内に注入した結果、モリス式水迷路試験における学習・記憶障害に対し改善傾向を示した。以上の結果、bFGF が AD 患者に対し有益な効果を示す可能性が示唆された。

以上、本研究で得られた知見は、 $A\beta$ と興奮性アミノ酸の併用によって惹起される神経傷害モデルが、AD 治療薬の効果を評価するのに有用な方法であることが認められた。また、メマンチン、ニコチン及び bFGF が AD 治療薬として有効である可能性が示唆された。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。