

# アルツハイマー病を改善する新しい薬物とその分子機序

富山大学 和漢医薬学総合研究所 神経機能学分野  
東田 千尋

## 1. 緒言

アルツハイマー病 (AD) 治療戦略として、“Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )を減少させる”、“神経細胞を保護する”、“アセチルコリンの働きを高める”といったアプローチが依然主流であるが、それらが認知機能を改善させるには至らないことが多くの臨床結果により示されている。このように病因除去、対症療法ではAD中核症状の治癒には極めて不十分であることが示唆されながらも、新しい治療戦略は展開されていない。申請者はこういった現状を打破するために、神経回路網の破綻を回復させる薬物を見出す研究を行ってきており、特に、山薬の主成分として有名なステロイドサポゲニン化合物であるDiosgeninに着目した。

Diosgeninは、AD病態モデル5XFADマウスの記憶障害を顕著に改善し、脳内のamyloid plaqueや過剰リン酸化tauを減少させるだけでなく、amyloid plaque近傍に限局して見られる軸索変性を有意に改善させた。この現象の詳細をライブイメージングで検討するべく、初代培養神経細胞での、① $A\beta$ 処置1時間以内に生じるcollapse (軸索終末部分の退縮・変形)、② $A\beta$ 処置3-4日後に顕著な軸索のatrophy (軸索長全体の短縮、蛇行)、の観察を評価系として確立させた。 $A\beta$ による軸索変性の機序として考えられる分子の関与を知るため、calpain阻害剤、calcineurin阻害剤、tauリン酸化阻害剤、endocytosis阻害剤をそれぞれ $A\beta$ と同時に処置すると、collapseやatrophyを抑制することが示された。よって、 $A\beta$ により惹起される軸索変性には、少なくともcalpain、calcineurin、GSK-3 $\beta$ 、endocytosisが関与するものと考えた。ところが、これら阻害剤を $A\beta$ 処置の後から加えると全く無効であった。つまり、変性惹起に関わる分子を阻害しても変性後からの軸索修復には至らないという、当然のようでありながら、これまでは曖昧だった事実を申請者はまず見出した。これに対してDiosgeninは、 $A\beta$ と同時に処置はもとより、 $A\beta$ による変性惹起後から処置しても軸索変性を回復させた。この結果から、Diosgeninの作用機序を明らかにすることは、変性軸索の修復シグナルを解明することに繋がるものと考えた。そこで本研究の目的は、神経細胞におけるDiosgeninの直接の結合分子とその下流のパスウェイを同定し、そのパスウェイと軸索修復過程、記憶障害改善過程との関与を証明することとした。

## 2. 方法

DARTS法 (Proc Natl Acad Sci USA 106,21984-21989 (2009)) を用いて、申請者は既にDiosgeninの結合分子の候補として、1,25D<sub>3</sub>-membrane-associated, rapid response steroid-binding protein (1,25D<sub>3</sub>-MARRS)を得ている。そこで下記の実験を実施した。

- 1) 大脳皮質神経細胞の初代培養： SDラット (胎生17日齢) から大脳皮質を摘出し、分散培養した。軸索を萎縮させるamyloid  $\beta$ 処置は、37°Cで4日間インキュベートした $A\beta$ (1-42)を5  $\mu$ Mとなるよう細胞に処置した。

- 2) 1,25D<sub>3</sub>-MARRSノックダウンまたは中和処置： 大脳皮質神経細胞 5.25 x 10<sup>6</sup> cellsに対して、1,25D<sub>3</sub>-MARRSのsiRNA 400 nMをnucleofection試薬を用いてエレクトロポレーションした。1,25D<sub>3</sub>-MARRSタンパク質発現量が有意に減少するトランスフェクション2日後に、薬物処置を開始した。また、1,25D<sub>3</sub>-MARRS中和処置の場合は、1,25D<sub>3</sub>-MARRSに対する特異的中和抗体を500倍に希釈して神経細胞に処置しその10分後に薬物処置を施した。いずれも薬物処置4日後に軸索長を定量した。
- 3) 軸索伸展の定量： 薬物処置後、4% paraformaldehyde処置で固定した神経細胞を、軸索マーカーのリン酸化型NF-H (pNF-H)抗体と、神経マーカーのMAP2抗体、核染色のDAPIでの3重染色を行った。染色画像あたりのpNF-H陽性の軸索長を解析ソフトNeurocyteで計測し、染色画像あたりの神経細胞数で除することで、細胞あたりの平均軸索長を算出した。
- 4) 正常マウスへの1,25D<sub>3</sub>-MARRS中和抗体の脳内投与： ddYマウスの右側脳室内に、人工脳脊髄液に溶解した1,25D<sub>3</sub>-MARRSに対する特異的中和抗体を、全脳脊髄液量の500分の1量になる量でAlzet浸透圧ポンプにより持続的注入を行った。
- 5) 物体認知記憶試験： 正常マウスの物体認知記憶試験は、オープンフィールド内にマウスを馴化させた後、同フィールド内に置いた新規の物体2個（物体A）に対する探索行動を計測したのち(トレーニングセッション)、48時間のインターバルを置く。片方の物体のみさらに新しいものに置き換え(物体B)、2つの物体に対する探索行動を計測する(テストセッション)。Preferential Index値は、全探索行動に対する、物体Bへの探索回数の割合をパーセントで表した。

### 3. 結果

大脳皮質神経細胞をDiosgenin処置すると、その4日後には有意に軸索が伸長したが、あらかじめ1,25D<sub>3</sub>-MARRS siRNA処置した場合は、Diosgenin処置による軸索伸長が完全に見られなくなった。また、大脳皮質神経細胞をAβ(1-42)処置し軸索を萎縮させた後からDiosgeninを処置すると、軸索密度が増加するが、Diosgenin処置10分前に1,25D<sub>3</sub>-MARRS中和抗体を処置しておくこと、この作用が完全に抑制された。これらの結果は、Diosgeninは1,25D<sub>3</sub>-MARRSの刺激を介して軸索を伸長させることを示す。

次に、大脳皮質神経細胞をDiosgenin処置時に各種リン酸化酵素阻害剤を加え、Diosgeninによる軸索伸長への影響を検討した。PI3 kinase、MEK1、protein kinase C、protein kinase Aいずれの阻害剤によっても軸索伸長が抑制された。この結果は、少なくともこれら4種のリン酸化酵素がDiosgeninのシグナリングに関わっていることを示唆する。

Diosgeninのシグナリングが1,25D<sub>3</sub>-MARRSを介するものであることをさらにin vivoで証明するために、正常マウスに対して1,25D<sub>3</sub>-MARRS中和抗体を持続的に脳室内に注入しながら、Diosgeninの腹腔内投与を6日間行った。人工脳脊髄液のみ脳室内注入したマウスでは、Diosgenin投与による物体認知記憶の亢進が認められた。一方、1,25D<sub>3</sub>-MARRS中和抗体を脳室内注入したマウスでは、Diosgeninを投与しても記憶能力は変化しなかった。これらマウスの脳切片を作製し、脳内の軸索密度を免疫染色により検討したところ、物体認知記憶の形成に重要な部位であるmedial prefrontal cortex、perirhinal cortexにおいて軸索密度がDiosgeninの投与で増加し、1,25D<sub>3</sub>-MARRS中和抗体注入群では、Diosgenin処置しても軸索密度が増加していないことが示された。

#### 4. 考察

現在、AD治療薬の開発の分野では、コリンエステラーゼ阻害剤に替わり得る新しい治療薬の開発が進められている。その中で最も主流の考え方は、ADの病因であるA $\beta$ の蓄積を抑制・排除するアプローチである。しかし、抗A $\beta$ 抗体 (Neurology 73,2061-2070 (2009))、 $\gamma$ -secretase阻害剤 (Expert Opin Pharmacother 10,1657-1664 (2009)) 等は、A $\beta$ 生成を減少させるにもかかわらず、認知機能を悪化させてしまい、A $\beta$ を減少させても、それだけでは記憶障害改善には至らないことを示唆している。一方、申請者が見出したDiosgeninの抗AD作用は、脳内の軸索変性を改善させる作用によりものと考えられ、破綻した神経回路網を再活性化しうる薬物である。

Diosgeninには種々の活性が報告されており、特に抗がん作用 (Exp Oncol 31,27-32 (2009))、抗食物アレルギー作用 (Planta Med 75,1300-1305 (2009))、加齢による認知機能低下の改善作用 (Am J Chin Med 39,551-563 (2011))、糖尿病性神経障害改善作用 (Biol Pharm Bull 34,1493-1498 (2011)) は、in vivoでも有効性が示されている。Diosgeninの作用機序としては、これまでに、メラノーマにおけるPI3K活性の促進 (Life Sci 81,249-254 (2007))、血管平滑筋細胞におけるAkt、ERK、JNK、p38の抑制 (Vascul Pharmacol 53,273-280 (2010))、肝ガン細胞におけるSTAT3活性化の抑制 (Cancer Lett 292,197-207 (2010)) 等が報告されてきた。しかし、Diosgeninの神経細胞におけるメカニズムは知られておらず、そもそもDiosgeninの直接の結合分子が示唆された例は全くなかった。

本研究において、1,25D<sub>3</sub>-MARRS がDiosgeninの直接の結合分子であることがin vitro、in vivoいずれの結果からも示された。1,25D<sub>3</sub>-MARRSは、活性化型vitamin D<sub>3</sub>の1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (DHVD<sub>3</sub>)のrapid responseを惹起する、細胞膜型受容体として同定されたものである (J Cell Biochem 90,901-913 (2003))。1,25D<sub>3</sub>-MARRSが小腸、骨形成でのカルシウムやリン取り込みに関わっていることは示されてきたが、神経系での役割は全くわかっていなかった。また1,25D<sub>3</sub>-MARRSがDHVD<sub>3</sub>によって刺激された場合、小腸では、PKC (J Cell Biochem 90,901-913 (2003))、PKA (Biochimie 94,146-154 (2012))、ERK (Biochimie 94,146-154 (2012))、PI3K (J Cell Biochem [Epub ahead of print] (2011))、STAT3 (J Interferon Cytokine Res 22,555-563 (2002))といった複数のシグナルが動員されることが示唆されており、本研究でもDiosgeninが1,25D<sub>3</sub>-MARRSを刺激しmulti responseを引き起こすこと、おそらくそのことが軸索伸長や記憶亢進に繋がっていることが示唆された。つまり、Diosgeninが1,25D<sub>3</sub>-MARRSの外因性stimulatorとして作用し、軸索修復と記憶改善に至ることが明らかになった。Diosgeninの研究により、ADの制御分子としての1,25D<sub>3</sub>-MARRSという新たなターゲット分子が提示された。

#### 5. 発表論文

- 1) Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D<sub>3</sub>-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci. Rep.*, 2, 535; DOI:10.1038/srep00535 (2012)
- 2) Tohda C, Lee Y-A, Goto Y, Nemere I. Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D<sub>3</sub>-MARRS. *Sci. Rep.*, in press (2013)