

平成 23 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590083  
 研究課題名（和文）閉経後認知障害とアルツハイマー病との関連解析による認知症発症機序の解明  
 研究課題名（英文）Molecular Analysis of cognitive impairment associated with postmenopausal memory loss and Alzheimer's disease  
 研究代表者  
 田熊 一浩 (TAKUMA KAZUHIRO)  
 大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
 研究者番号：90289025

研究成果の概要（和文）：閉経を境に女性では認知障害の発症増加が認められるが、その発症機序の詳細は未だ不明である。本研究では、卵巣摘出マウスに慢性拘束ストレスを加重すると記憶障害を発現することを認め、本現象が海馬 CA3 領域におけるコリン作動性神経の脱落に起因する可能性を示した。さらに、アルツハイマー病(AD)治療薬として臨床応用されているドネペジルおよびガランタミンが卵巣摘出/慢性拘束ストレス負荷マウスの記憶障害を改善することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：Estrogen decline after menopause may influence cognitive performance and increase risk for Alzheimer's disease (AD) in women. We have previously found that combination of chronic stress and ovariectomy (OVX) causes memory impairment in mice. In this study, we found that cholinergic neuronal loss in the hippocampal CA3 region is involved in OVX/stress-induced memory impairment in mice, and donepezil and galantamine, which are clinically used for AD therapy, improved the memory impairment.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：神経病態薬理学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アルツハイマー病, 更年期障害, エストロゲン, 海馬, ミトコンドリア, コリン作動性神経系, 神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

閉経を迎えた女性では認知症の発症増加が認められ、いくつかの大規模疫学調査において、女性の孤発性アルツハイマー病(AD)発症率は男性より 2~3 倍高いことが示されている(Andersen et al., *Neurology*, 53, 1992-1997, 1999; Gao et al., *Arch Gen Psychiatry*, 55, 809-815, 1998). また、エストロゲンをはじめとする女性ホルモンの防御作用が示唆されているが、臨床における閉経後の認知障害を反映する動物モデルの報告は国内外ともに極めて少なく、発症機序の詳細は未だ解明されていない。

一方、研究代表者らは、認知症が骨粗鬆症や動脈硬化とは異なり、閉経女性全員に認められる症候でないことに着目し、身体的要因に加えて環境因子が認知症の発症に重要であると仮定した。この仮定に基づき、卵巣摘出後に慢性拘束ストレスを負荷するモデル動物(ラットおよびマウス)を作成し、行動薬理的ならびに神経科学的解析を行った結果、本モデルラットにおいて認知障害を認め、脳海馬 CA3 領域における神経細胞数の特異的減少が症状発現に密接に関わることを見いだした(Takuma et al., *Neuroscience*, 146, 60-68, 2007). また、本障害が、エストロゲン補充あるいは選択的エストロゲン受容体モジュレーター投与により改善されること、および欧州で AD 治療に用いられているイチョウ葉エキス EGb 761 投与により抑制されること(Takuma K et al., *Neuroscience*, 149, 236-262, 2007)を明らかとした。これらの知見より、本モデル動物が閉経後認知症の分子基盤の解明ならびに新規治療薬の開発において非常に優れた評価系であることを示すとともに、孤発性 AD の発症機序の解明においても非常に有益なモデルであることを示唆していた。

さらに、研究代表者らは、上述のテーマに加えて、AD の重要な原因分子の一つと考えられているアミロイドβペプチド(Aβ)による神経毒性発現機序について、その標的分子を対象とする解析を行ってきた。その結果、ミトコンドリア内での Aβと Aβ結合アルコール脱水素酵素(ABAD)の相互作用がミトコンドリア機能破綻を引き起こし、神経細胞死ならびに空間認知障害を誘導することを明らかにした(Lustbader et al., *Science*, 304, 448-452, 2004; Takuma et al., *FASEB J.*, 19, 597-598, 2005). また、AD 発症への関与が示されている免疫グロブリン・スーパーファミリータンパク質、糖化最終産物受容体(RAGE)(Yan et al., *Nature*, 382, 685-691, 1996)が、Aβによるミトコンドリア障害の発現に関与することを見いだしていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、上述の知見を背景として、研究代表者のグループで独自に開発した閉経後疾患モデル動物ならびに AD モデル遺伝子改変動物を用いて、閉経後認知障害と AD との関連性を追究し、認知症発症に関わる分子基盤を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 閉経後疾患障害モデル動物の作製

閉経後疾患モデル動物は、卵巣摘出術(OVX)を施したマウス(ICR 系)に 21 日間の慢性拘束ストレス(1 日 6 時間)を負荷することにより作製した。卵巣摘出の効果は、(i) 血清中および脳組織中の 17β-エストラジオール量の減少、(ii) 体重(脂質代謝)の増加、(iii) 大腿骨の骨密度(BMD)減少を指標に評価した。

### (2) 認知機能の行動学的評価

新奇物質探索試験では、保持試行における探索嗜好性を認知記憶の指標として評価した。具体的には、動物を実験装置に 3 日間(10 分間/日)馴化させた後、装置内に異なる 2 つの物質を置き、装置内を 10 分間自由に探索させた(訓練試行)。その 24 時間後に、装置内に置いた 2 つの物質のうち、いずれか 1 つを新奇物質と置き換え、装置内を 5 分間自由に探索させた(保持試行)。訓練試行および保持試行において、両物質に対するそれぞれの探索時間を測定した。訓練試行では交換予定の物体に対する探索時間と総探索時間の比を、保持試行では新奇物質に対する探索時間と総探索時間の比を探索嗜好性(%)として算出した。

恐怖条件付け文脈学習試験では、音刺激と電気刺激を組み合わせた恐怖条件付けを行い、その後の音刺激依存性試験および状況依存性試験で観察された自発運動量の抑制反応(すくみ行動)を学習記憶の指標として評価した。具体的には、マウスを透明なプラスチック製ケージ(25×31×18 cm)に入れ、音刺激の無い状態でのすくみ行動を 1 分間測定した。次に、床にステンレス製グリッド(直径 2 mm, 8 mm 間隔)を設置した透明の亚克力製ケージ(31×31×40 cm)にマウスを移し、音および電気刺激を与えない状況下でのすくみ行動を 2 分間測定し、引き続き恐怖条件付けを行った。恐怖条件付けは、20 秒間の音刺激(80 dB)を与え、さらに、その最後の 5 秒間に電気刺激(0.8 mA)を加えた。この組み合わせ刺激を 1 セットとし、15 秒間のインターバルで 6 回繰り返し、各インターバル間のすくみ行動を測定した。

音刺激依存性試験および状況依存性試験は、恐怖条件付けの1または24時間後に行った。前者では、条件付け前に用いたプラスチック製ケージにマウスを入れ、連続した音刺激を与えたときのすくみ行動を1分間測定した。また、後者では、恐怖条件付けを行ったグリッド付アクリル製ケージへマウスを入れ、音および電気刺激を与えない状況下でのすくみ行動を2分間測定した。結果はそれぞれ、全測定時間に対するすくみ行動時間の百分率(%)として算出した。

### (3) 脳海馬領域における神経ネットワーク変化の解析

主要卵巣由来女性ホルモンであるエストラジオールの受容体(ER)およびストレスとの関連が知られるセロトニン、糖質コルチコイド(コルチコステロン)、コルチコトロピン遊離因子の受容体の脳内分布ならびに認知記憶の低下を考慮し、脳海馬領域における神経ネットワーク変化を解析した。

行動解析後、脳凍結切片(12  $\mu$ m)を作製し、Nissl 染色法による海馬錐体細胞数の計測を行った。アセチルコリン(ACh)神経系に関する解析は、脳凍結切片(12  $\mu$ m)において、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析に加えて、海馬 CA1, CA3 および歯状回(DG)の分画標品での、ChAT 発現変化をイムノブロット法にて、ChE の活性を吸光度測定法にて、それぞれ測定した。さらに海馬 CA3 領域の細胞外 ACh 量を *in vivo* microdialysis 法にて定量した。

### (4) 認知機能障害に対する薬理的検討

ドネペジル(0.3, 1 mg/kg)ならびにガラントミン(1, 3 mg/kg)は試験開始30分前に経口投与した。行動解析後、脳凍結切片(12  $\mu$ m)を作製し、プラセンタ(胎盤)エキスは蒸留水に溶解し、120 mg/kg, 2160 mg/kg を OVX 手術後より行動解析前日まで1日1回経口投与した。

### (5) A $\beta$ 産生変化ならびに AD 関連分子の発現変化の解析

本モデルマウスで認められた体重(脂質代謝)増加との関連より、血中および脳組織中の A $\beta_{1-40}$  量を ELISA 法により測定した。また、脳組織での A $\beta$ 産生酵素( $\beta$ -および $\gamma$ -セクレターゼ)の活性変化は、消光性蛍光基質を用いて測定した。

脳組織での ABAD および RAGE の発現変化については、免疫染色法あるいは Western Blot 法により解析した。また、異常リン酸化タウの蓄積については Western Blot 法により解析した。

### (6) 培養細胞を用いた閉経後認知症および AD 発症に関する分子解析

細胞の調製は、他細胞の混入の少ない最も一般的な方法に従った。すなわち、神経細胞は胎生 15~16 日齢の胎児脳より、アストログリア細胞は生後 1~2 日の新生児脳より調製した。A $\beta$ による神経毒性発現機序については、RAGE の機能的役割の解明を第一の目的として免疫細胞化学的手法により追究した。病態発現に関連する遺伝子発現変化については、高血糖条件下での A $\beta$ 産生調節酵素( $\alpha$ -、 $\beta$ -および $\gamma$ -セクレターゼ)、ネプリライシン、インスリン分解酵素(IDE)、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ )、ABAD、RAGE および腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )の mRNA 量変化を quantitative RT-PCR 法により解析した。

### (7) 統計解析

統計解析は、Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA)を用いて、有意水準  $P < 0.05$  のものを群間に差があるものとして評価した。

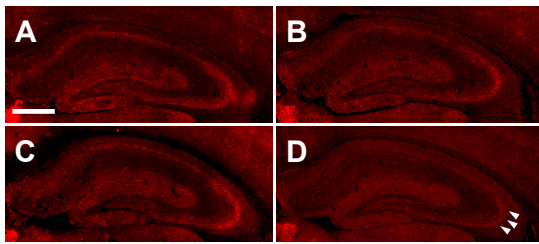
## 4. 研究成果

### (1) 閉経後疾患モデルマウスにおける認知機能障害(恐怖条件付け学習障害)

OVX 後 5 週間経過したマウスは、閉経後女性の臨床所見として多数報告されている BMD の低下、子宮の萎縮および脂質代謝異常を反映する体重増加を示したが、恐怖条件付け文脈学習試験における記憶障害は認められなかった。一方、OVX 2 週間後より 3 週間の拘束ストレス負荷を施したマウス(OVX/拘束ストレスマウス)では、状況依存性および音刺激依存性記憶ともに障害が認められた。しかしながら、閉経後認知症モデルラットで認められた新奇物体探索試験における新奇物体への探索嗜好性の低下は認められなかった。

### (2) 閉経後疾患モデルマウスの認知機能障害(恐怖条件付け学習障害)に関わる分子機序

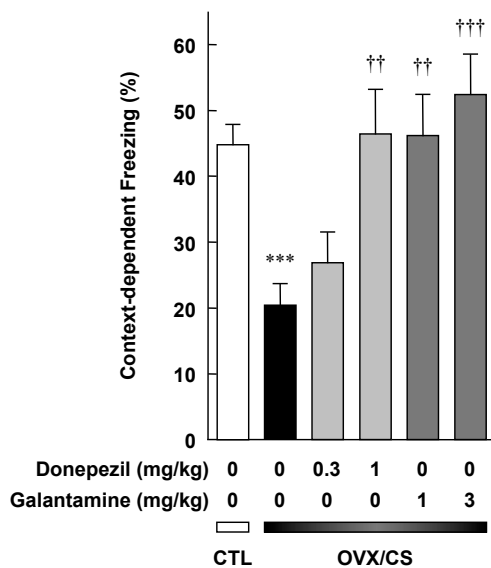
ラットモデルと同様に、OVX/拘束ストレスマウスの脳海馬 CA3 領域で錐体細胞数の減少が観察された。さらに、CA3 領域における ChAT 発現量の減少を認めた(**Fig. 1**)。本現象は記憶障害を改善するエストロゲンの慢性投与により軽減されることを認めた。一方、海馬の ChE 活性ならびに海馬 CA3 領域の ACh 遊離量に変化は認められなかった。



**Fig. 1.** Effects of OVX and chronic stress (CS) on immunoreactivity against anti-choline acetyltransferase in the hippocampus of female mice. Typical immunofluorescent images stained by anti-ChAT/Alexa Fluor® 594 anti-IgG (Red) of brain sections including whole hippocampal CA regions from sham/no stress (A), sham/CS (B), OVX/no stress (C) and OVX/CS mice (D). Scale bar, 500  $\mu$ m.

**(3) 閉経後疾患モデルマウスの認知機能障害(恐怖条件付け学習障害)に対する改善効果**

AD 治療薬として臨床応用されているドネペジルおよびガラントミンは、OVX/拘束ストレスマウスで認められた状況依存性および音刺激依存性記憶障害のいずれに対しても用量依存的に改善作用を示した(Fig. 2)。また、ドネペジルによる記憶障害改善作用は $\alpha 7$  ニコチン受容体拮抗薬メチリーカコニチン(1 mg/kg, s.c.)および $\alpha 4\beta 2$  ニコチン受容体拮抗薬ジヒドロ- $\beta$ -エリスロイジン(2 mg/kg, s.c.)により抑制された。



**Fig. 2.** Effects of ChE inhibitors, donepezil and galantamine, on freezing behavior of OVX/CS mice in context-dependent test performed 24 h after conditioning. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n = 7–29). \*\*\* $P$  < 0.01, versus control (CTL); †† $P$  < 0.01, ††† $P$  < 0.001, versus vehicle-treated OVX/CS.

さらに、プラセンタの慢性投与によって、OVX/拘束ストレスマウスの状況依存性ならびに音刺激依存性の記憶障害が軽減すること、海馬 CA3 領域での神経細胞数減少が改善されることを見いだした。

項目(1)~(3)での成績を合わせると、閉経後疾患モデルマウスで認められる記憶障害が海馬 CA3 領域におけるコリン作動性神経の機能障害に起因する可能性を示しており、本モデルマウスの認知障害がADの記憶障害と密接に関連することが示唆された(投稿準備中)。

**(4) 閉経後疾患モデルマウスにおける A $\beta$ 産生変化ならびに AD 関連分子の発現変化の解析**

OVX/拘束ストレス負荷マウスにおいてタウ蛋白の異常リン酸化およびタウ蛋白総量に変化は認められなかった。海馬 CA3, CA1 領域特異的に $\beta$ -セクレターゼ活性の増加が認められた。しかしながら $\gamma$ -セクレターゼ活性および A $\beta_{1-40}$  量においては変化が認められなかった。

また、OVX マウスは、海馬組織での A $\beta_{1-40}$  量については偽手術群と間に差違が認められず、血清中の A $\beta_{1-40}$  量が有意に上昇していることを認めた。さらに、OVX マウスの海馬 CA3, CA1 および DG において ABAD 発現が増加していた。一方、RAGE の発現変化は認められなかった。

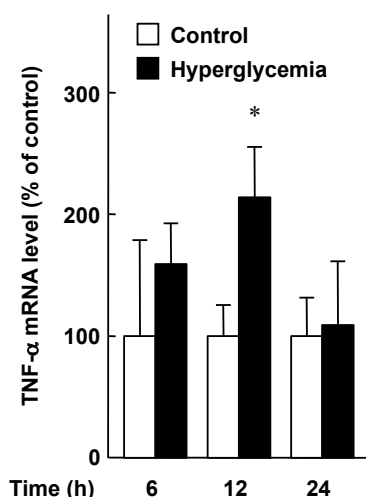
**(5) 培養細胞を用いた閉経後認知症および AD 発症に関する分子解析**

A $\beta$ による神経毒性発現機序に関して、培養神経細胞の細胞外に添加した A $\beta$ が RAGE への結合を介して p38 MAPK の活性化を惹起し、それに引き続きエンドサイトーシ様の応答によりミトコンドリアへ移送されることを明らかとした。また、この際に RAGE が A $\beta$ とともに細胞内へ移行すること、すなわち、RAGE が細胞膜 A $\beta$ 輸送体として機能する可能性を見出した。

通常の培養条件下と高血糖処置を施した神経細胞の間において、A $\beta$ 産生抑制に働く $\alpha$ -セクレターゼならびに A $\beta$ 産生増加に働く $\beta$ -および $\gamma$ -セクレターゼの mRNA 発現量の差違は認められなかった。また、A $\beta$ 分解酵素であるネプリライシン、インスリン分解酵素の mRNA 発現量についても、対照群と高血糖処置群の間に差違は認められなかった。さらに、A $\beta$ 神経毒性に対する保護作用が示されている IGF-1, ならびに A $\beta$ 神経毒性発現への関与が認められている GSK-3 $\beta$ , ABAD および RAGE についても、対照群と高血糖処置群の間で mRNA 発現量の差違は認められなかった。本研究において高血糖処置による mRNA

発現変化を解析した分子の中では、最近 AD の神経変性への関与が示唆されているサイトカインの一つ TNF- $\alpha$ が変化を示した唯一の分子であり、高血糖培地曝露 12 時間後に一過的な mRNA 発現量の増加が認められた (Fig. 3)。培養アストロサイトにおいても、同様の高血糖培地曝露による TNF- $\alpha$  mRNA 発現量増加を認めた。

実験の条件設定に予定以上に時間を要したため、残念ながら、本項目での検討において、エストロゲンの役割を追究するには至らなかった。



**Fig. 3.** Effects of hyperglycemia on mRNA expression of TNF- $\alpha$  in cultured mouse neurons. Cells were treated with normal and high glucose (containing additional 20 mM glucose) B27 supplemented-NeuroBasal™ medium for the indicated time, and then mRNA level of TNF- $\alpha$  was determined by quantitative real-time PCR. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM (n=3–5). \* $P$  < 0.05, different from control.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 7 件)

- (1) Hiroyuki Mizoguchi, Daisuke Ibi, Fumiaki Takase, Taku Nagai, Hiroyuki Kamei, Erika Toth, Jun Sato, Kazuhiro Takuma, Kiyofumi Yamada, Nicotine ameliorates impairment of working memory in methamphetamine-treated rats, *Behav. Brain Res.*, **220** (1), 159–163 (2011).
- (2) Hiroyuki Mizoguchi, Daisuke Ibi, Kazuhiro Takuma, Erika Toth, Jun Sato, Shigeyoshi Itohara, Toshitaka

Nabeshima, Kiyofumi Yamada, Alterations of emotional and cognitive behaviors in matrix metalloproteinase-2 and -9-deficient mice, *Open Behav. Sci. J.*, **4**, 19–25 (2010).

- (3) 田熊一敏, A $\beta$ トランスポーター, *脳* **21**, **13**, 59–62 (2010).
  - (4) Kazuhiro Takuma, Fang Fang, Wensheng Zhang, Shiqiang Yan, Emiko Fukuzaki, Heng Du, Alexander Sosunov, Guy McKhann, Yoko Funatsu, Noritaka Nakamichi, Taku Nagai, Hiroyuki Mizoguchi, Daisuke Ibi, Osamu Hori, Satoshi Ogawa, David M. Stern, Kiyofumi Yamada, Shirley ShiDu Yan, RAGE-mediated signaling contributes to intraneuronal transport of amyloid- $\beta$  and neuronal dysfunction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (47), 20021–20026 (2009).
  - (5) 田熊一敏, 片岡駿介, 吾郷由希夫, 松田敏夫, ミトコンドリア障害と神経系のアポトーシス～アルツハイマー病解明へのアプローチ～, *日本薬理学雑誌*, **134** (4), 180–183 (2009).
  - (6) Hiroyuki Mizoguchi, Kazuhiro Takuma, Emiko Fukuzaki, Daisuke Ibi, Eiichi Someya, Ko-hei Akazawa, Tursun Alkam, Hiroko Tsunekawa, Akihiro Mouri, Yukihiro Noda, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada, Matrix metalloproteinase-9 inhibition improves amyloid  $\beta$ -mediated cognitive impairment and neurotoxicity in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331** (1), 14–22 (2009).
  - (7) Emiko Fukuzaki, Kazuhiro Takuma, Yoko Funatsu, Yukiko Himeno, Yuko Kitahara, Hiroyuki Mizoguchi, Daisuke Ibi, Koji Koike, Masaki Inoue, Shi Du Yan, Kiyofumi Yamada (2008) Ovariectomy increases serum amyloid  $\beta$  peptide and hippocampal ABAD levels in mice, *Neurochem. Int.*, **52** (7), 1358–1364 (2008).
- 〔学会発表〕 (計 4 件)
- (1) 田熊一敏, 松田敏夫, 山田清文, 糖化最終産物受容体を介するアミロイド神経毒性発現とその薬物標的としての可能性, 第 84 回 日本薬理学会年会シンポジ

ウム, 2011.2.15, 大会中止のため誌上開催.

- (2) Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Mitochondria-mediated neurotoxicity in Alzheimer's disease. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム, 2010.6.17, 沖縄コンベンションセンター.
- (3) 田熊一徹, 片岡駿介, 吾郷由希夫, 松田敏夫, ミトコンドリア障害と神経系のアポトーシス ~アルツハイマー病解明へのアプローチ~, 第82回日本薬理学会年会シンポジウム, 2009.3.16, パシフィコ横浜.
- (4) Kazuhiro Takuma, Emiko Fukuzaki, Yoko Funatsu, David M. Stern, Kiyofumi Yamada, Shi Du Yan, Role of receptor for advanced glycation endproducts in neuronal amyloid  $\beta$ -peptide membrane transport, Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease (ICAD2008), 2008.7.30, McCormick Place, Chicago, IL, USA.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

田熊 一浩 (TAKUMA KAZUHIRO)  
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：90289025