

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659259

研究課題名(和文) 神経ステロイドによるアルツハイマー病の新規治療法の開発

研究課題名(英文) A study on a novel therapeutic strategy for Alzheimer's disease Using neurosteroids.

研究代表者

曾我部 正博 (Sokabe, Masahiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：10093428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、アルツハイマー病(AD)モデルマウスを用いて、神経ステロイドであるPREGSやDHEAが、学習記憶に必要な海馬歯状回の新生顆粒細胞の生存率や機能を改善するか否かを検証することである。両薬剤をそれぞれ(20mg/kg/日)の用量で約一ヶ月間皮下投与し、投与開始から20日後から20日間にわたって、歯状回の新生顆粒細胞の組織学的調査を行った。その結果両剤共に新生顆粒細胞の形態学的発達を大幅に改善したが、PREGSのみが新生細胞の既存神経回路へのシナプス形成を促進して、最終生存率を高めた。PREGS投与群は学習や長期増強も大幅に改善したので新規治療薬として有望であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to test whether the neurosteroids PREGS and DEHA improve the survival rate and function of newborn hippocampal granule cells in the dentate gyrus (DG), which are crucial for learning and memory, by using Alzheimer's disease (AD) model mice. Each mouse was given a daily subcutaneous injection of PREGS or DHEA at a dose of 20 mg/kg for a month, and morphological development of newborn granule cells in the DG was examined for 20 days from the day 20 after the first injection. Both agents largely improved the morphological development of newborn cells, but only PREGS facilitated the synaptogenesis of newborn cells to preexisting neural circuits and contributed to the final survival rate of newborn granule cells. It is strongly suggested that PREGS can be a promising therapeutic drug for AD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：アルツハイマー病 アミロイド 神経ステロイド PREGS 治療法開発

1. 研究開始当初の背景

ADの原因に関しては、アミロイド仮説に先だって、脳内のコリン作動性神経の傷害が重要であるとする考え(コリン仮説)が提唱されてきた。その後のAD治療薬の開発は、この二つの仮説に主導されてきた。これまでに、A β 産生を担う酵素プレセニリンの阻害、A β 抗体などによるA β のトラップや凝集阻害が試みられてきたが、重篤な副作用などのために実用化されていない。現在我が国で認可されているのは、コリン仮説に基づいたアセチルコリンエステラーゼ阻害剤(アリセプト、ガランタミン)と、活動依存性NMDA受容体阻害剤(メマリー)のみであるが、十分な効果を示すとは言い難く、時には深刻な副作用を引き起こす。高齢化の進む現代、安全でより有効なAD治療薬の開発は、医学・薬学研究者にとって緊急かつ重要な課題の一つである。

2000年代初頭に上記の二つの仮説を融合した新仮説が登場した。A β の一次標的は7nAChRであり、様々なAD症状はその下流信号系の不全で生じるという考えである。我々は、7週齢ラットの側脳室に合成A β (1-40)を14日間連続投与して作成した急性ADモデルラットにおいて、学習記憶の細胞過程である海馬シナプスの長期増強(LTP)が誘導できないことを初めて明らかにし、それが海馬入力線維の終末に発現する7nAChRのA β による機能障害に起因することを示した¹⁾。

一方、これとは独立に、我々は神経ステロイドPREGSが海馬の入力線維終末に発現する7nAChRを感作して、LTP誘導や記憶学習を促進することを発見した^{2,3)}。そこでADモデル動物の作成途上でA β とPREGSを同時投与したところ、A β による障害が抑止されたことから、PREGSがADの予防薬になり得る可能性を提起した(図1)⁴⁾。しかし、この動物は長期間慢性化したAD患者のモデルとしては必ずしも適切とは言えない。そこで、生まれつきアミロイド前駆蛋白質(APP)とプレセニリンを高発現し、長期間にわたり天然のA β を蓄積した8ヶ月齢のトランスジェニックマウス(APP/PS1)を使用して、実験を再構築すべきと考えた。このモデルは、A β の作用履歴、老人斑/学習障害/歯状回ニューロンの顕著な脱落から見て、慢性ADのモデルとしてより適切といえる。

本研究は基礎研究ではあるが、安全な薬剤と簡便な方法に基づく全く新しいADの治療法の開発を目指す治験移行が至近の研究である。またその作用機序を解明して神経ステロイドの新機能を提示することは学術的にも多大な意義がある。

【引用文献】:

- 1) Chen L, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in β -amyloid infused rats. *Neuropharmacol.* 50(2):254-68 (2006).
- 2) Chen L, Sokabe M. Pregnenolone sulfate enhances presynaptic glutamate releases in rat hippocampal slices as studied by optical recordings. *J Neurophysiol.* 94(6):4131-4144 (2005).
- 3) Chen L, et al. PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB signaling. *J Neurophysiol.* 98: 1538-1548 (2007).
- 4) 曾我部、陳. シナプス可塑性に対するアミロイド β と神経ステロイドの効果. *PharmaVISION*, No.10: 6-11 (2007).

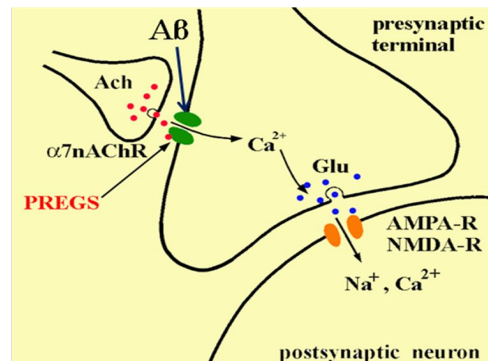


図1: 海馬の入力線維終末に発現する7nAChRがA β とPREGSの標的になっている様子。海馬歯状回の出力細胞である顆粒細胞(post)にはグルタミン酸作動性の貫通線維(pre)が終端している。その終末にはコリン作動性神経核(マイネルト基底核や中隔核)由来のシナプスが7nAChR上に終端し、グルタミン酸放出を調節している。A β は7nAChR機能を障害し、LTP誘導を障害する。PREGSはA β と拮抗して7nAChRを保護し、LTP誘導能を回復する。文献1)-4)に基づく。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、神経ステロイドを用いた新規なAD治療法の開発であるが、具体的には以下の二つの課題の解決を目的とした。

- (1)ADモデル動物であるAPP/PS1マウスを用いて神経ステロイド、DHEAやPREGSがAD症状を改善するか否かを、空間学習行動および脳スライスを用いた電気生理学(海馬シナプス長期増強)で検証する。
- (2)海馬の学習に必要な歯状回新生神経細胞の成熟・生存に対するDHEAやPREGSの

効果を調べ、AD モデルマウスにおける新生神経細胞の過剰な細胞死を改善するか否かを調べる。

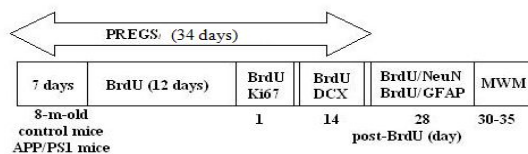
3. 研究の方法

(1) AD モデルマウスの学習およびシナプス可塑性に対する PREGS、DHEA の効果と神経細胞死の関連

実験動物は 8 ヶ月齢のトランスジェニックマウス (APP^{swe}/PS1^{dE9}、米国ジャクソン研究所) を用いる。この動物は予備実験で顕著な老人斑と空間学習不全を示すことを確認しており、慢性化した AD モデルとして適切である。PREGS は皮下注にて、これまで急性 AD モデルで有効であった 20mg/kg を中心に約 30 日間連続投与し (新生細胞の成熟過程に対する効果を見るために必要な日数)、投与終了 1 日後と 1 ヶ月後にモリス水迷路テストにより空間認知能力を調べる (A)。またテスト終了後に海馬スライス (400um 厚) を作成し、電気生理学的 (細胞外記録) にシナプスの長期増強 (LTP) を調べる (B)。

(2) 新生ニューロンの発達の組織学的調査

APP/PS1 マウスにおける新生ニューロンの成熟過程と PREGS の効果を追跡するために、常法に従って BrdU (50mg/kg) を 12 日間連続投与し、投与終了後 1 日目に細胞増殖マーカー (Ki67) で 2 重染色することにより、新生ニューロンの産生数、投与後 14 日目に微小管関連蛋白質マーカー (DCX) との 2 重染色により発達途上細胞の突起形成、投与後 28 日目にニューロン成熟核マーカー (NeuN) およびグリア成熟マーカー (GFAP) との 3 重染色で最終残存細胞の観察と解析を行う。



PREGS の投与は、前年度に決定した至適量を、BrdU 投与開始 7 日前から始めて BrdU 投与後 14 日目までの合計 34 日間行い、新生ニューロンの産生から成熟過程をほぼカバーする。その結果を基にして、PREGS が成熟過程のどの段階に最も効いているのかを明らかにして、そのメカニズムを推定する。また海馬歯状回の生存細胞数を計数して神経細胞死と学習成績の相関を検証する。

4. 研究成果

(1) DHEA、PREGS による AD モデルマウスの学習行動の改善効果: 図 2 にモリス水迷路学習訓練開始 5 日後の標的到達時間 (遅延時間) を示す。神経ステロイド DHEA、PREGS は野生型 (コントロール) の遅延時間には殆ど影響しなかった。これに対して、AD モデル

マウス (APP/PS1) では、著しい遅延時間の延長が見られ、それは PREGS によって顕著に短縮した。

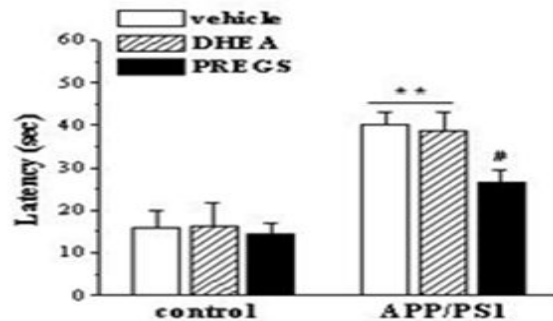
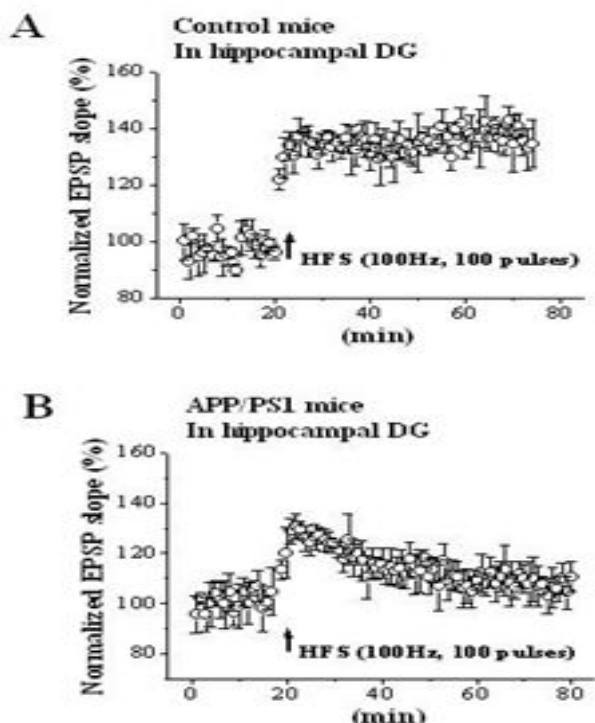


図 2 AD モデルマウスのモリス水迷路学習に対する神経ステロイド DHEA/PREGS の効果。学習開始から 5 日後におけるコントロール (野生型、左カラム群) と AD モデルマウス (右カラム群) の遅延時間と DHEA、PREGS の効果。DHEA、PREGS は野生型に対しては効果がないが、AD モデルマウスでは PREGS のみが有為に遅延時間を短縮した。

DHEA、PREGS による AD モデルマウスの海馬におけるシナプス長期増強の改善効果:

学習実験終了後直ちに海馬スライス標本を作製し、海馬歯状回と CA1 領域でテタヌス刺激 (100 パルス/100 ヘルツ) に対する長期増強 (LTP) を記録したが、AD モデルマウスでは、安定した LTP は誘導できなかった (図 3B)。DHEA は効果はなかったが (図 3C)、PREGS は歯状回 (図 3D)、CA1 のいずれにおいても、LTP をほぼ野生型と同等なレベルに回復し、先の行動実験と対応する結果が得られた。



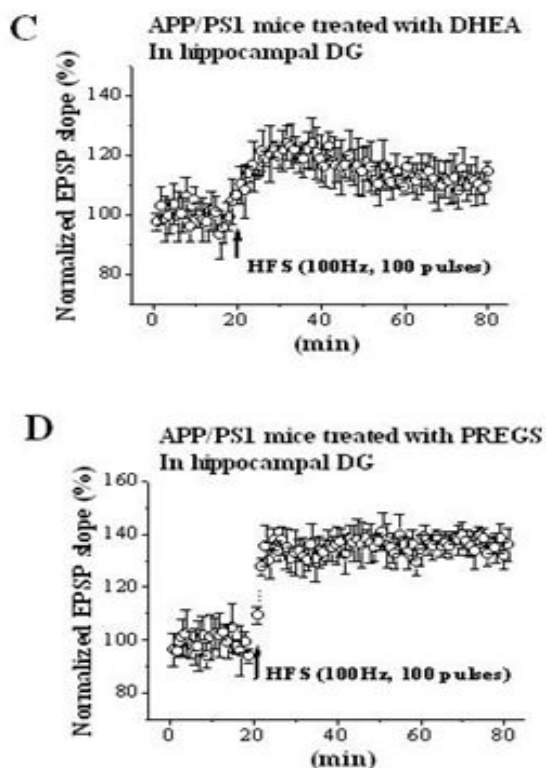


図 3 海馬歯状回におけるテタヌス刺激誘導性長期増強 (LTP)。 A, コントロール (野生型); B, AD モデルマウス; AD モデルマウスに対する、C, DHEA、および、D, PREGS の効果。DHEA は殆ど効果が見られないが、PREGS はほぼコントロールレベルに改善している。

(2) 新生ニューロンの発達の組織学的調査

APP/PS1 マウスにおける新生ニューロンの成熟過程と DHEA と PREGS の効果を追跡するために、BrdU (50mg/kg) を 12 日間連続投与し、投与終了後 1 日目に細胞増殖マーカー (Ki67) で 2 重染色することにより、新生ニューロンの産生数、投与後 14 日目に微小管関連蛋白質マーカー (DCX) との 2 重染色により発達途上細胞の突起形成、投与後 28 日目にニューロン成熟核マーカー (NeuN) およびグリア成熟マーカー (GFAP) との 3 重染色で最終残存細胞の観察と解析を行った。その結果、AD モデルマウスの新生細胞数は野生型よりも有為に多かったが、いずれの薬物も産生数には影響がなかった。一方突起形成は AD モデルマウスは野生型に比べて不全であったが、両薬剤ともにこの不全をほぼ正常レベルに回復した。ところが、AD モデルマウスで著しく減少した最終的な成熟した新生細胞の生存数 (図 4 右カラム 1 列目) は、PREGS によってのみほぼ正常レベルに回復した。グリア細胞についてはいずれの薬

剤も影響はなかった。

剤も影響はなかった。

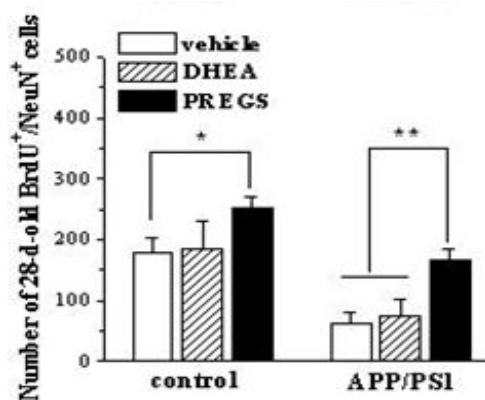


図 4 野生型 (コントロール) および AD モデルマウスの海馬歯状回における成熟顆粒細胞の生存数 (新生後 28 日目) に対する DHEA および PREGS の効果。DHEA は殆ど効果が見られないが、PREGS は大幅な改善効果を示した。

< 結論 >

神経ステロイド DHEA と PREGS は AD モデルマウスにおける新生神経細胞の発育 (突起形成) 不全を著しく改善したが、PREGS のみが最終的な生存細胞数の改善に効果があった。この結果は、PREGS のみが AD モデルマウスにおける学習不全と LTP 誘導不全を回復したという結果と良い一致を示し、PREGS が有望な AD 治療薬となる可能性が示された。

< 今後の課題 >

我々はすでに、健常マウスを用いて、PREGS が新生ニューロンの生存率を高め、それには PREGS による既成熟細胞に終端するシナプス前終末の 7nAChR の感作とその成熟細胞のシグマ 1 (σ_1) 受容体の同時活性化が必要であることを示している。さらに、 σ_1 受容体の活性化が、[NMDA 受容体-細胞内 Ca^{2+} 上昇-nNOS] 経路による NO 分泌を介して新生ニューロンのシナプスを維持することを見出している (Yang et al. Neuropharmacol, 60(2-3):529-41, 2011)。また、 σ_1 受容体の活性化は健常動物の [PI3K-Akt-mTOR] シグナル系を賦活して細胞の生存率向上に寄与することも示している (Li et al. Neuropharmacol, 59(4-5):323-33, 2010)。生化学・薬理学実験により、これらの仕組みが APP/PS1 マウスに対する PREGS 効果においても重要か否かを調べ、PREGS 効果の包括的理解を目指すことが今後の重要課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (9 件)

- (1) Sha S, Zhou L, Yin J, Takamiya K, Furukawa K, Furukawa K, Sokabe M, Chen L. Deficits in cognitive function

- and hippocampal plasticity in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Hippocampus*, 24(4):369-82(2014) 査続有
- (2)Hirata H, Tatsumi H, Lim CT, Sokabe M. Vinculin recruitment to adhesion sites through force-dependent interaction with talin is critical to anchor retrograding actin network. *Am J Physiol: Cell Physiol*, 306(6):C607-20 (2014) 査続有
- (3)Furuya K, Sokabe M, Grygorczyk R, Real-time luminescence imaging of cellular ATP release. *Methods*, 66(2) :330-44 (2014) 査続有
- (4)Tanaka M, Sokabe M, Bidirectional modulatory effect of 17 β -estradiol on NMDA receptors via ER α and ER β in the dentate gyrus of juvenile male rats. *Neuropharmacol*, 75: 262-273 (2013) 査続有
- (5)Grygorczyk R, Furuya K, Sokabe M. Imaging and characterization of stretch-induced ATP release from alveolar A549 cells. *J Physiol*, 591 (5) 1195-1215 (2013) [Editor's choice, Journal cover] 査続有
- (6)Ibuki T, Yamasakia Y, Mizuguchi H, Sokabe M. Protective effects of XBP1 against oxygen and glucose deprivation/reoxygenation injury in rat primary hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, 518(1):45-48 (2012). DOI: 10.1016/j.neulet.2012.04.053 査続有
- (7)Nomura T, Cranfield CG, Deplazes E, Owen DM, Macmillan A, Battle AR, Constantine M, Sokabe M, Martinac B. Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of MscL and MscS. *PNAS*, 109(22):8770-8775 (2012) . 査続有
- (8)Tanaka M and Sokabe M. Continuous de novo synthesis of neurosteroids is required for normal synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Neuropharmacol*, 62: 2372-2386 (2012) 査続有
- (9)Xu Y, Tanaka M, Chen L, Sokabe M. DHEAS induces short-term potentiation via an activation of a postsynaptic metabotropic glutamate receptor in the rat hippocampus. *Hippocampus*, 22(4): 707-722 (2012) 査続有
- [学会発表] (計6件)
- (1)Sokabr M. (Invited) Actin filaments work as a mechanosensor by transducing

- tension into their structural dynamics. Symp. "Mechanobiology", IUPAB2014, Aug 3-7, 2014, Brisbane, AUS
- (2)Sokabe M. (Plenary) Variety of Molecular and Biophysical Mechanisms Underlying Cell Mechanosensing, 7th World Congress of Biomechanics, July 6-11, 2014, Boston, USA
- (3)Sokabe M. (Invite)Mechanotransduction by cytoskeleton-regulated MS channels at cell-substrate adhesions, 2nd Internatl Symp MechanoBiology, May 20-23, 2014, Fukutake ホール Okayama, Japan
- (4)Sokabe M (Kyenote). Mechano-sensitive ATP release: critical involvement in wound healing. ICBME, Dec 4-7, 2013, Singapore
- (5)Sokabe M (organizer/Invited), Furuya K. Critical role of mechanosensitive ATP release from mammary alveoli in their milk ejection. Purine2012, May 31-June 2, 2012, 福岡国際会議場、Fukuoka, Japan
- (6)Sokabe M (Kyenote). Roles of actin cytoskeleton in cellular mechanotransduction. Symposium on "Force Transduction and Emerging Channels", May 9-12, 2012, Berlin, Germany
- [図書] (計2件)
- (1)Sokabe M. Methods for processing and analyzing single channel data. In "Modern Patch Clamp Techniques"(Ed. Okada Y), Springer Verlag, 439 頁 pp85-104 (2012)
- (2)Cai W, Sokabe M, Chen L, Time-window of progesterone neuroprotection after stroke and its underlying molecular mechanisms. In "Advances in the Preclinical Study of Ischemic Stroke", (Ed. Balestrino M), InTech, 502 頁 pp 479-496 (2012)

6 . 研究組織

- (1)研究代表者
曾我部 正博 (SOKABE MASAHIRO)
名古屋大学・医学系研究科・特任教授
研究者番号：10093428
- (2)研究分担者
研究分担者なし
- (3)連携研究者
山田 清文 (YAMADA KIYOFUMI)
名古屋大学・医学部付属病院・教授
研究者番号：30303639
- (4)研究協力者
陳 玲 (Ling Chen)
南京医科大学・生理学・教授