

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791506

研究課題名(和文)血管性認知症におけるAT2受容体および神経伝達物質の相互作用に着目した検討

研究課題名(英文)Examination of the interaction of AT2 receptor and neurotransmitter in vascular dementia

研究代表者

岩波 純(iwanami, jun)

愛媛大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90624792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：近年の高齢者や生活習慣病患者増加は将来的な認知症患者の増加につながる事が予想されており、その対策が急務である。アンジオテンシンII2型(AT2)受容体は脳保護効果を持つことから、AT2受容体刺激薬の認知機能改善への効果について、また、NMDA受容体の過剰な刺激は神経細胞死を誘導することから、NMDA受容体調節薬との併用効果について検討した。糖尿病マウスは野生型マウスに比べて認知機能が低下しており、AT2受容体刺激薬、NMDA受容体調節薬で改善傾向が認められた。さらに併用投与することで脳血流量、神経伝達効率、海馬アセチルコリン濃度などの増加により、単独投与よりも認知機能の改善が認められた。

研究成果の概要(英文)：Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is reported to be associated with increased risk of dementia. We previously reported that stimulation of angiotensin II type 2 (AT2) receptor exerts brain protective effects. Accordingly, we examined the possible synergistic effect of AT2 receptor agonist, C21 and NMDA receptor antagonist, memantine on cognitive impairment in T2DM mice, KKAY. Treatment with C21 or memantine alone at these doses tended to attenuate cognitive function compared with control KKAY without significant difference. Co-administration of C21 and memantine significantly improved cognitive function. C21 treatment increased cerebral blood flow (CBF) and hippocampal field-excitatory potential (EPSP), but memantine did not influence CBF and EPSP. Moreover, treatment with memantine increased acetylcholine levels, which was lower in KKAY compared to wild-type mice, and that C21 treatment enhanced memantine-induced acetylcholine secretion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：認知機能 血管性認知症 糖尿病 レニン・アンジオテンシン系 AT2受容体 NMDA受容体

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会になり、今後の認知症患者の急速な増加が予想され、その対策が急務となっている。現在使用されている認知症治療薬は、発症後の進行を遅らせることを目的としたものが中心で、認知症発症後の治療には限界があり、発症の予防に注目したアプローチが求められている。最近、認知症の発症には、中年期の高血圧や糖尿病が関連していることが臨床的に報告され、生活習慣病の対策が重要視されている。レニン・アンジオテンシン (RA) 系は高血圧だけでなく糖代謝にも深く関与し、生活習慣病の発症・進展要因の一つであり、最近の疫学調査で、アンジオテンシン II 型 ( $AT_1$ ) 受容体阻害薬 (ARB) を使用している高血圧患者において、他の循環器薬を使用していた患者に比べて認知症の発症が抑制されると報告され、RA 系の制御による認知症の発症予防が期待されている。これまで我々は、RA 系と臓器障害についての基礎的な研究を行ってきたが、RA 系の制御が脳保護にも有効であることが次第に分かってきた。また、RA 系の制御により神経伝達物質の一つであるアセチルコリンの分泌が増加することが以前より報告されており、認知機能の改善に有効であることが考えられる。これまで RA 系の関与については主に  $AT_1$  受容体シグナルの活性化の抑制が中心であったが、アンジオテンシン II 型 ( $AT_2$ ) 受容体の活性化による  $AT_1$  受容体の拮抗作用ならびに独自の臓器保護作用が脳保護にも有効であると考えられる。我々はこれまでに、 $AT_2$  受容体シグナルが脳梗塞後の脳保護作用に働くことを報告し、その作用として、酸化ストレス産生や炎症反応の抑制、脳血流量の増加、更に神経細胞の分化を促進する効果を報告してきた。また、ヒトにおいて  $AT_2$  受容体の欠損や遺伝子変異が精神遅滞を誘導することが報告されており、認知症治療における  $AT_2$  受容体の活性化の有効性が示唆される。また、最近我々は  $AT_2$  受容体の直接的刺激薬、Compound 21 (C21) を野生型マウスへ投与することにより学習機能の向上が認められ、脳室内にアミロイド  $\beta$  を注入するアルツハイマー病モデルに C21 を投与するとアミロイド  $\beta$  による認知機能の低下に抑制効果を認めることを報告した。

一方、記憶・学習には神経細胞同士のシグナル伝達が重要であり、そのシグナルは神経伝達物質の調節により行われている。神経伝達物質の一つであるグルタミン酸の受容体である N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体の活性化はシナプス伝達効率の亢進 (シナプス可塑性) に重要であり、NMDA 受容体阻害薬を投与することで認知機能の低下が引き起こされることが報告されている。しかしながら、NMDA 受容体の過剰な活性化は神経興奮毒性を引き起こし、神経細胞死を誘導することが報告され、この神経細胞死は NMDA 受容体阻害薬の投与により抑制されている。

こうしたことから、NMDA 受容体の至適調節が認知機能の低下抑制に重要であることが示唆される。我々は、モリス水迷路試験後のマウスの海馬において、学習行動後 NMDA 受容体のリン酸化が増加しており、この増加は  $AT_2$  受容体欠損マウスで減少していること、また、野生型マウスに C21 を投与することにより増強することを確認した。このことから、 $AT_2$  受容体の活性化が NMDA 受容体の制御に影響していることが示唆された。以上の結果から、脳内における RA 系と神経伝達物質によるシグナル伝達の間には何らかの関連があり、認知症の新しい治療に繋がる可能性がある。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、認知機能低下モデルマウスを用いて  $AT_2$  受容体の活性化と NMDA 受容体制御の相互作用による認知機能の改善効果を検討し、新たな治療法に繋がるメカニズムの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

認知機能低下モデルマウスとして、慢性脳低灌流モデル、糖尿モデルマウスを用いて検討した。慢性脳低灌流モデルは、10 週齢の雄性 C57BL/6 マウスの両総頸動脈に極小コイル (内径 0.18mm) を留置する両総頸動脈狭窄術 (BCAS) をすることで作成した。BCAS 作成から 6 週間後、モリス水迷路試験を行うことで認知機能を検討した。脳内における  $AT_2$  受容体の影響について、 $AT_2$  受容体刺激薬、C21 (10  $\mu$ g/kg/day) を BCAS の一週間前から投与を毎日一回腹腔内投与し、サンプル採取まで行った。

次に糖尿病による認知機能低下への  $AT_2$  受容体と NMDA 受容体の影響について検討した。8 週齢の糖尿病モデルマウス、KKAy を以下のグループ分け認知機能への影響を検討した。1) 無投与群、2) C21 (10  $\mu$ g/kg/day) 投与群、3) NMDA 受容体制御薬メマンチン (20 mg/kg/day) 投与群、4) C21+メマンチン併用投与群。

(1) 認知機能については、モリス水迷路試験を用いて検討した。直径 120cm のプールの隠れたプラットフォームを探索する試験で、1日 5 回、20 分おきにプールに入れ、プラットフォームを見つけるトレーニングを行い、泳動時間をビデオトラッキングシステムにより記録した。このトレーニングを 5 日間連続で試行し、1 日の泳動時間の平均を算出し、プラットフォームまでの到達時間を認知機能として評価した。

(2) 血圧への影響については Tail Cuff 法にて検討した。

(3) 血流量への影響については、脳表層の血流を 2 次元レーザー Doppler 血流系を用いて検討した。

(4) 脳内における神経伝達物質変動への影響については、マイクロダイアリシス法にて脳内のアセチルコリンを測定した。

(5) 脳内における炎症性サイトカインの産生について、脳サンプルを採取し、real time RT-PCR 法にて mRNA の発現を測定することで検討した。

(6) 興奮性後シナプス電位 (EPSP) について、シナプスの伝達効率を、電気生理学的に電気刺激装置により検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 慢性脳低灌流モデルにおいて、BCAS および C21 投与による体重、脳重量/体重比、収縮期血圧への影響は認められなかった。

認知機能は、偽手術群に比べ BCAS 群でプラットフォームまでの到達時間の遅延が認められたが、C21 を投与することでこの遅延は改善していた。また、脳血流量は BCAS 群で低下していたが、C21 の投与により改善していた。脳内の炎症性サイトカインの産生も BCAS 群で増加していたが、C21 投与群で低下していた。

(2) 次に、脳内における  $AT_2$  受容体刺激と NMDA 受容体制御における認知機能改善効果について糖尿病モデルマウスを用いて検討した。

KKAy マウスに C21、メマンチン単独投与および併用投与することによる体重、収縮期血圧への影響は認められなかった。脳重量は薬剤投与群で増加していたが、脳/体重比では、メマンチン投与群で有意に増加していた。血糖への影響を検討したところ、C21、メマンチン単独投与群で減少傾向があり、併用投与することで有意に減少していた。

認知機能への影響について、Y 字迷路試験を行った。短期記憶の指標となる交替行動率は C21、メマンチン単独投与および併用投与群で増加しており認知機能の向上が認められた (図 1)。

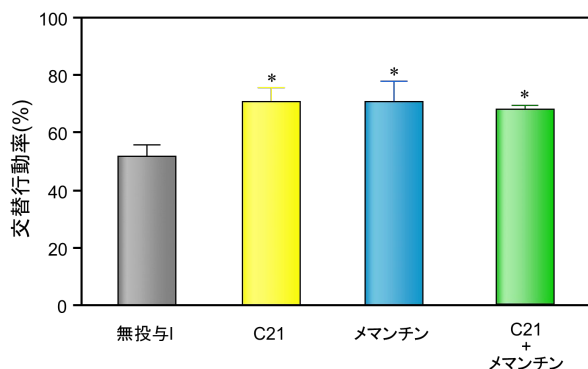


図 1. Y 字迷路試験

モリス水迷路試験において、これまで我々は野生型マウスに比べて KKAy マウスにおいてプラットフォームへの到達時間が遅延しており、糖尿病モデルマウスで空間認知機能が低下していることを確認している。無投薬群に比べ C21 およびメマンチンを単独投与することにより到達時間が減少する傾向があったが有意差は認められなかった。これら薬剤

を併用投与することでプラットフォームまでの到達時間は単独投与群よりもさらに減少しており、空間認知機能が改善していた (図 2)。

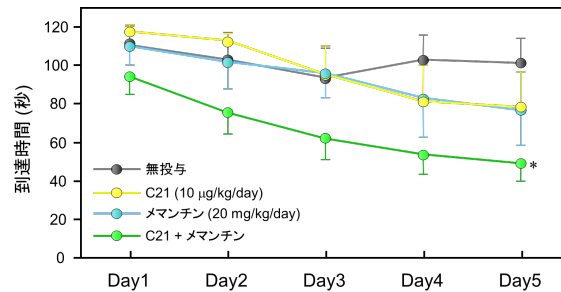


図 2. モリス水迷路試験

このメカニズムについて、まず脳血流量への影響について検討した。メマンチン単独投与群では無投与群と比べ脳血流量の増加は認められなかったが、C21 単独および併用投与群で増加していた (図 3)。

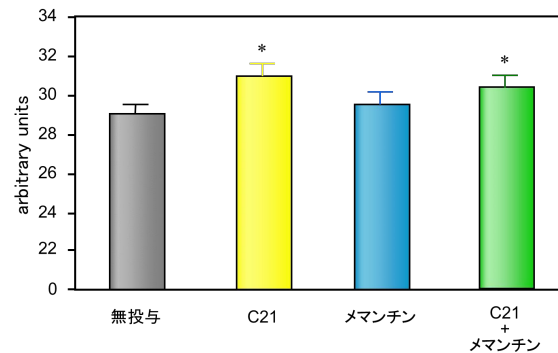


図 3. 脳血流量への影響

次に海馬におけるシナプス伝達効率を測定したところ、メマンチン単独投与群で増加傾向が認められ、C21 単独および併用投与群で有意に増加していた。単独投与と併用投与での増加に有意差は認められなかったが、併用投与群で増加する傾向があった (図 4)。

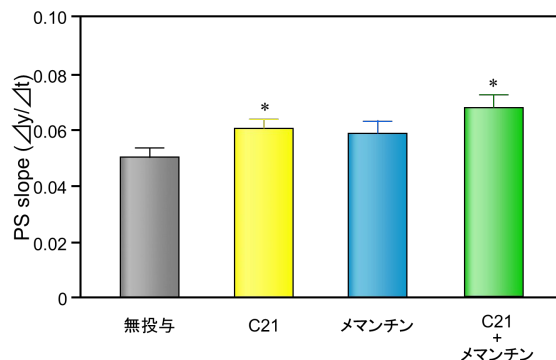


図 4. 興奮性後シナプス電位

海馬における神経伝達物質の影響について、KKAy マウスで野生型マウスに比べてアセチルコリン濃度が低下していることを確認

している。投薬によるアセチルコリン分泌を検討したところ、C21 およびメマンチン単独投与群で無投与群に比べ有意に増加しており、さらに併用投与することで単独投与群よりも増加していた（図5）。

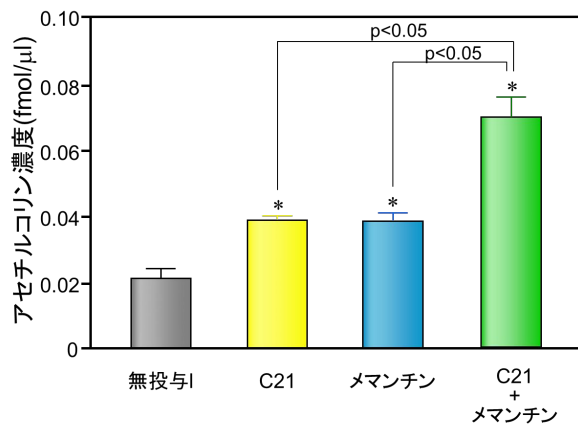


図5. 海馬アセチルコリン濃度

神経成長因子である BDNF の海馬における影響を検討したところ、メマンチン単独投与群では無投与群と有意差は認められなかったが、C21 単独投与群で有意に増加していた。また、併用投与群でも増加しており、この増加は C21 単独投与群よりも有意に増加していた（図6）。

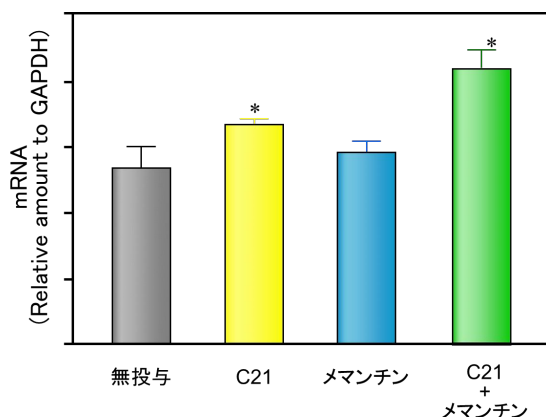


図6. 海馬における BDNF

皮質および海馬における炎症性サイトカインの産生について検討したが、C21、メマンチン単独投与および併用投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、C21 による AT<sub>2</sub> 受容体刺激は血管性認知症モデルにおいて、脳血流量を増加し、炎症性サイトカインの産生を抑制することで認知機能低下を抑制することが示唆された。

また、糖尿病モデルマウスにおいて、AT<sub>2</sub> 受容体刺激と NMDA 受容体制御により認知機能低下が軽減していたことから、両者を組み合わせることにより糖尿病に起因する認知機能低下を改善する可能性があり、認知症に対する新しい治療法に有用であることが考

えられる。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Wang XL, Nakaoka H, Kan-No H, Chisaka T, Bai HY, Min LJ, Horiuchi M. Possible synergistic effect of direct angiotensin II type 2 receptor stimulation by compound 21 with memantine on prevention of cognitive decline in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;724C:9-15.

DOI; 10.1016/j.ejphar.2013.12.015.

査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

岩波純、茂木正樹、堀内正嗣. レニン・アンジオテンシン系制御に着目した血管性認知機能障害に対する治療戦略. 第 39 回日本脳卒中学会 2014 年 3 月 13-15 日 大阪国際会議場、大阪

岩波純、茂木正樹、王小俐、佃架奈、中岡裕智、大島弘世、千阪俊行、Bai Hui-Yu、菅野晴美、関莉娟、堀内正嗣. AT<sub>2</sub> 受容体刺激と NMDA 受容体調節による糖尿病性認知機能低下の改善効果. 第 36 回日本高血圧学会総会 2013 年 10 月 24-26 日 大阪国際会議場、大阪

岩波純、茂木正樹、関莉娟、佃架奈、景斐、大島弘世、堀内正嗣. 糖尿病モデルマウスにおける AT<sub>2</sub> 受容体と NMDA 受容体の相互作用による認知機能低下改善効果. 第 35 回日本高血圧学会総会 2012 年 9 月 20-22 日 ウェスティンナゴヤキャッスル、名古屋市

岩波純、茂木正樹、関莉娟、佃架奈、景斐、大島弘世、堀内正嗣. 慢性脳低灌流による認知機能低下への AT<sub>2</sub> 受容体アゴニストの効果. 第 35 回日本高血圧学会総会 2012 年 9 月 20-22 日 ウェスティンナゴヤキャッスル、名古屋市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩波 純 (Iwanami, Jun)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90624792

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし