

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791771

研究課題名（和文） 薬剤のインスリン様成長因子-I 増加作用による脳高次機能障害治療戦略

研究課題名（英文） Drugs improve mouse cognitive function by increasing the production of insulin-like growth factor-I

研究代表者

成松 紀子（NARIMATSU NORIKO）

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50381794

研究成果の概要（和文）：アセチルコリンエステラーゼ阻害薬ドネペジルの知覚神経刺激で、海馬での IGF-I 産生促進により認知機能の改善効果があるかどうか検討した。ドネペジル投与マウスでは海馬の CGRP、IGF-I タンパク質、IGF-I mRNA を有意に増加させ、認知機能も改善させた。タクリンは効果を認めなかった。CGRP ノックアウトマウスでは野生型マウスのような効果は認めなかった。ドネペジルは知覚神経刺激により CGRP 放出し、海馬の IGF-I 産生を促進、認知機能改善効果に寄与する。

研究成果の概要（英文）：Insulin-like growth factor-I (IGF-I) exerts beneficial effects on cognitive function. Because stimulation of sensory neurons induces IGF-I production by releasing calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the mouse brain, we hypothesized that donepezil may have a stimulatory effect on sensory neurons in addition to an inhibitory effect on acetylcholinesterase, thereby promoting angiogenesis and neurogenesis through an increase in IGF-I production in the hippocampus. To examine this possibility, we analyzed the effects of two selective acetylcholinesterase inhibitors (donepezil and tacrine) on hippocampal IGF-I production and cognitive function in WT mice, CGRP-knockout [CGRP (-/-)] mice, and WT mice with functional sensory denervation caused by neonatal administration of capsaicin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：脳・神経、リハビリテーション

1. 研究開始当初の背景
インスリン様成長因子-I (IGF-I) は海馬における神経細胞のアポトーシスを抑制し

て神経再生を促進させることで脳障害モデルラットの認知機能を改善させる (Aberg MA, et al. J Neurosci 20:2896-2903, 2000)。

血清インスリン様成長因子-I 濃度の低下したマウスにインスリン様成長因子-I を投与することで認知機能が改善したとの報告 (Trejo JL, et al. Mol Cell Neurosci 37:402-411, 2008) や、高齢者において血清インスリン様成長因子-I 濃度と認知機能には相関が認められるとの報告もある (Landi F, et al. Growth Horm IGF Res 17:58-66, 2007)。

一方、研究協力者の岡嶋研らはカルシトニン遺伝子関連ペプチドが、血管内皮細胞、および実質細胞に作用して、認知機能改善効果のあるインスリン様成長因子-I 産生を、その転写を促進することで増加させることを報告した (Harada N, et al. Neuropharmacology 52:1303-1311, 2007)。このことはマウス海馬において知覚神経刺激によりカルシトニン遺伝子関連ペプチド濃度が上昇しインスリン様成長因子-I 産生を促進する可能性を示している。

2. 研究の目的

外傷や脳卒中による脳障害は、物理的な圧迫による一次的な損傷に引き続く炎症反応によって、二次的に周囲の神経細胞が障害され、機能障害の増悪を引き起こす。この病態の治療では、外科的治療とともに、神経細胞の浮腫による二次的な神経細胞障害の予防を目的として、モニター等が用いられているが、その効果は十分でなく、高次機能障害の後遺症等、患者の生活の質は、生涯にわたって低下する。

本研究の目的は、ドネペジルにおいてインスリン様成長因子-I の産生を促進することで、認知機能改善に寄与する新たな治療法確立を目指すところにある。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス (雄、10-12 週齢) を使用した。野生型 (WT) マウスの生後 2 日目にカプサイシン 50mg/kg を皮下注射することにより知覚神経障害モデルを作成した。マウスにドネペジル (1.5mg/kg/day) またはタクリン (1.5mg/kg/day) を 4 週間経口投与し、以下の実験を行った。(1)海馬を採取し、CGRP、IGF-I 濃度測定を行った。また、海馬の mRNA 量の測定を行った。(2)消化管の知覚神経刺激は、脊髄視床路や迷走神経求心性線維により、延髄の孤束核 (NTS)、橋の結合腕傍核 (PBN) を介して大脳皮質や海馬に伝達される。ドネペジルによる消化管の知覚神経刺激がこれらの経路を介して、海馬に伝達される可能性を検討するために、脊髄後角、NTS、PBN、および海馬歯状回 (DG) の c-fos 染色を行った。(3)脳を採取し免疫染色を行った。海馬の IGF-I 発現につき、astrocyte のマーカーである GFAP との二重染色を行い、

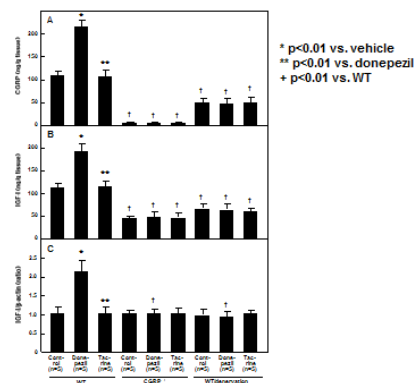
astrocyte における IGF-I 陽性細胞の計測を行った。さらに、再生細胞のマーカーである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 50mg/kg/day、5 日間腹腔内投与したマウスの脳を採取し免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞を計測した。また、血管内皮細胞のマーカーである CD31、神経細胞のマーカーである calbindin-D28k、GFAP の抗体を用いてそれぞれ二重染色を行い、BrdU 陽性細胞の確認を行った。(4)Morris の水迷路を 1 日 1 トライアル、5 日間行い、ゴールへの到達時間の変化を比較した。最終トライアルの後、ゴールを取り除く probe test を行い、ゴール付近の滞在時間を比較した。

astrocyte における IGF-I 陽性細胞の計測を行った。さらに、再生細胞のマーカーである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 50mg/kg/day、5 日間腹腔内投与したマウスの脳を採取し免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞を計測した。また、血管内皮細胞のマーカーである CD31、神経細胞のマーカーである calbindin-D28k、GFAP の抗体を用いてそれぞれ二重染色を行い、BrdU 陽性細胞の確認を行った。(4)Morris の水迷路を 1 日 1 トライアル、5 日間行い、ゴールへの到達時間の変化を比較した。最終トライアルの後、ゴールを取り除く probe test を行い、ゴール付近の滞在時間を比較した。

4. 研究成果

WT マウスにおいて、(1)ドネペジル群はコントロール群、タクリン群に比べ海馬の CGRP 濃度、IGF-I 濃度を有意に上昇させた。mRNA 量も有意に増加させた。

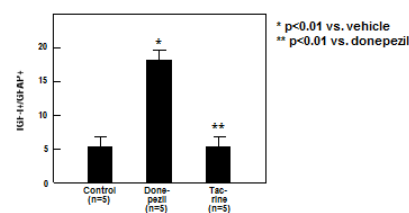
図 1 : マウス海馬における IGF-I、CGRP、IGF-I mRNA の定量



(2)ドネペジル群では、コントロール群、タクリン群にくらべ、脊髄後角、NTS、PBN、DG の c-fos 発現の増強が認められた。(3)ドネペジル群では、GFAP 陽性細胞に一致して IGF-I 陽性細胞の増加が認められた。

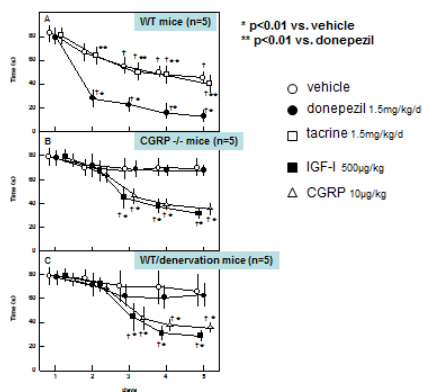
図 2 : マウス海馬における IGF-I 陽性細胞数の比較

マウス海馬における IGF-I/GFAP 陽性細胞数の比較



calbindin-D28k 陽性細胞と一致してドネペジル群で増加していたが、GFAP 陽性細胞との二重染色では BrdU 陽性細胞の増加が認められなかった。(4)Morris 水迷路試験で、コントロール群、タクリン群においても試験開始 3 日目から徐々にゴールへの到達時間が短縮されたが、ドネペジル投与群では、試験開始 2 日目からゴールへの到達時間が短縮し、コントロール群、タクリン群と比較しても有意に短縮した。ドネペジルによる認知機能向上効果が、インスリン様成長因子-I そのものの投与によっても発現するか否か検討を行った。インスリン様成長因子-I を皮下注射したマウスにおいて、Morris の水迷路試験を行ったところ、ドネペジルを投与したマウスと同様、認知機能の有意な向上が認められた。

図 3 : Morris Water Maze Task による認知機能評価



probe test において、ドネペジル群はコントロール群、タクリン群に比べ、ゴール付近の滞在時間が有意に長かった。(1) - (4) の実験において、CGRP ノックアウトマウス、知覚神経障害モデルマウスにおいては、ドネペジルによる有意な変化を認めなかった。ドネペジルは、知覚神経活性化作用を介して、海馬の IGF-I 産生を促進し、マウスの認知機能を改善する可能性が示された。

ドネペジルは、脳高次機能改善の戦略において、薬物投与の範疇に属するが、これまでに用いられた薬物の中には、インスリン様成長因子-I という、細胞死抑制、さらに細胞再生促進という重要な作用を有する物質を、海馬で増加させるような作用を有するものは報告されておらず、ドネペジルの新たな作用機序が解明できた可能性がある。インスリン様成長因子-I そのものを静脈内投与して、いろいろな疾患治療に応用した試みでは、血中の結合蛋白によりその作用が阻害されるため、大量のインスリン様成長因子-I 投与が必要となり、そのため低血糖などの副作用

が認められ、結果として十分な治療効果が得られていない。ドネペジル投与により海馬でインスリン様成長因子-I 産生を促進すれば、組織のインスリン様成長因子-I は血液中の結合蛋白による失活を逃れることできるので、安全で効果的な認知機能改善効果が期待できる。ドネペジルは、すでに臨床で広く用いられており、本研究成果を踏まえて、近い将来での臨床試験も可能である。また、今後、知覚神経刺激作用を有する栄養素や食物を見出すことで、インスリン様成長因子-I 産生促進から認知機能向上に役立つ食生活に応用できる可能性もある。

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 2 件)

- ① Narimatsu N, Harada N, et al.
Donepezil improves cognitive function in mice by increasing the production of insulin-like growth factor-I in the hippocampus, J Pharmacol Exp Ther, 査読有、330, 2009, 2-12
- ② Harada N, Narimatsu N, et al.
Stimulation of sensory neurons improves cognitive function by promoting the hippocampal production of insulin-like growth factor-I in mice, Transl Res, 査読有、154, 2009, 90-102

[学会発表] (計 3 件)

- ① Noriko Narimatsu, Donepezil improves mouse cognitive function by hippocampus IGF-I production, ASA 2010 annual meeting, 2010, 10/16-20, America
- ② 成松紀子、ドネペジルは海馬のインスリン様成長因子-I を増加させマウスの高次脳機能を改善させる (第 2 報) ~海馬への刺激伝達経路、海馬の血管および神経再生作用の解析をもとに検討、日本麻酔科学会第 57 回学術集会、2010、6/3-5、福岡
- ③ 成松紀子、ドネペジルは海馬のインスリン様成長因子-I を増加させマウスの高次脳機能を改善させる、日本麻酔科学会第 56 回学術集会、2009、8/16-8/18、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成松 紀子 (NARIMATSU NORIKO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50381794

(2) 研究分担者
該当者なし

(3) 連携研究者
該当者なし