

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20690

研究課題名（和文）非拮抗型AMPA受容体阻害薬ペランパネルによるアルツハイマー病の病態改善

研究課題名（英文）Improvement of Alzheimer's disease pathology through AMPA receptor inhibition by perampanel

研究代表者

上田 紗希帆（Sakiho, Ueda）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50913521

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、ADモデルマウス（病状を再現したマウス）と細胞モデルに抗てんかん薬であるペランパネル（PER）を投与し、神経の過剰な興奮を抑えることで認知機能やADの原因タンパク質の一つであるアミロイド（A $\beta$ ）蓄積を改善できるか検証している。我々はまず、PERの急性処置がA $\beta$ 生成を抑制することで、脳内のA $\beta$ を減少させる可能性を示した。次にPERを5カ月間投与したADマウスでは、PERを投与しなかったものと比べて、記憶機能が改善する傾向と脳内のA $\beta$ 蓄積量が減少する傾向が見られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病（AD）は、脳内に異常なタンパク質がたまることで引き起こされる認知症の原因疾患である。AD患者はてんかんと関連性が高いことが知られているが、AD患者にどのタイミングでどの抗てんかん薬を選択すべきかはコンセンサスがまだ得られていない。本研究は、すでに市場に上梓されている抗てんかん薬ペランパネル（PER）がADの原因タンパク質の一つであるアミロイド（A $\beta$ ）の産生と蓄積を抑制することをマウスと細胞モデルを用いて示した。これは、ADの新たな治療戦略としての可能性を示唆する重要な発見であるといえる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the impact of perampanel (PER), an anti-epileptic drug targeting AMPA receptors, on amyloid proteins (A $\beta$ ). A $\beta$  is a pivotal pathogenic protein of Alzheimer's disease (AD). We hypothesize that PER might reduce A $\beta$  accumulation by suppressing neuronal hyperexcitability.

Using AD mice and cellular models, we demonstrated that acute PER administration suppressed the A $\beta$  production, consequently decreasing soluble A $\beta$  levels in the brain. Moreover, we revealed that chronic PER administration showed a tendency to attenuate A $\beta$  deposition and restore cognitive functions in AD mouse model compared to the control.

研究分野：臨床神経学

キーワード：アルツハイマー病 てんかん ペランパネル

## 1. 研究開始当初の背景

以前よりアルツハイマー病(AD)の患者ではてんかんの罹患率が高いことが臨床的に知られていた(1-5)。近年の詳細な神経生理学的研究は、これまで考えられていたよりも多くのAD患者がてんかん性放電を呈し、またその有無が認知機能低下に相関することを明らかにしてきた(6-8)。また、ADでは病態極早期における海馬ネットワークの神経過剰興奮が病理病態を促進することがわかってきている(9-11)。神経活動の亢進はアミロイド蛋白(A $\beta$ )のシナプス前神経での産生と間質液中への放出を促進するため、結果として過剰な神経興奮がA $\beta$ 病理そのものを悪化させると推測される(12-15)。

これらの知見から、抗てんかん薬がADの治療選択の一つとして注目されている(6, 16-18)。しかし、多くの抗てんかん薬の中には副作用として認知機能障害を引き起こすものも存在し、ADにおける適切な抗てんかん薬の選択についての共通認識はまだ得られていない。これまでADモデルマウスやMCI患者を対象とした臨床試験で、レベチラセタムに一定の認知機能障害進行抑制効果が示されているが、抗てんかん薬がAD病理を改善させるという報告はまだ存在しない(16-19)。

我々はAD最初期において神経過剰興奮が病理促進とシナプス恒常性破綻を引き起こすという仮説のもと、脳の早い興奮性伝達を担うAMPA型グルタミン酸受容体(AMPA)を標的とする唯一の抗てんかん薬であるペランパネル(PER)に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は抗てんかん薬として臨床使用されているPERをA $\beta$ 沈着前のADモデルマウスに投与し、神経過剰興奮の抑制を介したAD病理および認知機能障害への効果を検証することである。

具体的には、「ADモデルマウスにおけるPER単回投与の海馬A $\beta$ 病理に対する有効性とその機序」および「ADモデルマウスにおけるPER長期投与のA $\beta$ 病理および認知機能障害に対する有効性」の2点について検証した。

## 3. 研究の方法

これまで我々は、海馬に挿入した透析膜から持続的に間質液を回収するin vivo microdialysisの手法を用いて、若齢APPトランスジェニックマウスのAMPAを阻害することでA $\beta$ 産生が抑制され海馬間質液(ISF)中の可溶性A $\beta$ 値が速やかに減少することを示した。これはAMPAの阻害が将来のA $\beta$ 病理軽減につながる可能性を示唆している。そこで我々はまず、APPトランスジェニックマウスであるJ20にPERを単回投与し、A $\beta$ が減少する機序の解明を行った。具体的には、A $\beta$ 産生を $\gamma$ セクレターゼ阻害薬(GSI)で完全に阻害したJ20にPERを経口単回投与し、in vivo microdialysisを用いてPERの海馬ISF A $\beta$ クリアランスに対する影響を評価した。またPERの経口単回投与後に海馬・皮質を回収して、A $\beta$ 前駆タンパク質(APP)およびAPP切断に關与する蛋白質を生化学的に解析することで、PERがA $\beta$ 産生に及ぼす影響を評価した。

また、A $\beta$ 沈着前である3カ月齢からアミロイド斑が出現し始める7カ月齢までのJ20に対してPERを継続的に投与し、組織学的解析と行動解析を実施した。

## 4. 研究成果

(1) PERの急性投与がJ20の海馬の可溶性A $\beta$ クリアランスに影響しないことを示した。

ISF A $\beta$ 値はA $\beta$ の産生、細胞外スペースへの放出、ISFから脳外への排出の3つのバランスで規定されると考えられる。我々はPER投与によるISF A $\beta$ 値減少がクリアランスの増加によるものかどうかを検討するために、A $\beta$ が沈着する前の若齢J20マウスにGSIを投与し、A $\beta$ 産生を抑制した上で、PERまたは溶媒を投与した。経時的に回収した海馬ISF A $\beta$ 値をELISAで測定し半減期を求めたところ、PER投与群と溶媒投与群で有意差を認めなかった。この結果から、PERの急性投与はJ20の海馬の可溶性A $\beta$ の間質液からのクリアランスに影響しないことを示した。

(2) PERの急性投与が、J20の海馬でA $\beta$ 前駆タンパク質(APP)の切断を低下させる可能性を示唆した。

J20マウスにペランパネルまたは溶媒を単回経口投与し、投与の影響がもっとも大きいと考えられる5時間後に両側海馬を速やかに回収してホモジネートを作成し、全長型APPとその切断C末端断片(APP-CTF)をウェスタンブロットで測定した。結果として、PER投与群においては全長型APPの増加とAPP-CTFの減少を認めた。PERの急性投与がJ20の海馬間質液中のA $\beta$ を減少させることと合わせると、この結果はPERの急性投与がJ20の海馬においてAPPの切断を抑制することでA $\beta$ 産生を抑制している可能性を示唆すると考えられる。

(3) AD の神経過剰興奮モデルを再現した初代神経培養細胞で、PER 投与が神経興奮依存性の APP の切断を抑制することを示した。

野生型マウスの大脳皮質で作成した初代神経培養細胞に A $\beta$  オリゴマー (A $\beta$  O) およびテトロドトキシン (TTX) で前処置し、過剰興奮モデルを作成した。培地中に PER または溶媒を加えてグルタミン酸で神経興奮を惹起したところ、PER 投与群で APP の切断産物である可溶性 APP (sAPP) の培地中の値の低下を認めた。この結果から、PER は AD の神経過剰興奮モデルを再現した *in vitro* のモデルで、APP の切断を抑制したと考えられる。

(4) PER の長期投与は J20 マウスの認知機能とアミロイド病理を改善させる傾向を示した。

A $\beta$  沈着前である 3 カ月齢からアミロイド斑が出現し始める 7 カ月齢までの J20 に対して高用量 PER、低用量 PER、または溶媒を、また同腹仔の野生型マウスに対して溶媒を継続的に投与し、各種行動解析と免疫組織染色を実施した。結果として、高用量 PER を投与した J20 において溶媒を投与した J20 と比較して新奇物品探索試験および恐怖条件付け文脈試験において認知機能が改善する傾向が示された。また、後方海馬を含む脳断片のヒト APP のみを認識する抗体を用いた免疫組織染色にて、PER 用量依存的にアミロイド斑が減少する傾向を認めた。

以上より、本研究は PER の急性投与が APP の切断抑制を介して A $\beta$  産生を低下させ、長期継続投与が AD モデルマウスの脳内 A $\beta$  負荷を減少させて認知機能を改善する可能性を示したといえる。すでに臨床的な安全性が一定割合確保された薬剤が AD の病態を改善することを示唆する結果を得られた意義は大きく、AMPA をターゲットとした新しい治療アプローチの可能性を探るための有望な一歩である。今後の展望として、APP の切断や AMPAR サブユニットの生化学的解析追加や再現性の確認、PER 投与期間、投与時期が AD 病態改善に及ぼす影響の検討を予定している。PER による AMPAR 阻害は、AMPA をターゲットとした AD の新しい治療戦略の観点として今後さらに検証されるべきである。

#### <参考文献>

1. Sjogren, T., Sjogren, H., and Lindgren, A. G. H. (1952) Morbus Alzheimer and morbus Pick; a genetic, clinical and patho-anatomical study. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl* 82, 1-152
2. Förstl, H., Burns, A., Levy, R., Cairns, N., Luthert, P., and Lantos, P. (1992) Neurologic signs in Alzheimer's disease. Results of a prospective clinical and neuropathologic study. *Arch Neurol* 49, 1038-1042
3. Mendez, M. F., Catanzaro, P., Doss, R. C., Arguello, R., and Frey, W. H. (1994) Seizures in Alzheimer's Disease: Clinicopathologic Study. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 7, 230-233
4. Mann, D. M. A., Pickering-Brown, S. M., Takeuchi, A., and Iwatsubo, T. (2001) Amyloid Angiopathy and Variability in Amyloid Deposition Is Determined by Mutation Position in Presenilin-1-Linked Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology* 158, 2165-2175
5. Jayadev, S., Leverenz, J. B., Steinbart, E., Stahl, J., Klunk, W., Yu, C.-E., and Bird, T. D. (2010) Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2. *Brain* 133, 1143-1154
6. Vossel, K. A., Beagle, A. J., Rabinovici, G. D., Shu, H., Lee, S. E., Naasan, G., Hegde, M., Cornes, S. B., Henry, M. L., Nelson, A. B., Seeley, W. W., Geschwind, M. D., Gorno-Tempini, M. L., Shih, T., Kirsch, H. E., Garcia, P. A., Miller, B. L., and Mucke, L. (2013) Seizures and Epileptiform Activity in the Early Stages of Alzheimer Disease. *JAMA Neurology* 70, 1158-1166
7. Vossel, K. A., Ranasinghe, K. G., Beagle, A. J., Mizuiri, D., Honma, S. M., Dowling, A. F., Darwish, S. M., Van Berlo, V., Barnes, D. E., Mantle, M., Karydas, A. M., Coppola, G., Roberson, E. D., Miller, B. L., Garcia, P. A., Kirsch, H. E., Mucke, L., and Nagarajan, S. S. (2016) Incidence and impact of subclinical epileptiform activity in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* 80, 858-870
8. Lam, A. D., Deck, G., Goldman, A., Eskandar, E. N., Noebels, J., and Cole, A. J. (2017) Silent hippocampal seizures and spikes identified by foramen ovale electrodes in Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 23, 678-680
9. Palop, J. J., Chin, J., Roberson, E. D., Wang, J., Thwin, M. T., Bien-Ly, N., Yoo, J., Ho, K. O., Yu, G.-Q., Kreitzer, A., Finkbeiner, S., Noebels, J. L., and Mucke, L. (2007) Aberrant Excitatory Neuronal Activity and Compensatory Remodeling of Inhibitory Hippocampal Circuits in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Neuron* 55, 697-711
10. JJ, P., and L, M. (2010) Synaptic depression and aberrant excitatory network

activity in Alzheimer's disease: two faces of the same coin? *Neuromolecular medicine* 12

11. Gilbert, J., Shu, S., Yang, X., Lu, Y., Zhu, L.-Q., and Man, H.-Y. (2016) - Amyloid triggers aberrant over-scaling of homeostatic synaptic plasticity. *Acta Neuropathologica Communications* 4, 131

12. Cirrito, J. R., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, e. W., Parsadanian, M., Cramer, J. W., Audia, J. E., Nissen, J. S., Bales, K. R., Paul, S. M., DeMattos, R. B., and Holtzman, D. M. (2003) In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23

13. Cirrito, J. R., Kang, J.-E., Lee, J., Stewart, F. R., Verges, D. K., Silverio, L. M., Bu, G., Mennerick, S., and Holtzman, D. M. (2008) Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid- In Vivo. *Neuron* 58, 42-51

14. Yamamoto, K., Tanej, Z. I., Hashimoto, T., Wakabayashi, T., Okuno, H., Naka, Y., Yizhar, O., Fenno, L. E., Fukayama, M., Bito, H., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., Deisseroth, K., and Iwatsubo, T. (2015) Chronic optogenetic activation augments a pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Rep* 11, 859-865

15. Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., Schoepp, D. D., Paul, S. M., Mennerick, S., and Holtzman, D. M. (2005) Synaptic Activity Regulates Interstitial Fluid Amyloid- Levels In Vivo. *Neuron* 48, 913-922

16. Bakker, A., Krauss, Gregory L., Albert, Marilyn S., Speck, Caroline L., Jones, Lauren R., Stark, Craig E., Yassa, Michael A., Bassett, Susan S., Shelton, Amy L., and Gallagher, M. (2012) Reduction of Hippocampal Hyperactivity Improves Cognition in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuron* 74, 467-474

17. Bakker, A., Albert, M. S., Krauss, G., Speck, C. L., and Gallagher, M. (2015) Response of the medial temporal lobe network in amnesic mild cognitive impairment to therapeutic intervention assessed by fMRI and memory task performance. *NeuroImage: Clinical* 7, 688-698

18. Koh, M. T., Haberman, R. P., Foti, S., McCown, T. J., and Gallagher, M. (2010) Treatment Strategies Targeting Excess Hippocampal Activity Benefit Aged Rats with Cognitive Impairment. *Neuropsychopharmacology* 35, 1016-1025

19. Vossel, K., Ranasinghe, K. G., Beagle, A. J., La, A., Ah Pook, K., Castro, M., Mizuiri, D., Honma, S. M., Venkateswaran, N., Koestler, M., Zhang, W., Mucke, L., Howell, M. J., Possin, K. L., Kramer, J. H., Boxer, A. L., Miller, B. L., Nagarajan, S. S., and Kirsch, H. E. (2021) Effect of Levetiracetam on Cognition in Patients With Alzheimer Disease With and Without Epileptiform Activity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurology* 78, 1345-1354

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 葛谷聡, 宮本将和, 上田紗希帆	4. 巻 36
2. 論文標題 アルツハイマー病の病態におけるてんかん併存の意義	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dementia Japan : 日本認知症学会誌	6. 最初と最後の頁 25-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Sakiho Ueda
2. 発表標題 Therapeutic potential for the regulation of neuronal hyperexcitability in AD
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakiho Ueda
2. 発表標題 A single administration of Perampanel reduces ISF beta-amyloid levels in the hippocampus of J20 mice
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakiho Ueda
2. 発表標題 A single oral administration of PER decreased ISF A $\beta$ levels in APP mouse
3. 学会等名 第63回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------