

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24730642

研究課題名(和文) 抗認知症薬併用療法の行動学的基礎研究

研究課題名(英文) Behavioral study on the combination therapy of anti-dementia drug

研究代表者

柳井 修一 (Yanai, Shuichi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：60469070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、PDE3阻害剤シロスタゾールの長期投与が老齢C57BL/6Jマウスおよび老化促進マウス(SAMP8)の記憶・学習機能を若齢マウスと同程度にまで改善することを明らかにした。この成果を受け、シロスタゾールを「軽度認知障害治療薬」として適用拡大するための治験が平成27年に開始された。また、単独では効果を持たない濃度のシロスタゾールとドネペジルを組み合わせることにより、老齢C57BL/6Jマウスの記憶・学習機能が向上することを明らかにした。この結果は、他の疾患で有効性が確認されている多剤併用療法が記憶障害や認知症の治療にも有効である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we revealed that the PDE3 inhibitor cilostazol improved the impaired learning and memory function in aged C57BL/6J mice and senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) to the same extent as young mice. Based on these findings, a clinical trial is now underway in Japan to gain approval for the use of cilostazol in treating mild cognitive impairment. In addition, sub-effective dose of cilostazol and donepezil in combination enhances learning and memory function in aged C57BL/6J mice. These results suggest that the combination therapy comprising two or more drugs may offer a new pharmacological approach for treating cognitive disorders, as the combination therapy demonstrated to be an effective strategy for treating some types of diseases.

研究分野：行動科学

キーワード：記憶・学習 老化 多剤併用療法 シロスタゾール ドネペジル

1. 研究開始当初の背景

世界有数の超高齢化社会となった我が国では今後も更なる高齢化が予想されており、加齢に伴って低下した記憶機能を改善すること、また記憶機能の低下が始まる時期を遅延させることは極めて重要かつ喫緊の課題である。現在、認知機能低下に対する抜本的な治療方法は存在せず、非侵襲かつ簡便な投薬による薬理的措置が主要な介入手段である。国内で用いられている抗認知症薬は4種と選択肢が限られており、またこれら抗認知症薬の主たる作用部位は同一（細胞外）である。他の疾患では作用点及び作用機序の異なる薬物を組み合わせた治療（多剤併用）が有効であることが知られているが、記憶障害や認知症の治療にこの戦略は用いられていない。

2. 研究の目的

(1) 申請者は新たな抗認知症薬の候補として、既に抗血小板薬として処方されているシロスタゾール（プレタール）に着目した。細胞外で作用する既存の抗認知症薬とは異なり、phosphodiesterase (PDE) 3 阻害剤のシロスタゾールは細胞内で作用する。細胞内でのcAMP-PKA-CREB シグナル伝達系を増強するシロスタゾールは記憶改善効果が期待されるにも関わらず、記憶・学習機能との関係性を検討した研究はほとんどない。そのため、シロスタゾールの単独投与が記憶改善効果を有するかについて、老化モデル動物を用いて検討することを目的とした。

(2) 記憶障害や認知症以外の疾患では、作用点及び作用機序の異なる薬物を組み合わせた多剤併用療法が有効であることが知られている。しかしながら、既存の抗認知症薬は作用部位が同一であることから、記憶障害や認知症の治療では多剤併用戦略は用いられていない。従って、細胞外で作用するドネペジルと細胞内で作用するシロスタゾールの2薬剤を用い、他の疾病治療に用いられている多剤併用が記憶障害、認知症の治療に有効かどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトの老化現象は個人差が大きく、多様な老化の様態及び進行を呈する。また、老化に伴う記憶障害の程度も、軽度（もの忘れ）から重度（アルツハイマー病など）まで広範にわたる。このような老化現象の特徴を考慮し、老化の様態及び速度が異なる2系統の被験体を用い、シロスタゾールとドネペジルの単独投与、また両剤併用下での各種行動を盲検法により評価することで、抗認知症薬併用による記憶障害改善効果を検討した。

さらに、SAM (senescent accelerated mice) マウスでは、免疫組織化学的染色、タンパク質の定量、PET を用いた脳内糖代謝の測定など、複数の観点から記憶改善効果の神

経基盤を詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) 複数濃度のシロスタゾールを長期混餌投与した23ヶ月齢のC57BL/6Jマウスを用い、高速液体クロマトグラフィによる血中シロスタゾール濃度の測定を行った。投与開始から1ヶ月程度で血中シロスタゾール濃度が安定することが明らかとなった。また、1.5%シロスタゾールでは日中のシロスタゾール濃度が常に有効血中濃度を超過すること、0.3%シロスタゾールでは常時有効血中濃度を下回ることを明らかにした。

(2) 0.3%もしくは1.5%シロスタゾールを10ヶ月間混餌投与した23ヶ月齢の老齢C57BL/6Jマウスでは、物体探索課題および水迷路課題においてシロスタゾールの用量依存的な記憶・学習機能改善効果が認められた。特に、1.5%シロスタゾール投与の老齢マウスでは、モリス水迷路課題のプロープテストにおいて若齢マウスと同程度にまで記憶・学習機能が改善されることを明らかにした（図1）。

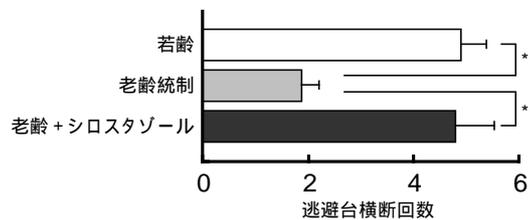


図 1. シロスタゾールによる認知機能改善 (C57BL/6J マウス)

(3) 0.3%シロスタゾール（混餌投与）と0.3mg/kg ドネペジル（飲水投与）を3ヶ月間投与した24ヶ月齢の老齢C57BL/6Jマウスにおいて、単独では効果を持たない薬剤を組み合わせ投与したマウスではモリス水迷路プロープテストの成績が有意に向上することを明らかにした。（図2）

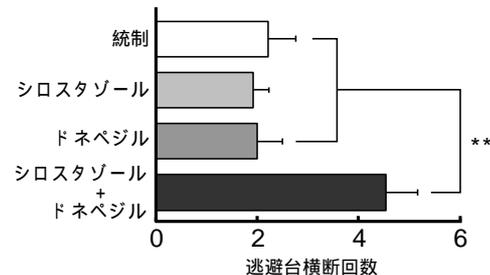


図 2. 多剤併用による認知機能改善 (C57BL/6J マウス)

(4) 8ヶ月齢のSAMマウスを対象として、高速液体クロマトグラフィによる血中シロスタゾール濃度の測定を行った。シロスタゾールの投与方法は混餌（慢性投与）もしくは経口ゾンデ（急性投与）であった。慢性投与の血中動態は、(1)で述べたC57BL/6Jのそれと

同様であった。また急性投与では、シロスタゾールの濃度依存かつ投与からの時間依存的に血中シロスタゾール濃度が低下することを明らかにした。

(5) これまでの先行研究において、SAM マウスは 8 ヶ月齢前後で記憶・学習障害を示すことが報告されていた。本研究では、SAM マウスは従来よりも早い 4 ヶ月齢で種々の学習障害、情動障害を呈することを明らかにした。また、SAM マウスではほとんど報告がされていない恐怖条件づけ課題について詳細な条件検討を行い、恐怖条件づけ学習が成立するプロトコルを見いだした。

(6) シロスタゾール投与が 8 ヶ月齢 SAM マウスの恐怖条件づけ課題遂行に及ぼす効果を検討した。

30mg/kg もしくは 100mg/kg のシロスタゾールを急性投与した SAM マウスでは、統制群とシロスタゾール投与 2 群の成績が同程度であり、シロスタゾールが記憶機能に及ぼす効果は認められなかった。

0.3% もしくは 1.5% シロスタゾールを 3 ヶ月間慢性投与した SAM マウスにおいて、1.5% シロスタゾール投与マウスの記憶機能が通常老化マウスと同程度にまで改善されることを明らかにした (図 3)。図中の SAM P (senescent accelerated mice prone) 8 は老化促進マウスを、SAM R (senescent accelerated mice resistant) 1 は通常老化マウスを示す。

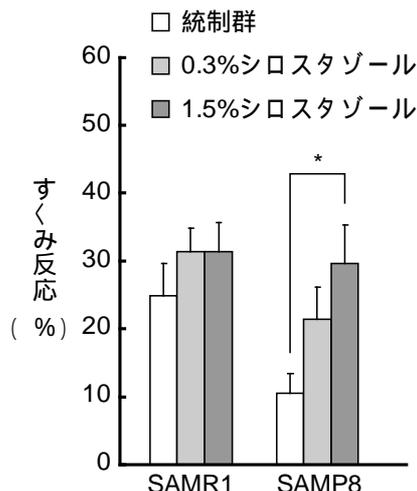


図 3. シロスタゾールによる記憶機能改善 (SAM マウス)

(7) シロスタゾールの慢性投与が有する記憶改善効果について、SAM マウスを用いてその神経基盤を詳細に検討した。

恐怖条件づけ課題を経験した SAM マウスの脳サンプルを用い、リン酸化 CREB や cfos、DCX などの各種抗体を用いた免疫染

色および定量化を行った。結果、海馬歯状回のみにおいてシロスタゾール投与マウスのリン酸化 CREB 陽性細胞数が有意に増加していることが明らかになった。

[¹⁸F]fluorodeoxyglucose (¹⁸F-FDG) を投与下のマウスを用いて小動物用陽電子放出断層撮影 (positron emission tomography, PET) を行い、脳内糖代謝を検討した。結果、SAMR1 と比較して SAMP8 のグルコース取り込みが減少していること、また SAMP8 においてグルコースの取り込みがシロスタゾールの用量依存的に減少することが明らかになった (図 4)。

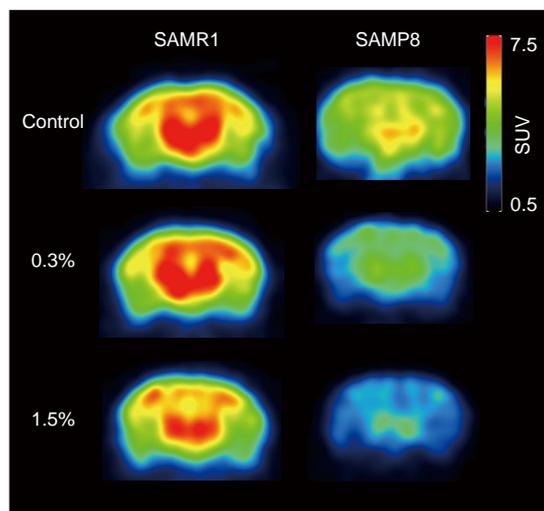


図 4. シロスタゾールによる脳内グルコース取り込みの減少 (SAM マウス)

血液脳関門 (blood brain barrier, BBB) を構成する tight junction について、主要タンパク質である Occludin と ZO-1 を Western blotting により定量化を行った。結果、いずれのタンパク質もシロスタゾールの用量依存的に増加していることが明らかになった。脳内糖代謝の結果 (6-) とあわせ、シロスタゾールが老化に伴う血管の脆弱性を改善していることを示している。

(8) 本研究で得られたシロスタゾール単独投与の成果 (2 および 4) を受け、平成 27 年度に「軽度認知障害治療薬」としてシロスタゾールの治験が開始された。

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 11 件)

1. Yanai S, Endo S. 2016 Data on the optimization of behavioral tasks for senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). Data in Brief, in press. 査読有り

DOI:10.1016/j.dib.2016.05.044

2. Toyohara J, Sakata M, Hatano K, Yanai S, Endo S, Ishibashi K, Wagatsuma K, Ishii K, Ishiwata K. 2016 Preclinical and first-in-man studies of [11C]CB184 for imaging the 18-kDa translocator protein by positron emission tomography. *Annals of Nuclear Medicine*, in press, 査読有り

3. Yanai S, Endo S. 2016 Early onset of behavioral alterations in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *Behavioural Brain Research*, 308, 187-195, 査読有り
DOI: 10.1016/j.bbr.2016.04.026.

4. Shimizu N, Wood S, Kushihiro K, Yanai S, Perachio A, Makishima T. 2015 Dynamic characteristics of otolith ocular response during counter rotation about dual yaw axes in mice. *Neuroscience*, 285, 204-214, 査読有り
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.022

5. 柳井修一・遠藤昌吾 2015 巨大地震が飼育動物へ及ぼす影響-東日本大震災が引き起こしたマウスの行動変化-. *LABIO21*, 59, 20-24, 査読有り
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020325286>

6. 柳井修一 2014 ドラッグ・リポジショニングによる認知症治療薬のスクリーニング. *基礎老化研究*, 38, 31-34, 査読有り
<http://jglobal.jst.go.jp/public/2009042/2/201402259598381530>

7. Matsui T, Yanai S, Shimokura R, & Hosoi H. 2014 Evaluation of a short reverberant sound field using syllable intelligibility and listening difficulty under multitalker babble. *Acoustical Science and Technology*, 35, 279-281, 査読有り
DOI: 10.1250/ast.35.279

8. Yanai S, Semba Y, & Endo S. 2014 The effect of diazepam on mouse PTSD-like behaviors induced by the 2011 Tohoku earthquake. *Behavioral Science Research (行動科学)*, 53, 27-36, 査読有り
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020244478>

9. Yanai S, Semba Y, Ito H, & Endo S. 2014 Cilostazol improves hippocampus-dependent long-term memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 2681-2693, 査読有り
DOI: 10.1007/s00213-014-3442-4

10. Okayasu T, Nishimura T, Yamashita A,

Saito O, Fukuda F, Yanai S, Hosoi H. 2013 Human ultrasonic hearing is induced by a direct ultrasonic stimulation of the cochlea. *Neuroscience Letters*, 539, 71-76, 査読有り
doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.040.

11. Yanai S, Semba Y, & Endo S. 2012 Remarkable Changes in Behavior and Physiology of Laboratory Mice after the Massive 2011 Tohoku Earthquake in Japan. *PLOS ONE*, 7, e44475, 査読有り
doi: 10.1371/journal.pone.0044475.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. 柳井修一・新崎智子・遠藤昌吾．行動解析を用いたホスホジエステラーゼ3阻害剤シロスタゾールの記憶改善効果の評価，首都大学東京バイオコンファレンス 2015，2015年11月6日，首都大学東京（東京都八王子市）

2. 柳井修一．機能性食品によるアンチエイジング戦略，日本心理学会第79回大会，2015年9月22日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市中）

3. Yanai S, Kojima K, Arasaki T & Endo S. Long-term administration of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, prevents memory decline in aged mice models. 第38回日本神経科学大会，2015年7月29日，神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

4. 柳井修一・新崎智子・遠藤昌吾．老化に伴う認知機能低下に対するホスホジエステラーゼ3阻害剤 cilostazol の効果，第38回日本基礎老化学会大会，2015年6月14日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

5. Yanai S, Kojima K, Arasaki T & Endo S. Maintenance of memory functions by chronic administration of cilostazol, a phosphodiesterase 3 inhibitor, in aged mice models. *Neuroscience 2014*, Nov 16 2014, Washington, DC (U.S.A.)

6. 柳井修一・小島開・新崎智子・遠藤昌吾．PDE3 阻害剤シロスタゾールによる老化促進モデルマウスの記憶障害改善効果，第37回日本神経科学大会，第37回日本神経科学大会，2014年9月13日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

7. 柳井修一．ドラッグ・リポジショニングを用いた認知症治療薬の創製-シンポジウム：人間の生涯発達の理解を目指す生理心理学研究，日本心理学会第78回大会，2014年9月10日，同志社大学（京都府京都市）

8. 柳井修一・小島開・新崎智子・遠藤昌吾．SAMP8 マウスにおける ホスホジエステラーゼ阻害剤 cilostazol の 恐怖記憶改善効果，第 37 回日本基礎老化学会大会，2014 年 6 月 26 日，あいち健康プラザ 健康科学館（愛知県知多郡）

9. 柳井修一・仙葉悠紀・遠藤昌吾．2011 年東日本大震災に伴うマウス行動変化に及ぼすジアゼパムの効果，日本行動科学学会第 30 回ウィンターカンファレンス，2014 年 3 月 20 日，ことひら温泉 琴参閣（香川県仲多度郡）

10. 柳井修一・仙葉悠紀・遠藤昌吾．若齢マウスにおける PDE3 阻害剤 Cilostazol の記憶改善効果，Neuro2013，2013 年 6 月 21 日，国立京都国際会館（京都府京都市）

11. 柳井修一・遠藤昌吾．ホスホジエステラーゼ 3 阻害剤 Cilostazol が若齢マウスの記憶・学習能力に及ぼす効果，第 36 回日本基礎老化学会大会，2013 年 6 月 6 日，大阪大学中之島センター（大阪府大阪市）

12. Oka M, Ishino S, Yanai S, Okaichi H, Hata T. Effect of NMDA receptor blockade on acquisition of memory for duration in rats. Neuroscience 2012, Dec 17 2012, New Orleans, LA (U.S.A.)

13. 柳井修一・仙葉悠紀・遠藤昌吾．2011 年東日本大震災に伴うマウスの行動変容，第 35 回神経科学大会，2012 年 9 月 18 日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

14. 柳井修一．ヒト PTSD モデルとしての震災経験マウス，日本心理学会第 76 回大会，2012 年 9 月 11 日，専修大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

15. 柳井修一・遠藤昌吾．4 ヶ月齢 SAM-P8 マウスにおける記憶・学習障害，日本基礎老化学会第 35 回大会，2012 年 7 月 26 日，東邦大学習志野キャンパス（千葉県船橋市）

〔図書〕(計 4 件)

1. Yanai S. Endo S. 2015 Knowledge of Signal Transduction Provides an Approach to Attacking Memory Decline. In: Nozomu Mori & Inhee Mook-Jung (Eds) Aging mechanisms: Longevity, metabolism, and brain aging, 257-274, Springer, 査読有り DOI: 10.1007/978-4-431-55763-0_15

2. 高瀬堅吉・柳井修一・山口哲夫（訳、監訳）2015 ラットの行動解析ハンドブック (WhishawIQ, Kolb B. The behavior of the laboratory rats: A handbook with tests. Oxford University Press), 全 435 ページ,

西村書店

3. 高瀬堅吉・柳井修一（訳、監訳）2012 トランスジェニック・ノックアウトマウスの行動解析 (CrawleyJN. What 's wrong with my mouse? Wiley publishing), 全 407 ページ, 西村書店

〔産業財産権〕
出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳井 修一 (YANAI, Shuichi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員
研究者番号：60469070

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

遠藤 昌吾 (Endo, Shogo)

新崎 智子 (Arasaki, Tomoko)