

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老化に伴う認知症に有効な神経保護薬の臨床応用と
その評価法の確立に関する研究

(H18-長寿・一般-026)

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 丸山 和佳子

平成19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

老化に伴う認知症に有効な神経保護薬の臨床応用とその評価法の確立

----- 1

丸山和佳子

II. 分担研究報告

1. ニホンザルを用いた神経保護薬の臨床評価法の確立

----- 5

丸山和佳子

2. 物忘れ外来受診者の実態と軽度認知症の脳機能画像の検討

----- 12

新畑 豊

3. ニホンザルにおける rasagiline と性ステロイドとの相互作用の検討

----- 15

鈴木樹理

4. アルツハイマー病モデルマウスにおける疎水性ジペプチド Leu-Ile
の効果について----- 17

新田淳美

5. 神経保護薬による細胞死の制御：ミトコンドリアにおける結合タ
ンパクの同定と作用機序----- 27

直井信

6. 神経保護薬の作用点(ターゲットプロテイン)の解明に関する研究

----- 36

辻本賀英

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 42

I V. 研究成果の刊行物・別刷

----- 47

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

老化に伴う認知症に有効な神経保護薬の臨床応用とその評価法の確立

主任研究者 丸山和佳子 国立長寿医療センター 研究所 老年病研究部長

研究要旨：老化に伴う認知症を治療に有効な、経口投与薬を開発するための研究を行った。脳内移行可能な低分子化合物が、脳細胞に対し転写因子の活性を制御し、ニホンザルの脳内で神経栄養因子を増加させることを証明した。神経保護薬のターゲット分子としてA型モノアミン酸化酵素を見だし、ミトコンドリアの細胞死シグナルの調節機能について新たな知見を得た。長寿医療センター中部病院の物忘れ外来を受診した認知症患者について、その内訳を検討し、将来の臨床試験の基礎となるデータを得た

丸山和佳子・国立長寿医療センター研究所 老年病研究部 部長
新畑 豊・国立長寿医療センター 先端医療部 第二アルツハイマー型痴呆科 医長
鈴木樹理・京都大学霊長類研究所 人類進化モデル研究センター 助教授
新田淳美・名古屋大学大学院 医学研究科 医療薬学・医学部 附属病院薬剤部 助教授
直井信・財団法人国際岐阜バイオ研究所 脳科学研究部門 部長
辻本賀英・大阪大学大学院 医学研究科 細胞死制御研究部門 教授

A. 研究目的

少子高齢化社会が急速に進む日本において、老化に伴う認知症の予防と治療は緊急の課題である。老化に伴う神経変性疾患、特にアルツハイマー病とパーキンソン病は加齢(老化)に従い発症率が増加し、高次脳機能障害(認知症)を引き起こす。認知症は老年者個人の生活の質を低下させるだけでなく介護に要する経済的、人的負担は超高齢化社会を迎える日本にとってまさに緊急に解決すべき問題である。わが国では神経変性疾患の病因については多くの研究が行われ、成果をあげてきた。しかし、その成果を実際に臨床に応用し、上記の問題を解決す

る方策は未だ確立していない。申請者らは経口投与可能で安全性の高い神経保護薬の候補として propargylamine 化合物 (PA) に注目し、これまで厚生労働科学研究費の補助により研究を行ってきた。PA は B 型モノアミン酸化酵素 (MAO) の阻害剤として開発され、その一部 (selegiline および rasagiline) は既に酵素阻害薬として欧米でパーキンソン病患者に使用されているため安全性に問題はない。一方、申請者のグループは PA には酵素阻害に必要な濃度より低用量で(のみ)神経保護作用があることを見いだした。本研究課題の目的は 1) PA による神経保護効果を霊長類 (ニホンザル) で検証し、ヒト治験を計画するために必要な情報 (至適投与量、投与方法等) を得る。2) 1) に引き続き PA の治療効果を客観的に評価するためのバイオマーカーを検索する。3) 神経保護薬としての PA のターゲット分子を分子生物学的に解明する。ことである。

B. 研究方法および結果

各群 5頭の成熟オスニホンザル (体重8-10 kg) に対し、rasagilineの4週間連日筋肉内投与を行い、投与前後のCSF中神経栄養因子量はELISA法にて測定した。さらに5頭のニホンザルに対し、rasagilineの16週間連日投与を行い有効性と安全性の検討を行った。その結果、0.25 mg/kg/day rasagiline

によりCSF中の神経栄養因子濃度は最も増加が顕著となり、16週間にわたり濃度増加は持続した。

GDNFは、胎児中胚葉由来ドーパミン作動性神経を始め運動神経細胞、海馬神経細胞、大脳皮質神経細胞などに対して保護作用を持ち、パーキンソン病や脊髄損傷の治療薬としての応用も期待されている。GDNFは薬物依存を抑制するが報告されているが、血液・脳関門の通過や血液中で分解・代謝されることから、GDNF自身を薬物依存治療薬として用いることは難しいと考えられる。脳内移行可能な低分子化合物によりGDNFを増加させることで、アルツハイマー病モデルマウスの学習記憶を改善しタンパクニトロ化を抑制することを証明した。

アポトーシスとネクローシスに関与することが示唆されているミトコンドリア膜透過性遷移現象

(mitochondria membrane permeability transition: MPT) と軸索変性を呈するヒト遺伝性の神経変性疾患のマウスモデルの解析により、神経細胞が特異的に細胞死をきたす老年性認知症の分子メカニズムを検討した。その結果MPTに必須の分子であるCyclophilin Dに結合する分子の存在を確認した。

神経保護活性をもつPAはA型モノアミン酸化酵素 (MAO-A) の酵素活性に関わる部位とは異なるsiteに結合することで、

細胞死シグナル、特にMPTの調節することを見いだした。その調節作用の機序を酸化ストレス、神経毒等によるアポトーシス細胞モデルをもちい検討した。その結果、細胞の酸化還元状態により細胞死シグナルの活性化が調節されている事、さらにRasagiline, N-Propargylamine等の神経保護薬はこの細胞内の酸化還元状態を安定化することにより、細胞死機構を制御する事を見いだした。以上より上記の酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、神経毒等が神経細胞に細胞死をもたらす共通の機序があり、これに関わる細胞内シグナルを制御する事で広く細胞死を制御できる事が示唆された。

神経保護薬の臨床応用準備のため物忘れ外来受診者の実態調査を行った。平成18年度の受診者の男女比は約1対2で女性患者が多かった。受診者の平均年齢は77.1±8.1歳で60才未満2.5%、60代18.6%、70代33.9%、80代40.7%、90代4.2%であり、70歳代～80歳代が大部分を占めている。病名別内訳として、アルツハイマー病が圧倒的に多く全体の66.9%をしめた。アルツハイマー病の中では軽度、中等度患者が多くその約80%となっている。ついで軽度認知障害(MCI)が多く15.9%であり、レビー小体小体型認知症5.1%、前頭側頭型認知症、脳血管性認知症、正常者が各々4.2%であった。神経内科医師と精神科医師の外来の間に診断内訳の大きな差は見られなかった。これら

の患者について脳血流SPECT、脳糖代謝PETなどの脳機能画像診断を行い、データを蓄積した。

(倫理面への配慮)

動物を使った研究については各施設の動物実験委員会の許可の基に動物愛護上の配慮をもって実験を行った。本年度ヒト認知症患者に関するデータ収集は医療行為の枠内で行われており、倫理上の問題は無い。しかしながら患者データの取り扱いについては細心の注意を払い、個人情報漏えい等が起こらないようにした。

C. 考察

本年度の研究により、PA 特にrasagilineが培養神経系細胞だけでなく霊長類(ニホンザル)のCSF中、そしておそらくは中枢神経内の神経栄養因子(GDNFおよびBDNF)を増加させることを世界で初めて見いだした。さらに、脳内移行が良好な低分子化合物が脳内GDNFを増加させ、アルツハイマー病モデルマウスの学習行動が改善することを証明した。以上の結果はPAが神経保護に関わるタンパク質、特に神経栄養因子を脳内で誘導することにより老年性認知症の治療あるいは進行抑制に有効であることを支持している。

さらに、PAのターゲット分子がMAO-Aであることが示されたことは、神経変性のメカニズム解明とその防御法開

発に大きな意味を持つ。

認知症の原因の頻度は調査母集団により大きく異なるが、我が国ではアルツハイマー病の割合が増加しつつあるとされながらも認知症全体の 50-60%程度とされる。国立長寿医療センター物忘れ外来受診者においてはアルツハイマー病の割合が高いことが示された。これは、外来通院が可能な状態の患者に限られ、さらに”物忘れ”に特化した外来の特殊性があるものと考えられる。

D. 結論

PA である rasagiline は、既に欧米で 2005-6 年から酵素阻害薬としてパーキンソン病患者に使用が開始されている。本薬剤が実験レベルで神経保護効果を示すことは我々の研究グループを含め多数の報告があるが、その機序は明らかではなかった。本研究班の成果として、rasagiline がヒト脳内の神経栄養因子を増加させる可能性が示されたことは2つの点で大きな意味をもつ。すなわち1) 経口投与可能な低分子化合物は脳内の遺伝子発現を制御することにより、遺伝子導入と同様な神経細胞死抑制作用が安全、安価に実現できること、2) CSF 中の分泌性因子（この場合は神経栄養因子）の測定により、薬剤の効果が客観的、定量的のみならず迅速に評価できること、を示した点である。また、PA はアルツハイマー病における amyloid beta protein

などの疾患特異的なターゲット分子にはたらくのではなく、神経細胞のストレス耐性を高めるとこと神経細胞死を抑制するため老化に伴う認知症、認知障害を全般的に防御することが期待される。今後、PA による神経細胞死抑制効果を認知症患者で証明するための準備は整えられつつあり、早期の治験開始のための準備が進められている。

E. 健康危険情報

なし

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

ニホンザルを用いた神経保護薬の臨床評価法の確立

主任研究者 丸山和佳子 国立長寿医療センター 研究所 老年病研究部長

研究協力者：永井雅代、大田久美子

国立長寿医療センター 研究所 老年病研究部 リサーチレジデント

研究要旨：

老化に伴う認知症の治療のため、経口投与可能な神経保護薬を開発するための研究を行った。リーディング化合物として既にB型モノアミン酸化酵素の阻害剤としてヒトへの安全性が確認されている propargylamine 化合物(PA)について研究を行った。PAは酵素阻害作用とは独立した神経保護作用をもつことが明らかとなった。その機序はストレス関連転写因子の活性化を介して神経保護に働くタンパク質の発現レベルを増加させ、細胞死のシグナルを抑制することであることが示された。PAの中でも最も神経保護効果が強かった rasagiline をオス成熟ニホンザルに投与し、脳内での神経保護タンパク質誘導作用を脳脊髄液に漏出した神経栄養因子レベルで評価した。その結果、0.025mg/kg/day の rasagiline 連日投与は有意に神経栄養因子を増加させることが示された。

A. 研究目的

本研究課題の目的は、安全で安価な認知症の治療薬として、経口投与可能な神経保護薬を開発することである。高齢者の生活の質(quality of life, QOL)を低下させる原因として現在最も重要なものは認知障害である。老化に伴う認知障害の原因となる疾患としては、アルツハイマー病、レビー小体病、パーキンソン病などの神経変性疾患や血管障害があり、脳神経細胞死が起こっている。Propargylamine 化合物(PA)の中には神経変性や虚血による脳神経細胞死の実験モデルに対し神経保護作用をもつものが存在する。しかしながらその作用機序は明らかでなかった。主任研究者らのグループは世界に先駆けて PA がストレス反応性の転写因子を活性化し、神経栄養因子である glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) や brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、抗アポトーシス分子である BCL-2、抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD) などのタンパク質を誘導する。認知障害の原因は異なってもそのプロセスには共通の細胞内メカニズムが関与していると考えられる。PA によって誘導されたタンパク質

群は細胞死シグナルを抑制したり酸化ストレスを低下させることで、神経細胞死を防御すると考えられる。PA の中でも rasagiline は欧米 2005-6 年度より B 型モノアミン酸化酵素阻害剤としてパーキンソン病に認可されている。従って本薬剤の安全性は担保されており、早期に日本で認知症患者に対する治験が可能と考えられる。一方、認知症に対する治療効果を臨床的に判定する基準として、臨床症状と画像診断が用いられてきたが、これらの判定は定量性、鋭敏さにおいて十分とは言えず、また判定者による誤差、患者の個体差が存在する。有意差を検討するためには数百~千人規模で 5 年以上の多施設共同研究が必要である。神経保護薬の治療効果をヒトで判定するためのバイオマーカーを開発することは重要である。本年度はニホンザルに対し rasagiline を投与し、その効果を判定するための方法について検討を行った。

B. 研究方法

神経栄養因子(BDNF, GDNF)は分泌因子であり、脳脊髄液(CSF)中へ漏出したこれら因子の濃度は、脳内における合成量の変化を反映すると考えられる。ヒト治験において rasagiline 投与前後の

CSF中神経栄養因子を測定することで、薬効を定量的、客観的に評価できる可能性について検討を行った。

1) 各群5頭の成熟オスニホンザル(体重8-10 kg)に対し、rasagiline (0, 0.1, 0.25, 2 mg/day)の4週間連日筋肉内投与を行い、投与前、および1、2、3、4週投与後にCSFを採取した。CSF中神経栄養因子量はELISA法にて測定した。

2) 1)で最も神経栄養因子増加作用が強く認められた rasagiline の量は 0.25 mg/day であった。そのためさらに5頭のオス成熟ニホンザルに対し、16週間の連日投与を行い有効性と安全性の検討を行った。また、神経栄養因子は脳血液関門を超えて血中に流出しないとされるが、血中の rasagiline が末梢神経に働き神経栄養因子を増加させる可能性があるため血清中の神経栄養因子の定量も行った。血清中の BDNF、GDNF 測定は困難であったが溶血を避けることと、ELISA plate の洗浄回数を増やすことにより background の noise を減少させることで測定を可能とすることができた。

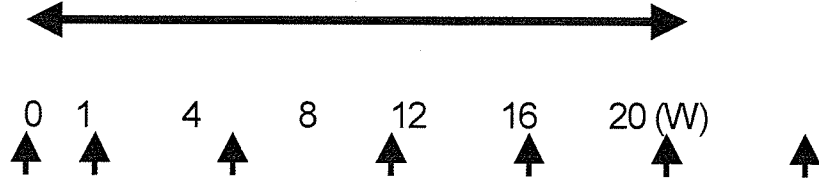
C. 研究結果

1) in vitroの実験結果と同じく、rasagilineによるニホンザルCSF中のGDNF、BDNF増加作用は0.25 mg/day (0.025 mg/kg/day)で最大となり、それより高用

量でも低用量でも神経栄養因子の増加作用は弱くなった。

2) rasagiline による CSF 中神経栄養因子増加作用は16週間連日投与でも持続した。脳脊髄液と血中との神経栄養因子濃度には有意な相関は認められなかった。ニホンザルに対するrasagiline投与実験の全てで重篤な副作用は認められなかった。

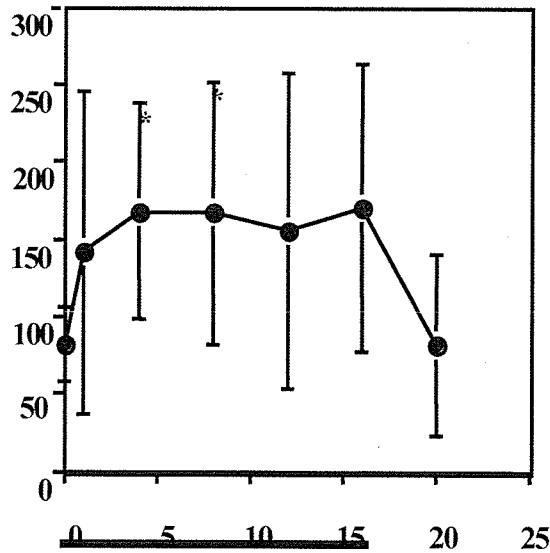
i. m. injection of 0.25 mg of rasagiline to male Japanese monkey



CSF and serum sampling

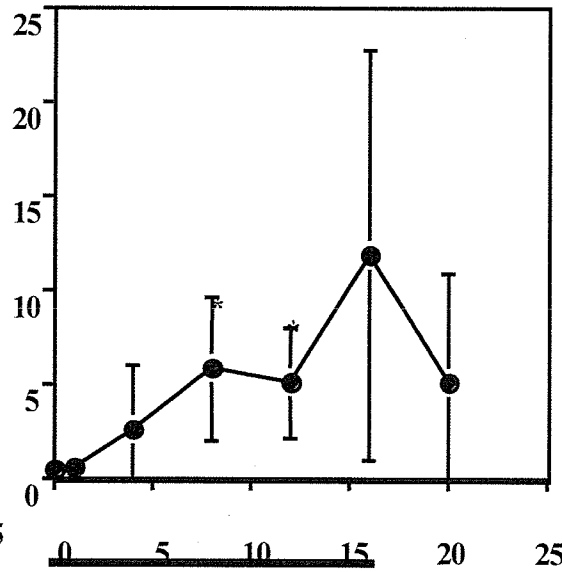
Analysis of neurotrophic factors by EIA

GDNF (pg/ml)



Rasagiline(0.25mg/day)

BDNF (pg/ml)



Weeks

Rasagiline (0.25mg/day)

Weeks

D. 考察

本年度の研究により、rasagiline が霊長類（ニホンザル）の CSF 中、そしておそらくは脳内の神経栄養因子を増加させることが証明された。このことは培養神経系細胞で認められた rasagiline による神経保護効果が in vivo でも再現できることを支持している。さらに、rasagiline 投与量と CSF 中神経栄養因子増加量の相関から、本薬剤の効果は投与量に対し bell-shaped pattern を示し、ヒトへの臨床試験にあたっては至適投与量の決定が不可欠と考えられた。CSF 中の神経栄養因子濃度は rasagiline の効果を判定するために有用なバイオマーカーと考えられた。しかしながら一般神経内科の外来で定期的に CSF を採取することは（可能ではあるが）患者と医療従事者双方の負担となるため、血清で測定可能なバイオマーカーを開発することが望ましい。今後、研究を発展させていきたい。

E. 結論

PA である rasagiline は脳内の神経保護タンパク質を増加させることにより、認知症の進行を抑制し、あるいは症状を改善する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Mizoguchi K, Sun N, Jin XL, Kase Y, Takeda S, Maruyama W, Tabira T.

Saikokaryukotsuboreito, a herbal medicine, prevents chronic stress-induced dysfunction of glucocorticoid negative feedback system in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Jan;86(1):55-61.

Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M., Yanagisawa K., A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the Arctic mutation. *J Biol Chem.* 2007 Jan 26;282(4):2646-55.

Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Akao Y, Riederer P, Naoi M. The effect of neuromelanin on the proteasome activity in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Neural Transm Suppl.* 2006; (70):125-32.

Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Yi H, Akao Y, Tribl F, Gerlach M, Osawa T, Riederer P, Naoi M. Neuromelanin induces oxidative stress in mitochondria through release of iron: mechanism behind the inhibition of 26S proteasome. *J Neural Transm.* 2006 May;113(5):633-44.

Yi H, Akao Y, Maruyama W, Chen K, Shih J, Naoi M. Type A monoamine oxidase is the target of an endogenous dopaminergic

neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, leading to apoptosis in SH-SY5Y cells.

J Neurochem. 2006 Jan;96(2):541-9.

Matsumoto K, Akao Y, Yi H, Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Naoi M. Overexpression of amyloid precursor protein induces susceptibility to oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

J Neural Transm. 2006 Feb;113(2):125-35.

Yi H, Maruyama W, Akao Y, Takahashi T, Iwasa K, Youdim MB, Naoi M.

N-Propargylamine protects SH-SY5Y cells from apoptosis induced by an endogenous neurotoxin, N-methyl(R)salsolinol, through stabilization of mitochondrial membrane and induction of anti-apoptotic Bcl-2. *J Neural Transm.* 2006 Jan;113(1):21-32.

2. 学会発表

Maruyama W. The mechanism underlying the selective cell death of dopamine neurons in Parkinson's disease. First Japanese German Workshop Research in Neurodegenerative diseases. March 23-25, 2006 Tübingen, Germany

Maruyama W, Nitta A, Naoi M. Rasagiline, a neuroprotective drug candidate, increases neurotrophic factors in vitro and in vivo. 第49回日本神経化学大会、2006年9月14日-16日、名古屋

丸山和佳子、向蘭、松浦彰、津田玲生、
大澤俊彦

クルクミン代謝物による寿命関連遺伝子
制御の分子メカニズム

日本基礎老化学会秋期シンポジウム

食品による寿命制御の分子機構

2006年11月11日、名古屋

丹羽利夫 epigallocatechin gallate の
amyloid beta タンパクの神経細胞毒性と
重合に及ぼす影響

日本フードファクター学会 2006年
11月20日犬山

永井雅代 多価不飽和脂肪酸によるタン
パク質凝集体の形成とその構造解析

日本フードファクター学会 2006年
11月21日犬山

W. Maruyama, F. Ando, M. Nagai, T. Niwa,
T. Osawa, The synergistic effect of PUFA
and polyphenol to protect the
neurodegeneration in ageing

International Kohoda Foundatrion

2006 Nov. 21th Inuyama

X Lan, A. Matsuura, L. Tsuda, W. Maruyama,
T. Osawa. Anti-ageig effects of
food-derived polyphenols. International
Kohoda Foundatrion

2006 Nov. 21th Inuyama

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

「抗老化転写因子活性化剤及びその
利用」

2006年11月10日出願

出願人：国立大学法人名古屋大学、
国立長寿医療センター

発明者：丸山和佳子、大澤俊彦、向蘭、
津田玲生、松浦彰

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

し

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

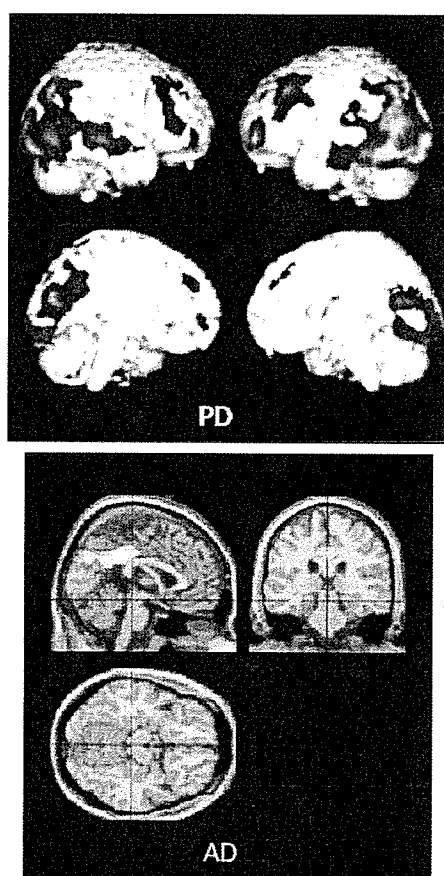
分担研究報告書

物忘れ外来受診者の実態と軽度認知症の脳機能画像の検討

分担研究者 長寿医療センター神経内科 新畑豊

研究協力者 鷺見幸彦^{*1}、武田章敬^{*1}、岩井克成^{*1}、服部英幸^{*2}、吉山顕次^{*2}、
三浦久幸^{*3}、加藤隆司^{*4}、伊藤健吾^{*4}

^{*1}長寿医療センター神経内科、^{*2}同精神科、^{*3}同内科、^{*4}同長寿脳科学研究部



外来受診者の実態調査を行った。当院の
“物忘れ外来”は神経内科、精神科、内
科医師の担当により診療が行われている。
平成18年度の受診者の男女比は約1対

1. 物忘れ外来受診者実態の検討
神経保護薬の臨床応用準備のため物忘れ

2で女性患者が多い。受診者の平均年齢は77.1±8.1歳で60才未満2.5%、60代18.6%、70代33.9%、80代40.7%、90代4.2%であり、70歳代～80歳代が大部分を占めている。病名別内訳として、アルツハイマー病が圧倒的に多く全体の66.9%をしめる。アルツハイマー病の中では軽度、中等度患者が多くその約80%となっている。ついで軽度認知障害(MCI)が多く15.9%であり、レビー小体小体型認知症5.1%、前頭側頭型認知症、脳血管性認知症、正常者が各々4.2%であった。神経内科医師と精神科医師の外来の間に診断内訳の大きな差は見られなかった。認知症の原因の頻度は調査母集団により大きく異なるが、我が国ではアルツハイマー病の割合が増加しつつあるとされながらも認知症全体の50～60%程度とされる。当院物忘れ外来受診者においてはアルツハイマー病の割合が高いが、これは、外来通院が可能な状態の患者に限られ、さらに”物忘れ”に特化した外来の特殊性があるものと考えられる。

2. 初期アルツハイマー病(AD)とパーキンソン病(PD)の脳糖代謝の比較

A 研究目的

脳血流SPECT、脳糖代謝PETなどの脳機能画像診断法は認知症性疾患の診断の上で有用なツールである。進行期のADでは定型的には両側側頭頭頂部の血流代謝低下が見られることが多いが、軽度ADでは定

型的所見が見られる事は臨床的には少なく、一見所見が見つけにくい場合がある。一方、PD患者では比較的認知障害が軽度な例においてもしばしば左右対称性の大脳皮質の血流代謝障害がみられることが経験される。軽度な認知障害を示す段階のこれら2疾患における脳機能画像上の差異を明らかとするため¹⁸F-FDG PETによるブドウ糖代謝分布を全脳を3次的に解析する事が可能な Statistical Parametric Mapping (SPM)を用いて解析をおこなった。

B 対象

認知症スクリーニングテストであるMMSE得点が20～25点の比較的軽度な認知障害をもつADおよびPD患者各々10例を対象とした。ADは61-79歳(平均71.0±6.2歳)、MMSE 22.9±1.5点でありPD群は54-73歳(平均66.5±5.6歳)、MMSE 22.9±1.9点である。両群の対照群として、認知機能障害が明らかでない健全生活高齢者13名(平均68.5±5.3歳)の画像を用いた。

C 方法

PET装置はシーメンス社製 ECAT EXACT HR47を用いた。装置の分解能は水平方向が半値幅(FWHM)4.5mmで、垂直方向3.125mm間隔の47スライスの画像を収集した。外部線源を用いたトランスマッションスキャンをあらかじめ実施し吸収補正を行なった。FDG-PETは、FDG静脈注射後36分より60分の3フレームの加算画像を作成し、統計画像解析ソフトウェアSPM2を用いて

解析を行った。

(倫理面への配慮)

PET 検査は当施設倫理委員会の承認の下実施された。PET 検査前に、全ての対象者及びその家族に対し、検査の目的と内容の説明を行い、書面にて同意を得た。

D 結果

視診上個々のAD例においては片側側頭葉の限局性糖代謝低下が見られる例、正常者との見極めが困難な例など症例によりばらつきが見られた。統計学的解析結果として、対照群に比してPDでは両側の後頭部より側頭葉、前頭前野の広い範囲にわたる大脳皮質糖代謝低下が見られた

(height threshold $T=6.49$)。同じ統計学的条件下ではADでは後部帯状回、海馬近傍に比較的限局した糖代謝低下が見られたが、頭頂側頭大脳皮質低下はPDほど著しい低下が見られなかった。

E 考察

ADにおける皮質病変の強い部は症例により差が大きくあるため群間比較ではこれが目立たず、最も共通した糖代謝の低下所見が見られるのは後部帯状回にあると考えられた。MMSE得点がこれと同程度の

PDではADに比して大脳皮質糖代謝低下が広汎かつ強い程度にみられ、最も低下の著しい部は後頭葉にある。PDにおける大脳皮質脳糖代謝低下は皮質型レビー小体小体の好発部位とは一致せず、機能的変化を見ているものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

新畑豊、加藤隆司、伊藤健吾

パーキンソン病

日本臨床 65, 2, 2006

新畑豊、加知輝彦

多系統萎縮症 PET, SPECT, 生理学的検査

Clinical Neuroscience 24, 9, 2006

伊藤健吾、加藤隆司、新畑豊、鷺見幸彦

FDG-PET を用いた早期診断

Medical Practice 23, 7, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

分担研究報告書

ニホンザルにおける rasagiline と性ステロイドとの相互作用の検討

分担研究者 京都大学霊長類研究所助教授鈴木 樹理

A. 研究目的

昨年度、ニホンザルへの rasagiline 投与によって神経栄養因子およびアミロイドベータタンパクの変化に季節性のある可能性を季節変動が著しい性ステロイド（テストステロン）動態との比較によって示した。今年度はニホンザルへの最適濃度での rasagiline 長期投与を行い、rasagiline は性ステロイド分泌に影響を与えるかどうか、逆に性ステロイドの季節変動が rasagiline 投与効果に影響を与えるかを調べた。

B. 研究方法

ニホンザル成獣オス 5 個体（年齢は 8 歳から 10 歳）を用い、2006 年 6 月 16 日から 9 月 24 日まで 100 日間 Rasagiline 皮下投与（0.25 mg/head/day）を行い、投与後 0 日、7 日、19 日、38 日、75 日、102 日および 140 日にケタミン、メドミジン麻酔下で CSF と血液を採材した。それらの中の神経栄養因子及び性ステロイドホルモン（テストステロン）を測定し、また体重、行動、飼料摂取量等の経時変

化について調べ、非繁殖期（6～8 月）および繁殖期（9 月）の比較を行った。

（倫理面への配慮）

実験は事前に京都大学霊長類研究所の実験倫理委員会で審査され許可を受けた。

C. 研究結果

投与期間中における飼料摂取量、排泄物量・性状に変化は認められなかった。常同行動や躁及び鬱状態も観察されなかった。体重は昨年度と同様に 6 月から 7 月にかけて一時減少したものの 11 月まで増加し、5 頭の平均体重は昨年を上回った。テストステロンは平均値で見ると 7 月 5 日を底値としてその後著しく上昇した。この上昇傾向（上昇率及び血中濃度）は昨年の結果を明らかに上回っていた。神経栄養因子の変化からは rasagiline 投与の有効性が示唆されたが、BDNF が比較的テストステロンと類似の傾向を示した以外、季節性を示唆する結果は得られなかった。体重及びテストステロン濃度の変化から示唆されるように、日常観察によるサルの健康状態は昨年度より良好で、

昨年度脱毛が見られた個体は今年は全くそれが認められなかった。秋の繁殖期になると、性腺機能が活発な個体ではケージ下に精液を認めるようになるが、今年はこれが多かった。

D. 考察

体重及びテストステロン濃度の変化および日常観察によるサルの健康状態は昨年度より良好であり、昨年度報告したように rasagiline は健康を損なうような副作用が認められないことが確認された。性ステロイドが rasagiline 投与効果に影響を与えるという明らかな結論は得られなかったので、これを明らかにすべく研究を継続する必要がある。

E. 結論

性ステロイドが rasagiline 投与効果に影響を与えるという確証は得られなかったが、rasagiline 投与は性ステロイド分泌動態に悪影響を及ぼさず、むしろ健康維持に役立つことが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Descent of the hyoid in chimpanzees:

evolution of facial flattening and speech. .

J. Hum. Evol., 51, 244-254, 2006.

Origins of smile and laughter: A preliminary study.

Early Hum. Develop., 82, 61-66, 2006

Quantitation of sleep and spinal curvature in an unusually longevous owl monkey (*Aotus azarae*) .

J. Med. Primatol., 35, 321-330, 2006.

Sleep profile and longevity in three generations of a family of captive Bolivian Aotus.

Int. J. Primatol., 27, 779-790, 2006.

Sleep quantitation in common marmoset, cotton top tamarin and squirrel monkey by non-invasive actigraphy.

Comp. Biochem. Physiol., Part A 144, 203-210, 2006.

2. 学会発表

腎炎を伴う貧血症チンパンジー乳児の治療と病理解剖・組織学的検索

霊長類研究, 22, supplement, S-29, 2006.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

アルツハイマー病モデルマウスにおける疎水性ジペプチド Leu-Ile の効果について

分担研究者： 新田淳美

研究協力者： Tursun Alkam 鍋島俊隆

名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学・附属病院薬剤部

研究要旨：

疎水性ジペプチドの Leu-Ile は、グリア細胞株由来神経栄養因子（glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF）や脳由来神経栄養因子（brain-derived neurotrophic factor; BDNF）の産生を誘導する低分子化合物として見出された。我々は、今までに Leu-Ile が Hsc70 と結合し、Akt や CREB の活性調節を介して、Leu-Ile が神経保護作用や GDNF 産生誘導作用を有することを明らかとしてきた。これらのシグナル調節分子は、アルツハイマー病と関係あることが報告されていることから、本年度は、アルツハイマー病モデル動物を用いて、学習記憶やタンパクニトロ化への Leu-Ile の効果を検討した。その結果、Leu-Ile は、経口投与した場合においても、学習記憶改善作用を示し、その原因と考えられているタンパクニトロ化を抑制した。本研究の結果から、Leu-Ile がアルツハイマー病の予防・治療薬になる可能性が示唆された。

A. 研究目的

GDNFは、胎児中胚葉由来ドーパミン作動性神経を始め運動神経細胞、海馬神経細胞、大脳皮質神経細胞などに対して保護作用を持ち(Lin et al., 1993; Wang et al., 1997)、パーキンソン病や脊髄損傷の治療薬としての応用も期待されている。

我々は、疎水性ジペプチドである Leu-Ile が神経栄養因子の産生を誘導することによって、*in vivo* および *in vitro* で神経保護作用を有していることを報告している(Nitta et al., 2004)。また、GDNFは薬物依存を抑制するが報告されているが、血液・脳関門の通過や血液中で分解・代謝されることから、GDNF自身を薬物依存治療薬として用いることは難しいと考えられる。精神興奮作用のある覚せい剤のメタンフェタミンと鎮静作用を有する麻薬のモルヒネという薬理的作用としては逆でありながら、依存性をもつ2つの薬物に対して依存形成を Leu-Ile は抑制することを報告している(Niwa et al., in press a, b, 2007)。また、Leu-IleによるGDNF産生誘導作用には、AktやCREBの活性化が重要であることも明らかにしている(Cen et al., 2006)。

神経栄養因子、Akt および CREB は、いずれもアルツハイマー病との関連を示唆する報告がなされていることから、本年は、アルツハイマー病モデルマウスに対する Leu-Ile の効果について検討した。

B. 方法

1. 動物

実験には、5週齢 ICR 雄性マウスまたは17日齢の胎仔ラット(日本SLC、静岡)を使用した。なお、本研究は名古屋大学医学部動物実験指針および Principles of Laboratory Animal Care (National Institutes of Health Publication 85-23, 1985)に基づいて行った。

2. アルツハイマー病モデルマウスの作成

アミロイドβ蛋白 25-35 (Aβ 25-35) を 1mg/ml の濃度となるように滅菌水で溶解し、使用時まで -20°C で保存した。Aβ 25-35 溶解液を 37°C の恒温槽に 4 日間放置することによって、Aβ 25-35 の凝集を促進した後、マウス脳室に 3 μg/3 μl を注入した (Maurice et al., 1996)。

3. 実験スケジュール

Fig. 1 に示すように Aβ 25-35 をマウス脳室に注入した直後 (day1 とする) から、Leu-Ile の投与を開始し、5 日間 1 日 1 回投与を行った。学習記憶実験は day 3-5、ERK 活性化の測定は day1、海馬での蛋白ニトロ化については day5 のマウスを用いた。

4. 新奇物体認知試験

学習・記憶実験には、新奇物体認知試験を用いた。アクリル製のプラスチックの箱 (35 X 35 X 35 cm) にマウスを入れ、10 分間探索させることにより、装置に慣れさせた。翌日 (day4) 装置内に木製で異なる形の 2 つの物体を置き、マウスを 10 分間探索させた。それぞれの物体への接触時間、即ち、ラットが物体に触れる、または、ラットの鼻先が 2cm 以内に近づいた時間を観察者がストップウォッチで測定した (この際の物体を A と B とする)。翌日 (day 5)、物体の 1 つだけを他の形のものに交換し、即ち物体 B を C にし、同様の手順で、それぞれの物体への接触時間を測定した。新奇物体の認知度は、 $(T_c \times 100) / (T_A + T_c)$ として示した (T_A と T_c は、物体 A および C にそれぞれ接触した時間を示す)。

5. ウェスタンブロット法

海馬をホモジナイズバッファー (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 %