

200821016A

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 丸山 和佳子

平成21（2009）年3月

目 次

I. 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	1
丸山和佳子	
II. 分担研究報告書	
1. 神経保護薬のバイオマーカーの探索	5
丸山和佳子	
2. アルツハイマー病患者における MMSE 得点の経時的変化に関する検討	10
新畑豊	
3. ニホンザルにおける rasagiline 投与が精神的健康に及ぼす影響の検討	14
鈴木樹理	
4. 神経栄養因子産生促進物質 Leu-Ile の抗うつ作用について	16
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標的タンパクを介した遺伝子誘導	29
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	38
辻本賀英	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	49

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：

老化に伴う認知症であるアルツハイマー病(AD)およびパーキンソン病(PD)に対する経口投与可能な神経保護薬を開発することを目的として研究を行った。神経変性疾患の原因療法として、脳内に蓄積した異常蛋白、特に A beta protein を除去する免疫療法を始めとして脳内への遺伝子導入療法、神経栄養因子注入療法、異常蛋白合成酵素阻害剤等が世界的な規模で研究されている。これらの治療法は細胞あるいは動物実験レベルでは良好な結果が得られているものの、安全性、侵襲性の問題を解決するために未だ臨床応用に時間を要すると考えられる。また、医療経済的にも、多くの患者に安価で安全な治療を提供することが求められており、患者に対する安全性が既に確立している薬剤/食品による神経保護は保険財政面にとって有望なものである。

propargylamine 化合物(PA)はモノアミン酸化酵素の阻害剤として開発され、米国およびEU では既にPDに使用が認可されている。しかし我々のグループはPAに酵素阻害としての作用と独立して神経保護作用があることを見だし、その機序を検討した。一方、Leu-Ile は鮭などに含まれるジペプチドであり、やはり神経保護あるいは神経再生促進作用をもつ。これについても主に動物実験にて作用機序と効果を検討した。

本年度の新しい試みとして、AD、PDの早期診断あるいは治療効果の評価に有用な生化学マーカーの探索を試み、いくつかの候補を得ることができた。以上本研究課題により、老化に伴う神経変性疾患に対する神経保護薬候補とその作用機序、そして治療効果判定について基礎的成果を得ることができた。

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 客員研究部門（脳神経研究分野）
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

超高齢化社会を迎えるわが国におい
て、老化にともなう認知症の進行を抑
制しする安価で安全な経口薬を開発
することで健康長寿社会に資する。

B. 研究方法および結果

認知症の早期診断、あるいは治療効果
を客観的に判断するバイオマーカー
について、画像診断、臨床症状、生体
サンプルの生化学的解析を行った。末
梢サンプル（血漿あるいは尿）で測定
可能な surrogate marker 候補の中で、
酸化ストレスの指標として酸化脂質、
特に脂質二重膜の構成成分である多

価不飽和脂肪酸の酸化物に対する特
異抗体を作成した。アルツハイマー病
(AD)、パーキンソン病(PD)、の剖検脳
について本抗体を用いて免疫染色を
行うと共に、CSF の Western blotting
を行った。さらに、CSF のタンパク質
についてペプチダーゼ処理後
LC-MS/MS により酸化脂質修飾アミノ
酸の定量、同定を行った。その結果、
AD の CSF 中の脂質過酸化修飾タン
パク質が増加している可能性が示さ
れた（丸山）。国立長寿医療センター
神経内科物忘れ外来に通院した認知
症患者に対し、スクリーニングテスト
として広く用いられている簡易高次
脳機能検査である Mini-Mental State
Examination (MMSE) の PD と AD の失点
内容を比較検討した。その中で連続通
院中のアルツハイマー病患者 36 名（男
性 16 名、女性 20 名）に対し、MMSE
得点の縦断的变化を調べた。その結果、
個々の得点変化には大きなばらつき
があり多くの例では得点の低下がみ
られたが、追跡期間中に得点が無変化
一上昇例した例が 7 例みられた。年間
変化率は $-9.2 \sim +5.8$ 点/年で平均
 -1.5 ± 2.7 点/年であった。初回 MMSE
得点が一般的に認知症スクリーニン
グのカットオフ得点に相当する 23 点
以下の群と 24 点以上の群に分け、年
間得点変化率の差を調べた結果、各々

-1.3±3.3 点/年、-1.8±1.0 点/年で当初の得点が高い者に得点低下が目立つ可能性が示唆された。初診時年齢、男女間の差はみられなかった（新畑）。ニホンザルの成獣オスを対象として、健康状態の指標となり且つ実験動物での寿命延長実験時に変化が認められた血液中の生化学的指標物質、代謝関連ホルモンおよび性ステロイド（テストステロン）について、rasagiline 投与による影響を明らかにした。1頭当たり 0.25 mg/日、連続 100 日に渡る投与実験の結果、体重及びテストステロンは季節変動が明確であった。他の物質に対する影響を見ると、統計学的には有意ではなかったものの、IGF-1 及びインスリンに対して抑制効果を持ち、血糖、中性脂肪、総コレステロール、LDL、HDL 及びアミラーゼには影響を与えないことが示唆された。性ステロイドに対しては、上述のように明確な季節変動が見られたことから、分泌動態に悪影響を及ぼさむしる健康維持に役立つことが示唆された（鈴木）。Rasagiline、(-)deprenyl 等の Propargylamine 構造をもつ B 型モノアミン酸化酵素（monoamine oxidase, MAO-B）阻害剤は抗アポトーシス活性を持つ遺伝子 Bcl-2, GDNF 等の mRNA、タンパクを誘導し神経保護活性を示す。しかし MAO-B 阻害剤が MAO-A のみを発現して

いる神経細胞で保護活性を示すことから標的タンパクの同定が問題となっていた。此の為今回 MAO-A を発現している SH-SY5Y 細胞に MAO-B を強制発現させ、MAO-A, MAO-B 細胞モデルを作成し、MAO の関与を明らかにした。MAO-A 細胞では rasagiline は 1 nM ~ 10 fM と 10 μM の 2 相性に Bcl-2 を有意に増加した。MAO-A に対する siRNA を用い MAO-A タンパクと活性を減少させると、rasagiline に対する感受性が低下した。また MAO-B 細胞では rasagiline に対する反応性が低下し Bcl-2 の誘導は MAO 活性を阻害する高濃度でのみ認められた。また (-)deprenyl は MAO-A, MAO-B 共に 1 μM ~ 10 nM でのみ Bcl-2 を誘導した。これらの結果から rasagiline は MAO-A に親和性の高い結合部位を持ち、ERK1/2-NF-κB シグナル経路を介して抗アポトーシスタンパクを誘導し神経細胞を保護する。一方 MAO-B と rasagiline, MAO-A/B と (-)deprenyl の結合は酵素の活性部位との親和性の低いものであった（直井）。ミトコンドリア膜透過性遷移現象(MPT)が心筋梗塞や脳梗塞傷害に関わること、また MPT に PPIase の一つであるシクロフィリンD が必須であることを示してきた。最近、MPT はアルツハイマー病にも関与することが報告されている。MPT の分子機構解明の一環として、シ

クロフィリンDが相互作用する分子の同定を目指し、複数の候補分子を同定した。さらに、PPIaseであるシクロフィリンDの作用分子機序解明とシクロフィリンDを標的とした疾患治療薬開発に向け、シクロフィリンD・シクロスポリンA複合体の1.06オングストロームレベルでの詳細な高次構造の解明に成功した。さらに、シクロフィリンD依存的MPTの生理機能を知るために、シクロフィリンD欠損マウスの解析を行い、このマウスは、記憶学習や情動反応などにおいて行動異常を呈することを示し、MPTの生理機能の一つを明らかにした(辻本)。

(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、倫理上の問題はない。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、個人情報の漏えい等が起こらないようにした。

C. 考察

rasagilineは既に欧米では酵素阻害剤としてPDに認可されており、現在neuromodulatorとしての申請がFDAになされている。また、Leu-Ileにつ

いては鮭などの食品成分として既に報告があり、構造的にも毒性をもつ可能性は低い。現在臨床応用に向けて計画が進行している。これらは神経保護薬の中でも最も臨床に近い経口薬と考えられる。

さらに、Leu-Ileは食品に含まれるジペプチドであり、神経変性疾患の予防に役立つ機能性食品のシーズとして有望である。

神経保護を行うために、最も重要な点は適切な surrogate markerを設定することである。本研究においてはアルツハイマー病の脳脊髄中に特異的に存在する酸化脂質を見いだすことができた。今後、臨床的に使用可能かどうか研究を進展させていく。

D. 結論

経口投与可能な神経保護薬について、臨床的な研究を進展させるため、その作用メカニズムの解明と surrogate markerの確立が必要である。本研究課題ではそのための基盤となる成果を得ることができた。

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

神経保護薬の臨床バイオマーカーの探索

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：

propargylamine 化合物 (PA) の中でも最も神経保護活性の高い rasagiline は現在米国および EU で酵素阻害剤として安全にパーキンソン病に投与されており、米国 FDA に対しその神経保護作用 (neuromodulator) としての適応を申請中である。神経変性疾患に対する保護作用を臨床的に評価することは極めて困難であり、客観的かつ多施設間で比較可能な surrogate marker が必要である。

今回我々は surrogate marker 候補として脳に多量に含まれる脂質の酸化修飾たんぱく質に焦点を絞り、アルツハイマー病および正常高齢者の脳脊髄液の解析を行なった。

その結果、アルツハイマー病に特異的に増加する酸化脂質修飾タンパク質を見いだす事ができた。今後、本タンパク質がアルツハイマー病の早期診断あるいは神経変性抑制のマーカーとなりうるか否か検討を行なうことが必要である。

A. 研究目的

急速に超高齢化社会を迎えつつあるわが国において、要介護高齢者を支えるための人的、社会的負担は増大の一途をたどっている。わが国の要介護者の中でも認知障害をもつ高齢者については200万人に達するとの試算がなされており、早急に治療あるいは予防法の確立が望まれる。本研究課題では所謂“団塊の世代”が高齢化する2025年までに神経保護薬を実用化することを目標として研究を行った。本年度は特に、神経保護薬の作用を客観的に臨床で評価するためのバイオマーカーをアルツハイマー病脳脊髄液中で探索した。

B. 研究方法

アルツハイマー病および正常老人の死後脳を蟻酸処理の後に抗酸化脂質抗体で染色した（抗体については特許出願予定）。70歳～85歳のアルツハイマー病患者5名、認知症のない患者5名の死後直後に脳脊髄液を腰椎より採取し、-80度Cで保存した。脳脊髄液についてはLC-MS/MSにて酸化脂質の構造決定を行なうとともに、Western blottingにて分離後、抗酸化脂質抗体で同定定量を行なった。

（倫理面への配慮）

ニホンザルを用いた実験は事前に京

都大学霊長類研究所および国立長寿医療センター研究所の実験倫理委員会で審査され許可を受けた。ラットおよびマウスを用いた実験は国立長寿医療センター研究所の実験倫理委員会で審査され許可を受けた。ヒトサンプルについては国立長寿医療センターおよび財団法人福祉村の倫理委員会で審査され許可を受けた

C. 研究結果

ところ、脳内に豊富に存在する不飽和脂質の中でも一部の酸化物がアルツハイマー病患者の老人斑に共存することが明らかとなった。この抗体を用い脳脊髄液の生化学的解析を行なったところ、アルツハイマー患者のみに認められる酸化脂質修飾タンパク質の存在が示唆された（data not shown）

D. 考察

酸化ストレスは脳の老化、あるいはそれにもなう神経変性疾患の原因に関わるとともに、アルツハイマー病やパーキンソン病などに蓄積しているタンパク質の構造異常の原因となっている可能性も示唆されている。脳は好氣的呼吸への依存度が高く、しかも不飽和脂肪酸の含量が高いことが特徴である。そのため酸化脂質によるタンパク質の修飾が他の臓器に比較し

て起こり易いと考えられる。アルツハイマー病脳、脳脊髄液で認められた酸化脂質修飾タンパク質が疾病特異的なものなのか、あるいは脳の老化度のマーカーなのかを今後検討する必要がある。

E. 結論

アルツハイマー病脳脊髄液において、酸化ストレスの亢進を示唆すると思われる特異的な酸化脂質の増加が認められた。今後の検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

アルツハイマー病でのみ認められた抗酸化脂質修飾タンパク質について、特許取得予定。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Naoi M, Maruyama W, Yi H, Yamaoka Y, Akao Y, Shamoto-Nagai M, Tribl F, Tanaka M, Riederer P

Neuromelanin selectively induces apoptosis in dopaminergic SH-SY5Y cells by S-glutathionylation: Involvement of the protein and melanin components.

J Neurochem 2008 in press.

Liu X, Yamada N, Maruyama W, Osawa T.

Formation of dopamine adducts derived from brain polyunsaturated fatty acids: Mechanism for Parkinson's disease.

J Biol Chem. 2008, In press

Shamoto-Nagai M, Maruyama W,

Kato Y., Osawa T (2008) Oxidation of polyunsaturated fatty acids induces protein oligomerization and may initiate neuronal death process in Parkinson disease.

J. Clin. Biochem. Nutr. 2008;

43:Suppl 1:343-346.

Shamoto-Nagai M, Maruyama W,

Hashizume Y, Yoshida M, Osawa T,

Riederer P, Naoi M.(2007) In

parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome

activity. *J Neural Transm.*

14:1559-1567

丸山和佳子, 永井雅代, 直井信

酸化ストレス

日本臨床増刊号 パーキンソン病—基礎・臨床研究のアップデート— 2008 印刷中

丸山和佳子

野菜（植物性食品）摂取の効果

臨床栄養 112(2) 156-159 2008

丸山和佳子, 永井雅代, 直井信, 大澤俊彦

神経細胞の老化と食品—バイオマーカーを中心に—

監修：大澤俊彦, 丸山和佳子（株）シーエムシー出版：食品シリーズ 印刷中

丸山和佳子

酸化ストレス,

パーキンソン病. 山本光利 編 中外医学社, pp. 26 - 38. 2008

2. 学会発表

Maruyama W,

Possible prevention of the age-related dementia by food-derived factors.

4th International Symposium on Geriatrics and Gerontology. Nov 20. 2008

Maruyama W.

Role of oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease. 5TH International Parkinson's disease Symposium in Takamatsu. Apr. 12, 2007 Takamatsu, Kagawa, Japan

Maruyama W., Ando F., Nagai M., Naoi M., Osawa T.

Oxidation of fish oil-derived polyunsaturated fatty acid may initiate abnormal protein oligomerization and neuronal death in Parkinson's disease.

International Conference on Food Factors for Health Promotion. 2007 Nov. 30 Kyoto, Japan

Naoi M, Maruyama W.

Mitochondria and survival and death of dopamine neurons

In: Dopamine 50 Year. May 30, 2007, Göteborg, Sweden

丸山和佳子

抗老化食品・抗脳内老化食品

名古屋大学協力会第6回セミナー

2008年4月11日 名古屋

丸山和佳子

長寿遺伝子と栄養

2008年 植物栄養懇話会 2008年11

月14日 名古屋

3. 実用新案登録

なし

4. その他

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

-アルツハイマー病患者におけるMMSE得点の経時的变化に関する検討-

分担研究者：

国立長寿医療センター先端医療部（神経内科） 新畑豊

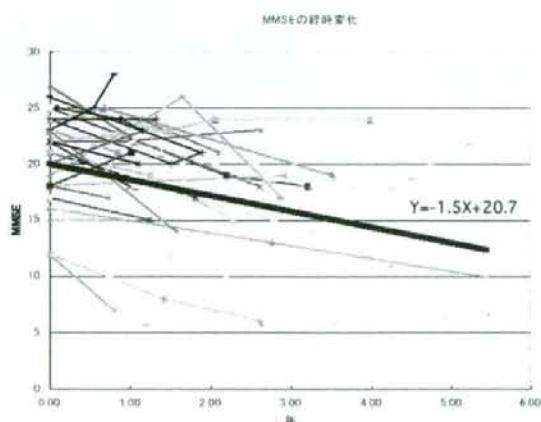
研究協力者：

国立長寿医療センター外来診療部（神経内科） 鷺見幸彦

国立長寿医療センター神経内科 山岡朗子、末永正機、森田須美子

研究要旨

MMSEは認知症のスクリーニングテストとして汎用されている簡易高次脳機能検査である。物忘れ外来に連続通院中のアルツハイマー病患者36名（男性16名、女性20名）に対し、MMSE得点の縦断的变化を調べた。個々の得点変化が直線的にみられるとの仮定のもと、横軸を追跡期間（年換算）、縦軸をMMSE総得点とし、得点変化を最小二乗法を用いて直線回帰し、その傾きを年間変化率とみなした。その結果、得点低下は平均 -1.5 ± 2.7 点/年であった。初回MMSE得点が23点以下の群と24点以上の群に分け、年間得点変化率の差を調べた結果、各々 -1.3 ± 3.3 点/年、 -1.8 ± 1.0 点/年で当初の得点が高い者に得点低下が目立つ可能性が示唆されたが、統計的な有意差はみられなかった。認知症に有効な新薬を臨床応用をした場合、総じてMMSE得点変化が年間1.5点以内の低下に留まる効果が期待されるべきものと考えられる。



A 研究目的

Mini - Mental State

Examination (MMSE) は Folstein ら (1975) により開発された簡易高次脳機能検査であり、認知症のスクリーニングテストとして広く用いられている。MMSE は、言語性テスト 7 項目と動作性テスト 4 項目の計 11 問で構成されている。最高得点は 30 点であるが 23 点以下が認知症の疑いがあるとされる。昨年度の研究では、老年期の認知機能低下を伴う疾患であるアルツハイマー病 (AD) とパーキンソン病 (PD) についてその下位項目の失点内容の違いを検討し、AD では早期より 3 語の遅延再生の低下が目立ち、PD では総得点低下が軽度の段階においては 7 の引き算の低下が AD に比し目立つ事を示した。本年度は AD 患者における経年的変化について調べた。

B 対象 および 方法

対象は当院物忘れ外来に連続通院中のアルツハイマー病患者 36 名 (男性 16 名、女性 20 名) につき、MMSE 得点の経時的変化を retrospective に調べた。対象患者の年齢は初回評価時平均 70.7 ± 6.7 歳である。追跡期間は 0.7 年～5.4 年、平均 2.3 ± 1.3 年である。追跡評価期間が一定でないため、個々の得点変化が直線的にみられるとの仮定のもと、横軸を追跡期間 (年換算)、

縦軸を MMSE 総得点とし、得点変化を最小二乗法を用いて直線回帰し、その傾きを求める事により年間の得点変化率を算出した。

さらに初回 MMSE 得点が一般的な認知症スクリーニングのカットオフ得点とされる 23 点以下の群と 24 点以上の群に分けその得点変化率を比較検討を加えるとともに、初診時年齢、性別による違いを検討した。

C 結果

初回受診時の MMSE 総得点は 30 点満点中 12～27 点で平均 21.2 ± 4.0 点であった。個々の症例における追跡期間中の MMSE 総得点変化には大きなばらつきがあり、多くの例では得点の低下がみられたが、追跡期間中に得点がほぼ無変化～上昇を示した例が 7 例みられた。おおよそ 4 年の追跡期間中の得点低下がほとんどみられていない例もみられた。年間得点変化率は $-9.2 \sim +5.8$ 点/年で、平均 (±標準偏差) $-1.5 (\pm 2.7)$ 点/年であった。(図 1)

初回 MMSE 得点が 23 点以下の群 (得点平均 $19.0 (\pm 3.4)$) は 23 名で 24 点以上の群 (得点平均 $24.9 (\pm 1.1)$) は 13 名であった。年間得点変化率は、各々 $-1.3 (\pm 3.3)$ 点/年、 $-1.8 (\pm 1.0)$ 点/年で当初の得点が高い群に得点低

下強い傾向が示唆されたが、統計学的な有意差はみられなかった。初回検査時年齢69歳以下の群23名と70歳以上の群13名での比較検討ではMMSE得点低下率は各々-1.5(±2.4)点/年、-1.6(±3.2)点/年で差はみられなかった。男女間の検討では各々-1.9(±3.4)点/年、-1.3(±1.6)点/年で男性において低下傾向がめだつものの統計学的有意差はみられなかった。

D 考察

今回の検討では、個々の症例の得点変化が直線的にみられると仮定しMMSE総得点と時間軸を直線回帰する事で得点低下率を算出を行ったが、その結果、AD患者におけるMMSE総得点低下は平均で年間1.5点であった。Hanら2000年の報告では、その得点変化は3.3点/年とされているが、これと比べると得点低下は少ない結果であった。今回の調査対象36名中34がAD治療薬である塩酸ドネペジルの内服をしており、また、ドネペジルの効果が出やすいとされる軽症者の割合が高いため、薬剤の効果がみられ得点低下率が少ない可能性も考えられる。

追跡期間中の得点低下がほとんどみられていない患者もいるが、これらの患者においても日常生活の中での記憶低下は明らかとなっており、MMSE得点

が必ずしもADとしての進行を反映するものではないともいえる。しかしながらMMSEに代表される簡易認知機能スケールは日常診療における評価に用いやすく、広く用いられている検査であり、この変化の起こり方を知っておく事は重要である。

E 結論

AD患者におけるMMSE総得点低下は平均で年間で1.5点であった。認知症に有効な新薬を臨床応用をした場合、総じてMMSE得点変化が年間1.5点以内の低下に留まる効果が期待されるべきものとする。

F 参考文献

Han L, Cole M, Bellavance F, McCusker J, Primeau F.

Tracking cognitive decline in Alzheimer's disease using the mini-mental state examination: a meta-analysis.

Int Psychogeriatr. 2000 Jun;12(2):231-47.

G 研究発表

1. 論文発表

○新畑豊, 伊藤健吾

アルツハイマー病診療の現状と画像診断への期待

PET journal 2008.1. 16-19
先端医療技術研究所

2. 学会発表

○加藤隆司, 伊藤健吾, 簗野健太郎, 新畑 豊, 加藤力雄, 岡村信行, 谷内一彦.

[C-11] BF-227 PETアミロイドイメージングの長寿医療センターにおける初期検討.

第 48 回日本核医学会学術総会
2008.10.25. 幕張

○二橋尚志, 早坂和正, 長縄慎二, 新畑豊, 岩井克成, 武田章敬, 山岡朗子, 小長谷陽子, 鷺見幸彦, 吉山顕次, 服部英幸, 佐竹昭介, 三浦久幸, 遠藤英俊, 八谷寛

認知症患者における後部帯状回の機能異常に関する脳血流シンチとMRスペクトロスコピーの相関関係に関して
第20回臨床MR脳機能研究会, 2008.2.15.
東京

○加藤隆司, 伊藤健吾, 簗野健太郎, 新畑豊, 鷺見幸彦, 吉山顕次, 服部英幸, 三浦久幸, 岡村信行, 谷内一彦.

[C-11] BF-227 PETアミロイドイメージングの初期経験. 日本核医学第66回中部地方会, 2008.2.23. 名古屋

○加藤隆司, 簗野健太郎, 伊藤健吾, 鷺見幸彦, 新畑 豊, 武田章敬, 服部英幸, 吉山顕次, 三浦久幸, 岡村信行, 矢内一彦

[C-11]BF-227 PETによるアミロイドイメージング長寿医療センターにおける初期検討.

第12回ニューロイメージングカンファレンス, 2008.2.2. 名古屋

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

ニホンザルにおける rasagiline 投与が精神的健康に及ぼす影響の検討

分担研究者 京都大学霊長類研究所准教授鈴木 樹理

A. 研究目的

今までの研究によってニホンザルへの rasagiline 長期投与実験により体内の神経栄養因子およびアミロイドベータタンパク濃度が変化することが確認された。その際に肉体的な健康状態の指標となる、血液中の代謝関連ホルモン及び生化学的指標物質および性ステロイド（テストステロン）動態を明らかにした。今年度は、ヒトやサルでは肉体的のみならず精神的な健康状態の指標、すなわちストレスの指標となる、糖質コルチコイドであるコーチゾルの rasagiline 長期投与における変動を明らかにし、rasagiline 投与による精神健康維持の確認を行った。またインスリン様成長因子1型（IGF-1）の定量系の改良を試み結果の再検討を行った。

B. 研究方法

2006年に rasagiline を100日間の長期投与実験を行った。行った血液試料を用いた。対象とした個体は、ニホンザル成獣オス5頭（年齢は9歳から11歳）を用いた。具体的には、投与期間は6月16日～9月24日（day 0～100）、Rasagiline 0.25 mg/頭である。それぞれ実験開始日、終了日、終了後30日を含め、ケタミン、キシラジン混合麻酔下

で適宜 CSF と血液を採材した。それらの血液中の IGF-1 およびコーチゾルについて測定し、経時変化を明らかにした。更に今までの研究によって明らかになった季節変動の有無についても検討を行った。

（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

コーチゾル：全体の変動範囲は、ニホンザルにおける生理的な日内変動範囲である 5～20 μ g/dL 内であった。統計学的には有意ではなかったが、実験開始初期（投与7日目）に濃度の上昇が認められ、その後暫減する傾向を示した。

IGF-1：実験開始後濃度上昇が見られ、投与後19日目にピークとなった。その後、投与38日目に実験開始時の濃度まで低下するものの、以後は緩やかにやや上昇し、投与終了後も持続した。これも統計学的には有意ではなかった。

D. 考察

血中コーチゾル濃度の実験初期の上昇は実験によるストレスの影響が考えられる。既に報告したように、食欲、便の量と性状、行動変化および血中テストステロン濃度変

化から、2006年実験時には実験個体が実験手技に馴化し、ストレスの影響がかなり小さくなったと判断することができる。血中コーチゾル濃度がニホンザルの生理的な日内変動範囲内であったことは、実験手技が実験初期には多少はストレスラーとして作用するものの、全体的には作用しないことを示すものだと考えられる。Rasagiline投与による悪影響は認められないと判断できる。

再定量した血中 IGF-1 濃度変化は、昨年度の結果と異なっていた。昨年度の結果では実験初期の上昇濃度よりも実験終了後の濃度の方が高く、rasagiline 投与によってその分泌が抑制されている可能性が示唆されたが、今回の結果は明らかに初期の上昇濃度の方が大きく、rasagiline 投与終了後に顕著に濃度が上昇する現象は認められなかった。この初期の濃度上昇が認められた期間は、コーチゾル濃度変化が認められた期間より長く、実験手技によるストレス反応ではない可能性が高い。Rasagiline 投与による効果と考えると、一時的な濃度の低下が認められるので、その作用が促進的だと判断できない。本実験でも、ニホンザルに生理的な季節変動が体重およびテストステロンで存在することを確認したが、IGF-1 についても、ニホンザルでその報告があり、今回の結果はそれと合致するものであった。従って、このホルモンの初期の濃度上昇は、季節変動に起因するものと判断するのが妥当であろう。

以上のことから、ニホンザルの成獣オスにおける rasagiline 投与による精神的健康への影響を見ると、促進効果を持つとは判断できないが、悪影響はないことが示唆される。

E. 結論

ニホンザルの成獣オスにおける rasagiline 投与による肉体的精神的健康への影響を見ると、血中コーチゾル濃度変化には影響を与えないことから、精神的な健康状態に悪影響を及ぼすことはないことが示唆された。これは今までの研究結果を裏付ける結果であった。性ステロイドおよび IGF-1 に対しては、上述のように明確な季節変動が見られたことから、これらに対しても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

Sleep parameters in captive female owl monkey (*Aotus*) hybrids. *Neotropical Primates* 14: 140-144, 2007.

Development of the superlaryngeal vocal tract in Japanese macaques: Implications for the evolution of the descent of the larynx. *American Journal of Physical Anthropology* 135: 182-194, 2008.

2. 学会発表

Malignant lymphoma (plasma cell neoplasm) in a long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*). The 3rd International Meeting on Asian Zoo/Wildlife Medicine and Conservation. Non-human Primates Pathology Workshop. *Proceedings*: 105-106, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

分担研究報告書

神経栄養因子産生促進物質 Leu-Ile の抗うつ作用について

分担研究者：新田淳美¹

研究協力者：日比陽子^{1,2}、山田清文¹、鍋島俊隆^{1,3,4}

¹名古屋大学大学院医学系研究科・医療薬学・医学部附属病院・薬剤部、²財団法人 長寿科学振興財団、³名城大学大学院薬学研究科臨床薬学専攻病態解析学コース薬品作用学教室、

⁴特定非営利活動法人 医薬品適正使用推進機構

【研究要旨】

アルツハイマー型認知症患者ではうつ様症状も観察されることが多く、この症状を緩和することが治療効果の促進および患者のQOLを高めることにもつながる。本研究では、当研究室で神経保護薬として研究を進めているジペプチドLeu-Ileの抗うつ効果について検討している。昨年度までに、1日6分間の強制水泳を2週間にわたって行う方法（連日強制水泳試験）を用いたうつモデルマウスにおいて観察されるうつ様症状の誘導（強制水泳時の無動時間の延長）が毎水泳後にLeu-Ileを経口投与することによって抑制されることを見だし、また連日強制水泳試験によって誘導される海馬歯状回の細胞増殖抑制がLeu-Ile投与群で回復することも示した。本年度は、Leu-Ileの抗うつ様作用の発現メカニズムについてさらに検討を行った。毎水泳後にLeu-Ile投与を受けたマウスにおいては、海馬におけるbrain-derived neurotrophic factor (BDNF) のmRNA量が連日強制水泳試験のみのLeu-Ile非投与群と比較して増大していたことから、Leu-Ileの抗うつ様作用にはBDNFが重要であることが示唆された。そこでBDNFヘテロノックアウトマウスで同様の実験を行ったところ、Leu-Ileは抗うつ効果を示さなかった。また、BDNFシグナル伝達経路の活性化を調べたところ、連日強制水泳試験とLeu-Ile投与の両方を行ったマウスでは連日強制水泳試験のみのLeu-Ile非投与群と比較してERKおよびAktのリン酸化が上昇していた。これらの結果から、Leu-Ileの反復投与はBDNFの産生誘導をすることでERKやAktなどTrkB下流のシグナル伝達経路の活性化を介して海馬歯状回の細胞増殖を回復し、抗うつ様作用を示すと考えられる。

A. 研究目的

アルツハイマー型認知症患者では、うつ様症状も観察されることも多く、治療を困難にする一因となっている。うつ様症状の予防や改善を目的として、安全性の高い物質を、経口など容易に摂取できる形で供給することは社会への貢献度が高いと考えられる。Leu-Ile は培養神経細胞において神経栄養因子の産生を誘導し、神経保護作用を示すことが分かっており (Nitta et al., 2004)、これまでも様々な精神疾患に対して有効であることが示されている (Niwa et al., 2007)。そこで、本研究では我々は Leu-Ile の抗うつ効果について検討を行った。前年度までに Leu-Ile が抗うつ様作用を示し、また連日強制水泳試験で誘導される海馬歯状回における細胞増殖抑制を回復することを見いだした。そこで、本年度は Leu-Ile の抗うつ様作用発現メカニズムについてさらに追究した。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験には、7週齢 ICR 雄性マウス (日本 SLC、静岡)、および7週齢 BDNF ヘテロノックアウト (BDNF (+/-)) 雄性マウス (Jackson lab, USA) 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 *The Guidelines for proper Conduct of Animal Experiment*. Science Council Japan, 2006 に基づいて行った。

2. 試薬

Leu-Ile は国産化学 (東京、日本) から購入した。BrdU 染色検出キットは Roche Applied Science (Mannheim, Germany) から購入した。Total RNA 抽出キットは QIAGEN (東京、日本) から購入した。逆転写酵素および real time RT-PCR 試薬は Invitrogen (Carlsbad CA) から購入した。抗リン酸化 Akt 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体、抗 ERK 抗体は Cell Signaling Technology Japan (東京、日本) から購入した。その他の試薬は研究用特級グレードの物を使用した。

3. 強制水泳試験

25°C の水を 15cm の水深で張った円筒形の水槽にマウスを投入し 6 分間の強制水泳を行い、後半 5 分間における無動時間を赤外線装置により測定した。無動時間が長いほどうつ様症状を示していると考えられる。本実験では 2 週間の連日強制水泳試験を用いて Leu-Ile の抗うつ作用について検討し (Hitoshi et al., 2007)、Leu-Ile は精製水に溶解したものを毎水泳後に経口ゾンデを用いて 0, 150 および 750 $\mu\text{mol}/\text{kg}/10\text{mL}$ を経口投与した。Leu-Ile 非投与群 (vehicle 群) には、精製水を投与した。

4. Real time RT-PCR

連日強制水泳および Leu-Ile の投与を 5 日間行ったマウスの海馬を採取し、total RNA を調整した。これを用いて cDNA を合成し、Real Time RT-PCR により BDNF

の mRNA 量を測定した。Real time PCR の primer は forward 5' -GCAAACATGTCTAT GAGGGT TCG-3' , reverse 5' -ACTCGCTAATACT GTCACACACG-3' FAM-TAMRA labeled probe 5' -ACTCCGACCCTGCCCGCGT-3' を用いた。

5. ウェスタンブロッティング

連日強制水泳および Leu-Ile の投与を 5 日間行ったマウスの海馬を採取し、Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) バッファー (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1 % SDS, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate, 20 ng/ml aprotinin, 20 ng/ml leupeptin, 20 ng/ml pepstatin, pH-7.4) 中でホモジナイズした。ホモジナイズ後のサンプルは遠心分離 (13000 x g, 4 °C, 20 分) を行い、得られた上清を組織溶解液とした。蛋白量 5 μg の組織溶解液を 10% アクリルアミドゲル電気泳動で分離し polyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜に転写したものを、抗リン酸化 Akt 抗体、抗 Akt 抗体、抗リン酸化 ERK 抗体、抗 ERK 抗体を一次抗体として検出した。

C. 研究結果

1. Leu-Ile の BDNF 産生誘導作用

5 日間連日強制水泳試験を行ったマウスの海馬における BDNF mRNA 量を real Time RT-PCR により測定したところ、非連日強制水泳群と差がなかったが、連日強制水泳と同時に Leu-Ile 投与を行ったマウスについて、海馬 BDNF mRNA 量が増大していた (Figure 3)。

2. BDNF ヘテロノックアウト BDNF (+/-) マウスにおける Leu-Ile の効果

BDNF (+/-) マウスを用い、連日強制水泳試験において Leu-Ile が抗うつ様作用を示すかどうかを確認した。その結果、BDNF (+/-) マウスでは Leu-Ile による無動時間の短縮は観察されず、抗うつ様作用は認められなかった。この実験結果から、Leu-Ile の抗うつ効果には BDNF が重要であることが示された (Figure 4)。

3. Leu-Ile が ERK および Akt のリン酸化に及ぼす影響

BDNF シグナルの下流では Akt および ERK がリン酸化を受けるので、連日強制水泳 5 日目のマウスの海馬を用い、Leu-Ile がこれらの因子の活性化に影響を及ぼすかどうかをウェスタンブロッティングで確認した。その結果、Leu-Ile は ERK および Akt のリン酸化を亢進していた (Figure 5)。

4. Leucine および Isoleucine の抗うつ効果の検討

Leucine (Leu) と Isoleucine (Lin et al.) を等量 (750 μmol/kg/10mL) 混合したものを毎水泳後に投与し、効果を調べたところ、無動時間の短縮および BDNF mRNA の増大は見られなかった (Figure 6)。

D. 考察

強制水泳試験は、抗うつ薬のスクリーニングに汎用されている方法である。マウスを水槽に投入すると、投入直後は逃れることを試みて泳ぐが、次第に無動状