

200821050A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する

新規治療法開発に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 鈴木 登

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

I. 総括研究報告	1
研究代表者 鈴木 登	
II. 平成 20 年度班会議議事録	4
III. 分担研究報告	
1. 霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する 新規治療法開発に関する研究	5
聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
2. 海馬体積および大脳皮質下病変が認知機能に及ぼす影響	8
聖マリアンナ医科大学 神経精神科 山口 登	
3. 新規アルツハイマー病治療戦略:5-HT <sub>4</sub> 受容体/ $\alpha$ セクレターゼ/A $\beta$ 生成抑制系に関する研究	11
聖マリアンナ医科大学 大学院アイソトープ研究施設 松井宏晃	
4. 霊長類胚性細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する 新規治療法開発に関する研究	13
聖マリアンナ医科大学 神経精神科 長田賢一	
5. アルツハイマー病に関与する血清ペプチドの深索	16
聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム ・分子病態治療学 黒川真奈絵	
6. タウオパチーに起因する認知症に随伴するパーキンソニズムに 関する研究	20
聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学 千葉俊明	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
V. 平成 20 年度班員名簿	28

## I. 総括研究報告

#### 研究要旨

認知症は世界的に大きな社会問題となっている。認知症の治療方法は現在のところ進行を遅らせる対症療法のみであり、画期的な新規治療法の開発は重要な課題である。認知症の中核的疾患であるアルツハイマー型認知症はタウ蛋白異常およびアミロイド蛋白異常の両方の病態を持つ疾患である。ヒトタウ異常蛋白発現トランスジェニックマウスを用いて霊長類胚性幹細胞から分化誘導した神経幹細胞の移植を行った。異常タウ蛋白の沈着は海馬や大脳皮質で認められ、それに伴い caspase-3 の活性化と神経細胞死が観察された。即ち、異常タウ蛋白の蓄積が病態を形成する事が示唆された。神経細胞の補充は認知症の改善をもたらすと考え神経幹細胞の移植治療を行った。GFP 陽性移植細胞は線条体内に生着した。今後は、複数の手技を組み合わせ、集学的なより効率的な移植法の開発を目指す必要がある。

#### 分担研究者

- 松井 宏晃 聖マリアンナ医科大学・大学院  
アイソトープ研究施設教授
- 山口 登 聖マリアンナ医科大学神経精神  
科学教室教授
- 長田 賢一 聖マリアンナ医科大学医学部神  
経精神科教室
- 黒川真奈絵 聖マリアンナ医科大学 疾患ブ  
ロテオーム・分子病態治療学
- 千葉 俊明 聖マリアンナ医科大学医学部免  
疫学・病害動物学教室

を改善する種々の手法を組み合わせ、さらに  
霊長類胚性幹細胞から分化誘導した神経細胞  
移植を行うことで新機軸の治療法を開発する  
ことを目的とした。

#### B. 方法と結果

本年度は最初にヒト異常 (N279K) タウ遺  
伝子改変マウス(SJLB マウス)の組織学的検討  
および移植治療を行った。同様にアミロイド蛋  
白異常 (B6.Cg-Tg(PDGFβ-APP<sup>SwInd</sup>)) モデ  
ルマウスにおいても、移植治療を検討した。

ヒトタウ異常蛋白は月齢依存性に SJLB マ  
ウスの皮質および海馬の神経細胞に蓄積し神  
経突起の変性がみられた。変性のみられた神経  
細胞は Caspase-3 を介したアポトーシスが顕  
著であり、また、アポトーシスは皮質で早く起  
こり、その後に海馬での細胞死が盛んになる  
という、先行する性格変化とその後の認知症と  
いう臨床経過に合致した結果が得られた。

SJLB マウスの線条体 (中心部と後方の海馬  
近傍) の 2ヶ所に GFP 陽性神経幹細胞を移植  
した。移植後の組織評価では GFP 陽性細胞が

#### A. 研究目的

全世界的に認知症は大きな社会問題となっ  
ている。認知症の治療薬は現在のところ進行を遅  
らせる対症療法のみであり、画期的な治療法  
の開発は緊急の課題である。アルツハイマー型認  
知症はタウ蛋白異常およびβアミロイド蛋白  
異常の両方の病態を持つ疾患である。病因タン  
パク質βアミロイドの産生、凝集、クリアラン  
スの分子機構、タウ蛋白沈着と神経細胞死の誘  
導のメカニズムを解明して新規治療法の開発  
を目指す必要がある。我々はこれらの各段階

容易に特定でき、線状体内で生着していることが確認された。また、ニューロンマーカー (Tuj) を発現しているものの節前シナプス (synapsinI) を認めず、幼弱な神経細胞であることが示唆された。

移動部位において線状体内は遊走するが皮質および海馬への遊走は充分にはみられなかった。今後は皮質および海馬へ移動させる事が可能な、より効率的な移植法の開発を目指す必要がある。

タウオパチーによる認知症に随伴する L-dopa 抵抗性パーキンソンニズムの機序解明のため、SJLB マウスを用いて行動学的、組織学的評価および、ドーパミンシステム (線条体・中脳黒質) における特徴的な蛋白の定量などを行った。線条体におけるドーパミン受容体細胞にヒトタウ異常蛋白の蓄積と Caspase-3 を介したアポトーシスによる細胞死がみられ、細胞数の減少が 6 ヶ月齢からみられた。この結果はヒトタウ異常蛋白の蓄積からドーパミンシステムを含む脳内のさまざまな場所において病的な細胞死をきたし、それぞれの場所における機能異常をきたすことが示された。

アルツハイマー病の病因のひとつは、アミロイド  $\beta$  (amyloid  $\beta$ ; A $\beta$ ) ペプチドの脳内での産生・蓄積と考えられる。生理的条件下では、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) の細胞膜から 12 アミノ酸外側で細胞外ドメインを切断する酵素 ( $\alpha$  セクレターゼ) の作用により、A $\beta$  の過剰産生が抑制されている。 $\alpha$  セクレターゼ切断を受けた sAPP $\alpha$  は神経細胞保護作用を有し、細胞外へ分泌される。セロトニン(5-HT)4 受容体(5-HT4R)活性化は、cAMP 上昇 $\rightarrow$ Epac1 活性化 $\rightarrow$ Rap1、Rac 活性化を介して  $\alpha$  セクレターゼを活性化し、sAPP $\alpha$  の細胞外への分泌を促進させることが報告された。従って、5-HT4R 作動薬はアルツハイマー病治療薬としての可能性を秘めている。今年

度は(5-HT4)受容体遺伝子発現制御領域に GATA6 結合部位を同定した。実際 GATA6 は 5-HT4 受容体遺伝子発現を促進した。脳内に GATA6 の発現が認められること、並びにスタチンが GATA6 の DNA 結合活性を増加させることを踏まえると、本研究結果は、スタチン投与により 5-HT4 受容体発現量を高めることが可能であり、本研究の成果から、スタチン投与 $\rightarrow$ 脳内 GATA6 DNA 結合活性増加 $\rightarrow$ GATA6/Sp family/C/EBP $\alpha$  協調作用増加 $\rightarrow$ 5-HT4R 発現量増加 $\rightarrow$  $\alpha$  セクレターゼ活性化 $\rightarrow$ A $\beta$  生成の抑制の経路が推定される。

AktはCHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) /Hsp90 (heat shock protein 90)複合体を調節シタウの過剰なリン酸化による蓄積に大きく影響している事が報告された。即ちAktはタウのS262/S356のリン酸化を誘導し、CHIPを介するタウのユビキチン化による変性を減少させる。長田は抗うつ薬であるSSRIであるFluvoxamineとSNRIであるMilnacipranがAktのリン酸化を亢進させることを見出した。この成績はFluvoxamine, Milnacipranがタウのリン酸化を抑制する可能性を示唆しており、アルツハイマー病の治療への応用が考えられた。

山口は頭部 MRI 所見と神経心理学的検査所見との関係を検討した。その結果、①海馬体積は認知機能と強い相関が示され、特に見当識・言語記憶機能(再生機能と遅延再認機能)と関連する事、大脳皮質下病変のうち脳質周囲病変は言語記憶機能及び精神的敏捷性と関連するが、いずれの関連性も海馬体積より低い事、大脳皮質下病変のうち大脳深部白質病変は認知機能と関連しない事を見出した。即ち、海馬萎縮性変化が特徴的なアルツハイマー病では脳室周囲病変が併存することで、より記憶機能・認知機能低下は重症化しやすい事が示唆された。

アルツハイマー病の診断や病状評価は、記憶・認知機能等の臨床的評価項目や画像診断を中心に行われているが、より簡便・確実なマーカーの設定が求められている。黒川はアルツハイマー病の血清ペプチドを網羅的に解析して診断・病状評価に寄与するペプチドを検出することを目的に、その測定系の設立を試みた。

ペプチドミクスは主に 10kD 以下の蛋白質について網羅的に解析する実験法であり、MS/MS法によりペプチドのアミノ酸配列を解析する為には、検体中に含まれるペプチドの種類が限定される必要がある。MS/MS法の前段階として2次元高速液体クロマトグラフィーを施行し、磁気ビーズで抽出した血清ペプチド溶液を約 600 画分に分画したところ、標的的血清ペプチドのアミノ酸配列が同定され、由来する親蛋白質も同定できた。この改変ペプチドミクス法により、アルツハイマー病の簡便な診断マーカーとなる、または病因に関与する血清ペプチドを、網羅的に検出できる可能性が示された。

#### (倫理面への配慮)

臨床試験・動物実験に関しては当大学の規約に則り、それぞれの委員会の承認を得た後に充分倫理的に配慮をした上で研究を行った。

#### D. 考察

組織学的な評価からタウ異常蛋白の蓄積が病態を構築することがわかった。海馬特異的神経細胞の分化誘導法は未だ確立していないため、遊走能および分化能の高い神経幹細胞を移植群として使用した。また、移植部位として海馬近傍の線状体も検討(海馬への移植では移植操作で海馬を損傷する可能性がある)したが、充分な移動および遊走はみられなかった。

アポトーシスによる神経細胞死をきたす状態では遊走を促すような因子の放出などが少

ないことが予想された。

#### E. 結論

タウ異常蛋白を発現するトランスジェニックマウスにおいて、神経細胞移植を行い、神経細胞の生着を確認した。今後より有効な細胞移植を行うとともに、集学的手法を用いて、アルツハイマー病の治癒を可能にする治療法の開発を行う必要がある。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

## Ⅱ. 平成 20 年度 班会議議事録

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する  
新規治療法開発に関する研究

平成 20 年度第 1 回研究班会議会議録

日時 平成 20 年 11 月 6 日

場所 聖マリアンナ医科大学

事務局  
聖マリアンナ医科大学  
免疫学・病害動物学 内線 3547

－研究組織－

主任研究者

鈴木 登 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学

分担研究者

山口 登 聖マリアンナ医科大学 神経精神科学  
松井宏晃 聖マリアンナ医科大学 大学院アイソトープ研究施設  
長田賢一 聖マリアンナ医科大学 神経精神科学  
黒川真奈絵 聖マリアンナ医科大学 疾患プロテオーム・分子病態治療学  
千葉俊明 聖マリアンナ医科大学 免疫学・病害動物学

－研究概要－

認知症モデルマウスを用いて新規治療法としての霊長類 ES 細胞由来神経細胞移植療法の有用性を評価する。

なかでもアルツハイマー病を主体に研究を行うことを確認した。

### Ⅲ. 分担研究報告

#### 研究要旨

アルツハイマー型認知症はタウ蛋白異常およびアミロイド蛋白異常の両方の病態を持つ疾患である。ヒトタウ異常蛋白発現トランスジェニックマウスを用いて霊長類胚性幹細胞から分化誘導した神経幹細胞の移植を行った。異常 Tau の沈着は海馬や大脳皮質で認められ、それに伴い caspase-3 の活性化と神経細胞死が観察された。即ち、異常 Tau 蛋白の蓄積が病態を形成することが示唆された。失われた細胞を補充するべく、神経幹細胞の移植治療を行った。GFP 陽性移植細胞は線条体内で生着した。今後、長期の観察を行い、行動評価を行う予定である。

#### A. 研究目的

アルツハイマー型認知症はタウ蛋白異常およびアミロイド蛋白異常の両方の病態を持つ疾患である。両方の側面から治療を検討するため、本年度はタウ蛋白異常モデルマウスの組織学的検討および移植治療を行った。十分に組織学的に検討されているアミロイド蛋白異常モデルマウスにおいても、同様に移植治療を検討した。

#### B. 研究方法

1. ヒト異常 (N279K) タウ遺伝子改変マウスであるSJLBマウスの皮質および海馬を中心にタウ異常蛋白の蓄積をヒトタウ特異的抗体を用いて組織学的に解析した。Luxsol first blue-bodian染色にて同部の神経線維変性を評価した。

2. タウ異常蛋白がCaspase-3を介したアポトーシスをきたし、細胞死および機能異常をきたす報告を基に、12ヶ月齢SJLBマウスの皮質、海馬においても同様であるか組織学的に解析した。アポトーシスはTUNEL法にて、Caspase-3には活動型Caspase-3のみを認識する抗体による組織染色を施行した。

3. 電子顕微鏡による神経変性を確認した。

1.-3.において治療における標的は蓄積した異常蛋白であることが確認できる。

#### 4. 移植治療

a) 移植細胞の同定および追跡のためのGFP発現マウス胚性幹細胞の作製と神経幹細胞の分化誘導。

b) 3ヶ月齢および4ヶ月齢SJLBマウスの線条体（中心部と後方の海馬近傍）の2ヶ所にGFP強陽性神経幹細胞を移植し、1ヶ月後の組織評価を施行。

c) アミロイド蛋白異常 (PDGFB-APP<sup>SwInd</sup>)マウスの米国からの搬入および繁殖。3ヶ月齢および4ヶ月齢のアミロイド蛋白異常マウスの線条体に同様にGFP強陽性神経幹細胞を移植し、1ヶ月後の組織評価を施行。

（倫理面への配慮）

動物実験に関しては当大学実験動物取り扱い規約に則り、また苦痛軽減措置も適切に行った。遺伝子組み換え実験においても、当大学に申請し許可された実験計画に基づいて適切に行っている。

### C. 研究結果

1. ヒトタウ異常蛋白は月齢依存性に皮質および海馬の神経細胞に蓄積していた。

また同部では神経突起の変性がみられた。

2. 1.の結果と同様に変性のみられた神経細胞は Caspase-3 を介したアポトーシスが顕著であり、また、アポトーシスは皮質で早くおこり、その後海馬での細胞死が盛んになるという、先行する性格変化とその後の認知症という臨床経過に合致した結果が得られた。

3. 12ヶ月齢 SJLB の特に海馬において、アポトーシスを起こした核をもつ変性した神経細胞が確認された。

4.

a) Nucleofector による pmaxGFP 遺伝子導入マウス胚性幹細胞株を G418 抗生剤にて選択し、homogeneous な GFP 強発現株を3株作製。その後 PA6 細胞との共培養にて6日目には約 80%の細胞が神経幹細胞になることを確認した。

b) 移植後の組織評価では GFP 陽性細胞が容易に特定でき、線状体内で生着していることが確認された。また、ニューロンマーカー(Tuj)を発現しているものの節前シナプス(synapsinI)を認めず、幼弱な神経細胞であることが確認された。移動部位において線状体内は遊走するが皮質および海馬への遊走はみられなかった。

c) 移植後一ヶ月の組織評価待ちである。

d) 一部の実験では霊長類胚性幹細胞株由来神経幹細胞移植を行って生着を確認した。

### D. 考察

組織学的な評価からタウ異常蛋白の蓄積に対する治療および蓄積を予防するような治療が重要であることがわかった。海馬特異的神経細胞の分化誘導法は未だ確立していないため、遊走能および分化能の高い神経幹細胞を移植群として使用した。また、移植部位として海

馬近傍の線状体も検討(海馬への移植では移植操作で海馬を損傷する可能性がある)したが、有効な移動および遊走はみられなかった。アポトーシスによる神経細胞死をきたす状態では遊走を促すような因子の放出などが少ないことが予想された。

### E. 結論

タウ異常蛋白を溶解もしくは抑制するような遺伝子導入神経幹細胞の移植を検討する必要がある。これはアミロイド蛋白異常マウスにおいても同様であることが予想される。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, Ueno H, Kumagai Y, Chiba S, Takada E, Ueno S, Tadokoro M, Suzuki N. Transfection with pax6 gene of mouse ES cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cell, in vitro. *Ophthalmic Research* 2009、印刷中。

#### 2. 学会発表

熊谷悠太、黒川真奈絵、上野宏樹、嘉山真紀、坪田一男、中辻憲夫、仁藤新治、上野聰樹、鈴木登. カニクイザル ES 細胞を用いた角膜上皮様細胞の分化誘導及び角膜移植への応用. 第 29 回日本炎症・再生医学学会、東京。

Taniguchi T, Chiba S, Kadoyama K, Nagata D, Tanaka S, KawaKami T, Suzuki N, Sagara E, Matsuyama S. Parkinsonism in Tauopathy: analysis of SJLB mice. 第 80 回日本動物学会、静岡。

H. 知的財産権の出願、登録状況  
特記事項なし。

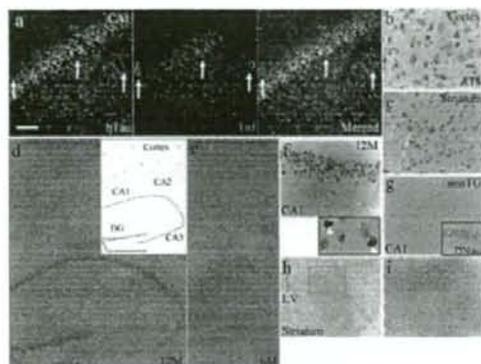


図1. タウ異常蛋白の蓄積とTUNEL法



図2. 海馬におけるタウ異常蛋白蓄積の月齢依存性変化

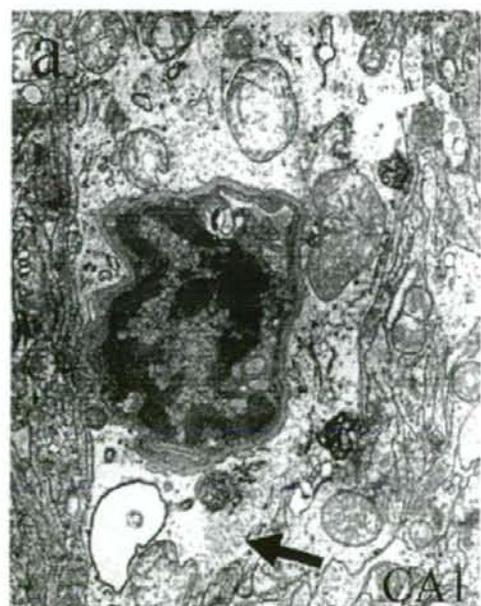


図3. 海馬におけるアポトーシスを起こした変

性神経細胞の電顕像

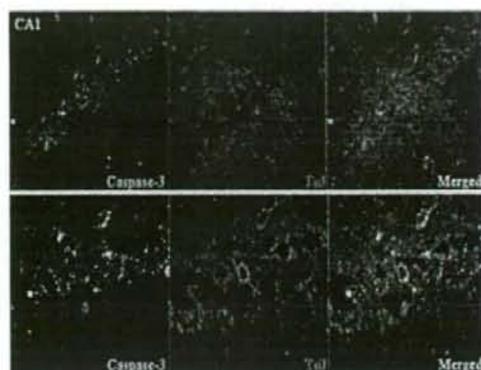


図4. 海馬でのCaspase-3経路を介したアポトーシスの証明

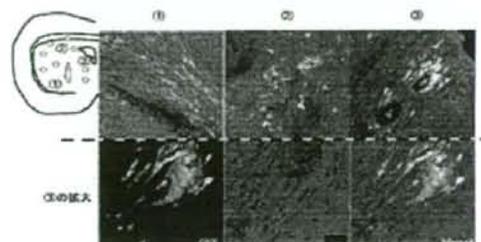


図5. 移植後のGFP陽性細胞の追跡および神経細胞の同定

研究要旨：頭部 MRI 所見と神経心理学的検査所見との関係を検討する。結果：①海馬体積は認知機能と強い相関が示され、特に見当識・言語記憶機能（再生機能と遅延再認機能）と関連する。②大脳皮質下病変のうち脳質周囲病変は言語記憶機能及び精神的敏捷性と関連する。しかし、いずれの関連性も海馬体積より低い。③大脳皮質下病変のうち大脳深部白質病変は認知機能と関連しない。

以上より、海馬萎縮性変化が特徴的なアルツハイマー病では脳室周囲病変が併存することで、より記憶機能・認知機能低下は重症化しやすい事が推測される。

#### A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 患者では海馬萎縮性変化の他に、脳室周囲病変 (PVH) や大脳深部白室病変 (DSWMH) が併存する症例が多く認められ、各々が相加的に認知機能に影響を及ぼす可能性が推測されるが詳細は不明である。そこで、MRI 画像上での海馬体積及び大脳皮質下病変と、認知機能障害の関係について検討した。

#### B. 対象と方法

物忘れを主訴に外来受診し、頭部 MRI 検査を施行した 101 名 (男性 30 名、女性 71 名、平均年齢 76.6 ± 7.3 歳)。対象者において MRI にて得られた画像より、海馬体積 (H)、頭蓋内体積 (C) を測定した。頭蓋内体積 (C) にて補正した海馬体積 (H) を補正海馬体積 (H/C) とした。大脳皮質下病変の評価については、『脳ドックのガイドライン 2008』の頭部 MRI の大脳白室病変の評価方法を使用した。認知機能評価は Mini-mental State Examination : MMSE と St. Marianna University's Computerized Memory Test : STM-COMET を使用した。H/C・PVH・DSWMH を説明変数とし回帰分析を施行した。なお、本研究は聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認を得たものであり、対象者には本研究の主旨を説明し、文書にて同意を得

#### C. 結果

①H/C は認知機能と強い相関が示され、特に見当識・言語記憶機能 (再生機能と遅延再認機能) と関連する。また、精神的敏捷性、注意持続性も関連するが、見当識・言語記憶機能と比べ、弱い。②PVH は言語記憶機能および精神的敏捷性と関連する。しかし、いずれの関連性も H/C より弱い。③DSWMH は認知機能と関連しない。

#### D. 考察

脳室周囲には皮質と皮質下・皮質下核など脳その他領域への長い繊維連絡が認められるため記憶および認知機能への影響が大きいと考えられる。ヒトには高齢となっても神経新生する神経幹細胞が海馬および脳室壁下層に潜んでいることが分かってきている。したがって、この 2 か所は記憶ならびに認知機能と密接に係ることが推測される。一方、皮質下深部白質領域にはより短い神経繊維や、隣接する脳回への線維連絡が主な神経経路となっており、記憶機能、特に言語記憶機能との関連は乏しいと考えられる。

#### E. 結論

海馬萎縮性変化が特徴的なアルツハイマー病では脳室周囲病変が併存することで、より記

憶機能・認知機能低下は重症化しやすい事が推測される。

#### F 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 山口登. 認知症の診断と治療, 神経精神医学雑誌, 第111巻1号, 2009(印刷中)
2. 三宅誕実, 宮本聖也, 竹内愛, 山田聡子, 田所正典, 大迫直子, 塚原さち子, 穴井己理子, 遠藤多香子, 諸川由実代, 山口登, 統合失調症患者の認知機能障害に対する blonanserin の効果: risperidone との無作為化二重盲検比較, 臨床精神薬理, 11巻, p315-326, 2008
3. 長谷川浩, 中村悦子, 朝倉幹雄, 山口登, 塩酸ドネペジル中断後に幻視体験が悪化したレビー小体型認知症の1例, 精神医学, 50巻, 2008
4. 中野三穂, 宮本聖也, 関野敬子, 三宅誕実, 富永桂一郎, 新妻聖子, 竹内愛, 加藤文太, 山田浩史, 平山俊和, 山口登, パーキンソンニズムを呈する若年発症前頭側頭型認知症の1症例, 精神科, 13巻3号, p257-261, 2008
5. 渡部廣行, 山口登, 【高齢者のめまい診断における pitfall】 高齢者の精神障害とめまい, ENTONI, 87号, p130-135, 2008
6. 関野敬子, 山口登, 高齢者認知症の薬物治療の効果, 日本医事新報, 4380号, p94-95, 2008
7. 長谷川浩, 中村悦子, 朝倉幹雄, 山口登. 塩酸ドネペジル中断後に幻視体験が悪化したレビー小体型認知症の一例. 精神医学 2008 ; 50 : 197-199
8. 杉山恒之, 中村悦子, 山口登. 期待される新規作用機序の抗認知症薬. 臨床精神薬理 2007 ; 10 (11) : 2019-2026
9. 中村悦子, 柳田浩, 山口登. アルツハイマー病の重症度と海馬体積および海馬左右比との関係. 老年精神医学雑誌 2007 ; 18 : 1217-1223
10. 長谷川浩, 朝倉幹雄, 中野三穂, 長田賢一, 山口登. 前頭側頭型認知症にパーキンソン症候群を合併した一例. 精神医学

2007 ; 49 : 1129-1132

11. A Ogino, T Sugiyama, N Yamaguchi, E Morioka, K Sekino, K Tominaga, I Utagawa, H Yanagida, H Watanabe, A Aoba. The efficacy for cognitive function of donepezil hydrochloride in Alzheimer-type dementia and its related factors: comparison between medicated and non-medicated groups over 12 months. International Clinical Psychopharmacology 2006 ; 21(4) : A17
  12. 関野敬子, 渡部廣行, 山口登. アルツハイマー型認知症の早期診断基準の検討-海馬萎縮と記憶機能障害についての3年間の縦断的研究- 老年精神医学雑誌 2006 ; 17(8) : 883-891
  13. 杉山恒之, 山口登. アルツハイマー型認知症の薬物療法-抗認知症薬の効能と限界- 臨床精神薬理 2006 ; 9(9) : 1783-1791
  14. 山口登. 認知症患者への病名告知に関する研究 公衆衛生 2006 ; 70(9) : 690-691
  15. 山口登. 認知症診断の要点と治療 町田市医師会報 2006 ; 403 : 1-4
  16. 荻野あずみ, 杉山恒之, 山口登. アルツハイマー型認知症の記憶・認知機能障害に対する donepezil の効果内容と効果出現の関連因子について 臨床精神薬理 2007 ; 10 (1) : 93-101
  17. 山口登. 塩酸ドネペジルの使い方-家族、介護者への説明の重要性の観点から- CLINICIAN 2007 ; 558(54) : 430-449
- ##### 2. 学会発表
1. M Okazaki, I Utagawa, C Hshimoto, A Tanaka, E Nakamura, K Sekino, K Tominaga, M Tadokoro, S Tsukahara, N Yamaguchi. Hypercholesterolemia in alzheimer's disease reduces the effects of donepezil hydrochloride. Collegium international neuropsychopharmacology -cum, Munich Germany July 2008 .
  2. 田中絢子, 岡崎味音, 中村悦子, 富永桂一郎, 関野敬子, 荻野あずみ, 穴井理己子, 塚原さち子, 田所典, 山口登. 認知機能と海馬体積及び大脳皮質下病変との関係

第23回老年精神医学会、神戸 2008年6月

3. 山口登, 臨床に役立つ認知症診療～Alzheimer 病の早期診断と薬物療法～  
第16回日本臨床精神神経薬理学会、北九州 2006年10月

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             特になし

分担研究報告書

新規アルツハイマー病治療戦略：5-HT<sub>4</sub> 受容体/ $\alpha$ セクレターゼ/ $A\beta$  生成抑制系に関する研究

研究分担者 松井宏晃 聖マリアンナ医科大学・大学院アイトーブ研究施設教授

研究要旨： $\alpha$ セクレターゼ活性化機構に共役するセロトニン 4(5-HT<sub>4</sub>)受容体遺伝子発現制御領域に GATA6 結合部位を同定した。GATA6 は、単独で 5-HT<sub>4</sub> 受容体遺伝子発現を促進したが、更に Sp family 転写因子あるいは C/EBP $\alpha$  との相互作用により、5-HT<sub>4</sub> 受容体遺伝子発現を著しく促進した。脳内に GATA6 の発現が認められること、並びにスタチンが GATA6 の DNA 結合活性を増加させることを踏まえ、本研究結果は、スタチン投与により 5-HT<sub>4</sub> 受容体発現量を高めることが可能であり、その状況下でアルツハイマー病治療薬として 5-HT<sub>4</sub> 作動薬の臨床効果を高めることが可能であることを示唆する。

#### A. 研究目的

アルツハイマー病(Alzheimer's disease;AD)はの主たる病因は、アミロイド $\beta$ (amyloid  $\beta$ ;A $\beta$ )ペプチドの脳内での産生・蓄積と考えられる。生理的条件下では、アミロイド前駆体タンパク質(amyloid precursor protein; APP)の細胞膜から12アミノ酸外側で細胞外ドメインを切断する酵素( $\alpha$ セクレターゼ)の作用により、A $\beta$ の過剰産生が抑制されている。 $\alpha$ セクレターゼ切断を受けたsAPP $\alpha$ は神経細胞保護作用を有し、細胞外へ分泌される。

一方、 $\alpha$ セクレターゼ切断を免れたAPPは、細胞膜から28アミノ酸外側でAPP細胞外ドメインを切断する酵素( $\beta$ セクレターゼ)および膜貫通部で切断する酵素( $\gamma$ セクレターゼ)の作用を受けA $\beta$ が生成される(アミロイド産生経路)。

神経系由来培養細胞を用いた研究から、セロトニン(5-HT)<sub>4</sub>受容体(5-HT<sub>4</sub>R)活性化は、cAMP上昇→Epac1活性化→Rap1、Rac活性化を介して $\alpha$ セクレターゼを活性化し、sAPP $\alpha$ の細胞外への分泌を促進させることが報告された。従っ

て、5-HT<sub>4</sub>R作動薬はAD治療薬としての可能性を秘めている。実際、国内外の製薬企業において、AD治療薬を目的とした選択的5-HT<sub>4</sub>R作動薬の創薬研究が開始されており、加えて初期段階ではあるが、5-HT<sub>4</sub>R作動薬を用いたAD治療の臨床試験も進行中である。しかし、ヒト脳における5-HT<sub>4</sub>R量が極めて僅か(他の神経伝達物質受容体の1/10~1/20)であるため、AD治療において5-HT<sub>4</sub>R作動薬の有効性を高めるには、脳内5-HT<sub>4</sub>R発現レベルを増加させ、高い状態に維持することが前提条件になるものと考えられる。我々は、平成19年度の研究から、ヒト5-HT<sub>4</sub>R遺伝子プロモーター領域の機能解析を行い、促進性転写因子としてSp familyおよびC/EBP $\alpha$ を同定した。平成20年度も、促進性転写因子の検索を引き続き行った結果、新たに、5-HT<sub>4</sub>R遺伝子発現を促進する転写因子として、GATA6を同定した。

#### B. 研究方法

ヒト 5-HT<sub>4</sub>R 遺伝子転写開始部位の 5' 上流～

exon1を含む領域 (-5712/+184)を pGL4 ベクターに接続後、順次 5'端からの欠失変異体および部位指向性突然変異体を作製する。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞 (内在性に 5-HT4R を発現する) に形質導入後、遺伝子発現調節領域を特定し、結合する転写因子を同定する。転写因子発現ベクター共形質導入法、転写因子 siRNA 法により転写因子機能を解析する。

### C. 研究結果

ヒト大腸ガン由来培養細胞Caco-2を用いた実験から、ヒト5-HT4R遺伝子転写開始部位の5'上流-174/-169に結合するGATA6を同定した。次に、GATA6のヒト5-HT4R遺伝子発現に及ぼす作用をSH-SY5Y細胞で調べた。その結果、GATA6過剰発現下で、ヒト5-HT4R遺伝子発現が促進されることを見出した。平成19年度の結果を踏まえ、SH-SY5YにSp family因子 (Sp1、Sp3、Sp4) あるいはC/EBPαをGATA6と共に過剰発現させると、ヒト5-HT4R遺伝子発現は、GATA6単独の場合に比して更に促進された。

### D. 考察

SH-SY5Y細胞において、-174/-169にGATA6が結合し5-HT4R遺伝子発現を促進することが明らかになった。GATA6は平成19年度の研究で同定した、-69/-39に結合するSp family因子、並びに+75/+111へ結合するC/EBPαと協動的に作用し5-HT4R遺伝子発現を促進すると推定された。最近、GATA6が広く脳内に発現すること、特に海馬、大脳皮質に発現量が多いこと、スタチンがGATA6のDNA結合活性を促進することが報告された。これらを踏まえると、本研究の成果から、スタチン投与→脳内GATA6 DNA結合活性増加→GATA6/Sp

family/C/EBPα協調作用増加→5-HT4R発現量増加→αセクレターゼ活性化→Aβ生成の抑制が推定される。従って、本研究結果は、スタチンと5-HT4R作動薬の併用という新たなAD治療戦略の可能性を示唆している。

### E. 結論

本研究成果は、基礎的知見から、「スタチンと5-HT4R作動薬併用投与による新規AD治療戦略」の可能性を示唆している。

### F. 健康危険情報

特記事項なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. T Hiroi, Y Okada, Y Masuda, R Kuwabara, H Kouyama, H Hasegawa, S Maruta, A Adachi, K Osada, M Asakura, N Yamaguchi, H Matsui. Regulation of the tryptophan hydroxylase-2 gene promoter activity in immortalized serotonergic RN46A cells. *Fundam Clin Pharmacol*, 22(Suppl.2)124-125(2008).

#### 2. 学会発表

なし

### 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

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

霊長類胚性幹細胞をもちいた認知症、アルツハイマー病に対する  
新規治療法開発に関する研究

研究分担者 長田賢一 聖マリアンナ医科大学医学部神経精神科教室

研究要旨

アルツハイマー病では tau の過剰なリン酸化による蓄積が報告されている。この tau の蓄積はユビキチン化により調節されており、Akt が重要な役割を果たしていることが近年明らかになった。

Wistar 系雄性ラットに Fluvoxamine, Milnacipran を各 5 mg/kg、3 週間皮下投与後の大脳皮質において、Akt-Ser473 リン酸化抗体、Akt-Thr308 リン酸化抗体を用いたイムノプロットの結果では、Akt の Ser473 リン酸化、Thr308 リン酸化が亢進し、さらにリン酸化された Akt が細胞質から核へ移行していると考えられた。

Fluvoxamine, Milnacipran の抗うつ薬が Akt のリン酸化を亢進していることは、tau の過剰なリン酸化を抑制する可能性が考えられ、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病では tau の過剰なリン酸化による蓄積が報告されている。この tau の蓄積はユビキチン化により調節されており、Akt が重要な役割を果たしていることが近年明らかになった (Dickey CA, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 ;105:3622)。Akt は CHIP (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein) /Hsp90 (heat shock protein 90) 複合体を調節し tau の過剰なリン酸化による蓄積に大きく影響している。CHIP はユビキチン酵素であり、Akt をユビキチン化し変性させる。また Akt が tau の S262/S356 のリン酸化を誘導し、CHIP を介する tau のユビキチン化による変性を減少させることが報告されている

Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) もアルツハイマー病での tau の過剰なリン酸化に関与する重要な酵素である。この GSK-3 $\beta$  も Akt によりリン酸化されることにより酵素の活性を調節されている。

従って、アルツハイマー病において Akt の役

割は重要である。今回は現在臨床でも多く使用されている抗うつ薬である SSRI である

Fluvoxamine と SNRI である Milnacipran の Akt のリン酸化に対する作用を検討した。

B. 研究方法

Wistar 系雄性ラット (150-300g) に Fluvoxamine, Milnacipran を各 5 mg/kg、3 週間皮下投与した。大脳皮質をホモジネートし、遠心分離により細胞質成分を分離した。さらに DEAE クロマトグラフィー施行後の各サンプルを用いたイムノプロットの実験を施行した。また大脳皮質切片を作成し avidin-biotin complex method を用いた免疫染色を施行した。  
(倫理面への配慮)

実験動物に関しては、聖マリアンナ医科大学中央実験動物委員会の指針に基づき、倫理的配慮をふまえた上で実験を行った。

C. 研究結果

Phospho-AKT (Ser473)、phospho-AKT (Thr308) 抗体を用いた大脳皮質の切片を免疫

染色した結果は、Fluvoxamine, Milnacipran を3週間投与後、リン酸化 Akt-Thr はそれぞれ25%, 42%の増加を認めた。同様にリン酸化 Akt-Ser はFluvoxamine, Milnacipran 投与後、それぞれ17%, 20%の増加を認めた。さらに強拡大では、ラット大脳皮質内にて、抗うつ薬投与後の核内での Akt リン酸化の増加とリン酸化された Akt の核への移行認められた。

Fluvoxamine, Milnacipran を3週間投与後の大脳皮質において、Akt 抗体を用いてのイムノプロットの結果は、Akt は細胞質成分では、22%、32%の減少を認め、核蛋白においては、130%、150%の増加を認めた。Fluvoxamine、Milnacipran 投与後、リン酸化 Akt-Thr の変化は細胞質成分では、180%、190%の増加を認め、核蛋白においても、111%、130%の増加を認めた。リン酸化 Akt-Ser の変化は細胞質成分では、145%、150%の増加を認め、核蛋白においても、173%、150%の増加を認めた。従って、対照群と比較して Akt-Ser473 リン酸化抗体、Akt-Thr308 リン酸化抗体を用いてのイムノプロットの結果では、Akt の Ser473 リン酸化、Thr308 リン酸化が亢進し、さらにリン酸化された Akt が細胞質から核へ移行していると考えられた。

#### D. 考察

今回の研究結果からは、Fluvoxamine, Milnacipran を3週間投与後の大脳皮質において、Akt-Ser473 のリン酸化、Akt-Thr308 のリン酸化が亢進していると考えられた。これは抗うつ薬が BDNF を介して PI-3 キナーゼを活性化し、Akt-Ser473、Thr308 のリン酸化を増加させる作用と考えられる。Akt は Thr308 と Ser473 の2箇所でリン酸化が行われ活性化される。活性化された Akt とアポトーシスとの関係については研究されてきたが、抗うつ薬との関係の報告はいまだ認められな

い。Akt のセロトニン系に対する作用としては、セロトニン自体がプロテインキナーゼ C、PI-3 キナーゼを活性化し、さらに Akt も活性化するとの報告がある。またセロトニンの分泌にも G 蛋白を介して Akt が関与している事を示唆する報告もある。Akt の上流には PI-3 キナーゼがあり、PI-3 キナーゼは Akt の PH ドメインに結合し Akt を活性化し Akt を細胞膜に結合させる(R.Meier)。この段階で PKD が Akt をリン酸化する。PKD には type1 と type2 の2種類のサブタイプがあり PDK1 は Thr308、PDK2 は Ser473 をリン酸化する。

Fluvoxamine, Milnacipran を3週間投与後、大脳皮質の核内での Akt リン酸化の増加とリン酸化された Akt の核への移行認められた。核内に移行した Akt は転写因子をリン酸化し、転写因子とコファクターの結合を調節し、転写を制御しているという報告がある(Vojtek B.A., Taylor J. 2003, Mol Cellular Bio. 23: 4417.)。よって抗うつ薬の可塑性が、Akt を介して、転写因子へ影響を及ぼす可能性が示唆された。

本結果から、Fluvoxamine, Milnacipran の抗うつ薬が Akt のリン酸化を亢進していることは、tau の過剰なリン酸化を抑制する可能性が考えられ、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。Akt の活性化がセロトニンの分泌にも関与している可能性があり、今後 Akt のリン酸化とセロトニン作用との関係について検討する必要があると思われる。

#### E. 結論

Fluvoxamine, Milnacipran の抗うつ薬が Akt のリン酸化を亢進していることは、tau の過剰なリン酸化を抑制する可能性が考えられ、アルツハイマー病の治療薬となりうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Otomo M, Takahashi K, Miyoshi H, Osada K, Nakashima H, and Yamaguchi N. Some selective serotonin reuptake inhibitors inhibit dynamin I GTPase, *Biol. Pharm. Bull.* Vol. 88, p1489-1495, 2008.

2. 長田 賢一、高橋清文、小川百合子、芳賀俊明、中野三穂、大友雅広、藤原圭亮、柳田拓洋、金井重人、田中大輔、貴家康男、長谷川 浩、朝倉幹雄、向精神薬の脳内濃度の調節するP糖蛋白質について、*精神科*、12(5),434-439, 2008.

3. A Misonoo, K Osada, M Nakano. Chronic treatment with fluvoxamine stimulates phosphorylation of Ser473 and Thr308 of AKT in the rat cerebral cortex, *36(3)*, 207-214, *聖マリアンナ医科大学大学雑誌*、2008.

4. 長田賢一、中野三穂、大友雅広、高橋清文。P糖蛋白質 - 向精神薬の脳内濃度の調節について - , *分子精神医学* 2008年8巻4号 p83-85.

5. 長田 賢一、富永桂一郎、岡 寛、西岡久寿樹、磯村達也、中村郁朗、高橋忍、小島綾子、日本語版 Fibromyalgia Impact Questionnaire (JFIQ) の開発: 言語的妥当性を担保した翻訳版の作成、*臨床リウマチ*、20 ; 19-28,2007.

6. 金井重人、朝倉幹雄、中野三穂、田中大輔、菱沼拓児、御園生篤志、長田 賢一、慢性ストレスによる聴性驚愕反応のストレス感受性亢進の持続、*日本神経精神薬理学雑誌*、27,13-18, 2007.

### 2. 学会発表

1. 長田 賢一、抗うつ薬を含めた精神科薬物療法、第2回繊維筋痛症研究会、2008,10.
2. K Osada, M Nakano, A Misonoo, S Kanai, D Tanaka, M Ootomo, Y Sasuga, K Takahashi, Y Ogawa, T Haga, M Asakura. Antidepressants induces phosphorylation of Akt in PC12, *Neuroscience 2008 meeting*, 2008,11.
3. Y Ogawa, H Matsui, K Osada, T Haga, M Nakano, A Misonoo, M Ootomo, K Takahashi, K Fujiwara, T Yanagida, S Kanai, D Tanaka, Y Sasuga, M Asakura. Fluorescence-based high-throughput method for milnacipran in vivo cells, *Neuroscience 2008 meeting*, 2008,11.
4. T Haga, K Osada, Y Ogawa, M Nakano, A Misonoo, M Ootomo, K Takahashi, K Fujiwara, T Yanagida, S Kanai, D Tanaka, Y Sasuga, M Asakura. Validation of a fluorescence-based high-throughput method for the cellular serotonin uptake activity, *Neuroscience 2008 meeting*, 2008,11.

## H. 知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得  
特記事項なし。
2. 実用新案登録  
特記事項なし。
3. その他  
特記事項なし。