

論文の内容の要旨

論文題目　メマンチンのアミロイドβ産生機構および凝集体形成に対する新奇薬理作用の解析

氏名　高橋 香織（戸籍名：伊藤 香織）

【序論】

アルツハイマー病（AD）は、認知症における割合が最も高く、記憶障害およびその他の知的活動能力の消失が認められる進行性の神経変性疾患である。現在まで根本的治療・予防法の開発に至っておらず、大きな社会問題となっている。認知症の適用で上市されている薬剤は認知機能を一時的に改善する症状改善薬とされ、いずれも根本治療薬ではなく、ADの治療につながる疾患修飾薬のニーズは非常に高い。

ADでは、病理学的な所見として、大脳新皮質や海馬を中心に、神経細胞の脱落による脳萎縮、アミロイドβタンパク質（Aβ）を主構成成分とする老人斑の蓄積、リン酸化タウからなる神経原線維変化が認められるのが特徴である。Aβの主な分子種としてはAβ40およびAβ42が存在し、うちAβ42は非常に凝集性が高く、毒性も強いとされている。Aβは、Amyloid precursor protein（APP）がβ-secretaseに切断されてsAPPβを生成し、その後γ-secretaseに切断されて生成される。一方、α-secretaseに切断され、sAPPαを生成し、その後γ-secretaseに切断されてp3を生成する「非アミロイド形成経路」も存在する。細胞生物学的解析から、APPの小胞輸送がAβ産生の調節に関与することが明らかになっており、特に、細胞表面からのAPPのエンドサイトーシスは、Aβ生成において重要なプロセスである。

ADの患者のほとんどが孤発性（SAD）であるが、APPやγ-secretaseのサブユニットであるプレセニリンに変異のある家族性AD（FAD）も存在する。一方でAβを産生しにくいAPP変異（Icelandic変異）を有する家系では認知症が発症しにくいことが報告されている。さらに、第21番染色体のトリソミーであるダウン症患者脳において、早期より老人斑の蓄積が見られることから、APP遺伝子とADとの関係が示唆される。これらの知見から、脳におけるAβの産生、凝集および蓄積の異常がADの発症に深く関与しているとする「アミロイド仮説」が支持されている。Aβが凝集した可溶性Aβオリゴマーや不溶化したAβ線維が神経細胞障害性を持ち、神経細胞死を引き起こして認知機能障害につながるという仮説である。

非競合的 N-methyl-D-aspartate（NMDA）受容体阻害剤であるメマンチンは、主に中等度から高度ADの治療薬として上市されている。NMDA受容体の活性調節によってAβやグルタミン酸などの興奮毒性による神経細胞の過剰な興奮を抑制し、神経細胞保護作用を示すことで、認知機能やそれに付随する行動・心理症状を改善すると考えられている。近年、メマンチンがTg2576マウスなどのADモデル動物の脳内Aβ量および蓄積を減少させ、それらによる障害を軽減する可能性が示唆されている。これまでの報告は、Aβ沈着が始まる前からのメマンチン投与による有効性

であるが、メマンチンの A β 蓄積に対する効果を臨床に近い条件で評価するためには、すでに沈着の始まった AD モデル動物に対する作用を検討することが望ましい。また、これらの動物モデルを FAD のモデルと位置づけると、SAD を模倣した正常動物の加齢に伴う脳内 A β 量の増加に対するメマンチンの作用については検討されていない。さらに、このようなメマンチンの脳内 A β 量低下作用に関するメカニズムについて、統一した見解はない。

【目的】

本研究では、すでに脳内に A β 蓄積の始まった AD モデル動物および正常加齢動物におけるメマンチンの脳内 A β 量および蓄積に対する作用を検証した。さらに、作用発現メカニズムを明らかにすることを目的として、メマンチンの作用点として考えうる「A β 産生阻害作用」、「A β 凝集抑制作用」および「A β 凝集解離作用」についてそれぞれ検討した

【結果と考察】

1. メマンチンの脳内 A β 量に対する作用

AD モデルマウスに対するメマンチンの脳内 A β 量やその蓄積に対する作用を明らかにするため、Tg2576 マウスを用いた検討を行った。Tg2576 マウスは、Swedish 変異のある APP を過剰発現させたマウスであり、6 ヶ月齢頃から脳内 A β が増加し、9-12 ヶ月齢で脳内にアミロイド斑が認められる。本研究では、すでにアミロイド斑が認められる 9 ヶ月齢からメマンチンを 1 ヶ月間投与した。その結果、メマンチンは Tg2576 マウスの脳内の可溶性および不溶性 A β 40 量、A β 42 量をいずれも減少させた。また可溶性 A β オリゴマー量も減少させた。

次に、正常動物の加齢に伴う脳内 A β 量増加に対するメマンチンの作用を明らかにするため、F344 ラットを用いた評価を実施した。F344 ラットは、加齢に伴い、記憶障害や脳内に不溶性の A β 42 が増加する (22 ヶ月齢以上) ことが報告されている。22 ヶ月齢の F344 ラットにメマンチンを 1 ヶ月間投与したところ、メマンチンが脳内不溶性 A β 42 量を減少させることを確認した。

上記の結果より、AD モデル動物および正常加齢動物モデルのいずれにおいてもメマンチンは脳内 A β 量を低下させる作用を示すことが確認できた。

2. メマンチンの A β 低下作用の作用点

2.1 A β 産生抑制作用

メマンチンによる A β 量の低下のメカニズムを明らかにするために、ラット初代培養大脳皮質神経細胞に培養 8-14 日 (DIV 8-14) でメマンチンを曝露したところ、培養上清中の A β 量は濃度依存的に減少した。しかし、APP、 α -secretase、 β -secretase、または γ -secretase のタンパクレベルでの発現量に変化は認められなかった。さらに、H4 細胞におけるいずれの APP 切断酵素の活性にも影響を与えず、また、メマンチンを 1 ヶ月間投与し、実際に A β 量の減少が認められた Tg2576 マウスの脳の細胞膜画分の各酵素の切断活性に影響がなかった。これらの結果から、メマンチンが各酵素に対する直接的あるいは間接的な活性化作用や阻害作用を有していないことが示された。

次に、メマンチンの APP 細胞内輸送に対する作用についても検討した。ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて、DIV 8 あるいは 14 にメマンチンを曝露させたところ、APP の総量を変化さ

せることなく、細胞表面の APP 量が有意に増加した。一方で、BACE1 の総量と細胞表面量は変化がなかった。このことから、メマンチンが APP エンドサイトーシスに特異的に抑制し、エンドソームでの β -secretase による切断を減少させる可能性が示唆された。

既報では NMDA 受容体を介した神経活動が $A\beta$ 産生を制御すること、また、メマンチンが NMDA 受容体を介して APP/BACE の共局在を妨げるという報告がある。これらは、本研究において我々が見出した、メマンチンによる APP エンドサイトーシスの阻害を介した β -secretase 切断抑制メカニズムを支持するものである。一方、本研究でのラット初代培養大脳皮質神経細胞に対する 7 日間の曝露実験においては、D-AP5 や MK-801 は $A\beta$ レベルを低下させたものの、その作用は限定的であった。すなわち、メマンチンの長期投与による $A\beta$ 産生抑制作用は主に NMDA 受容体非依存的な作用である可能性が高いことを示唆している。これは、NMDA 受容体活性が検出されない SK-N-SH 細胞においても、メマンチンが $A\beta$ 量を低下させるという報告とも一致する。メマンチンの長期投与は、NMDA 受容体経路とは独立して、クラスリン依存性エンドサイトーシスおよび APP の細胞内局在化に影響を及ぼす可能性がある。

2.2 $A\beta$ 凝集抑制作用

メマンチンの $A\beta$ 凝集抑制作用の有無を調べるため、アミロイド線維の β シート構造と結合すると強い蛍光を発する蛍光色素チオフラビン T (ThT) を用いて、メマンチンの $A\beta$ 凝集抑制作用の有無を検討した。メマンチン、 $A\beta$ 凝集抑制作用が報告されているメチレンブルー、およびメマンチンと同じアダマンタン骨格を有するアマンタジンをヒト $A\beta(1-42)$ とともに反応させ、その凝集形成に対する作用を評価したところ、メマンチンとメチレンブルーは有意に $A\beta$ 凝集形成を抑制したのに対し、アマンタジンには作用が認められなかった。本サンプルを、透過電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察したところ、線維状の $A\beta$ 凝集体の形成が、メマンチンによって抑制されていた。さらに、 $A\beta$ オリゴマー形成に対する作用について、6E10 ($A\beta$ モノマー、オリゴマーともに認識) および 11A1 (オリゴマーを特異的に認識) の 2 種類の抗 $A\beta$ 抗体を用いて、dot blot 法により評価した結果、メマンチンは $A\beta$ オリゴマー形成を抑制することが確認できた。続いて、長さの異なる $A\beta$ や FAD で発見された変異体 $A\beta$ およびマウス $A\beta$ に対する作用を検討した。各種 $A\beta$ ペプチドを用いて ThT アッセイにて評価したところ、メマンチンはヒト $A\beta(1-42)$ のみならず、種々の $A\beta$ に対しても広く凝集抑制作用を示した。

さらに、メマンチンと反応させた $A\beta$ 凝集体のもつ細胞傷害性について、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。ヒト $A\beta(1-42)$ とメマンチンを反応させた後、メマンチン自体の持つ神経細胞保護作用の影響を除くため、透析によりメマンチンを除き、神経細胞に添加してその生存率を評価した。その結果、溶媒と反応させた $A\beta$ 凝集体では神経細胞の生存率は低下したが、メマンチンと反応させた $A\beta$ 凝集体ではそれに比べて生存率が高く、細胞傷害性が減弱していることが確認された。

2.3 $A\beta$ 凝集解離作用

メマンチンの $A\beta$ 凝集解離作用の有無を調べるため、ヒト $A\beta(1-42)$ をあらかじめ凝集させた後で、メマンチンを反応させ、ThT アッセイおよび TEM 観察を実施した。その結果、いずれの評価

においてもメマンチンは濃度依存的に A β 凝集体を減少させた。このことから、メマンチンには A β 凝集体を直接的に解離させる作用がある可能性が示唆された。

【まとめ】

本研究では、AD モデルマウスおよび正常加齢動物を用いて、より臨床に近い条件でメマンチンの脳内 A β 減少作用を示すことができた。その作用メカニズムとして、APP の細胞内輸送を制御することによる「A β 産生阻害作用」、またヒト A β (1-42)のみならず、種々の凝集性のある A β ペプチドに対する「A β 凝集抑制作用」、さらに「A β 凝集解離作用」が関与している可能性が示唆された。以上の結果から、メマンチンは NMDA 受容体阻害に基づく神経保護作用のみならず、様々なアプローチで A β を減少させる作用を併せ持つ“疾患修飾薬”である可能性が示された。