

# 審査の結果の要旨

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の最も高い神経変性疾患であり、現在まで根本的治療・予防法の開発に至っていない。AD の病理学的特徴である老人斑を構成しているアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) の産生、凝集および蓄積の異常が AD の発症と深く関連しているという「アミロイド仮説」が広く支持されている。

非競合的 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体阻害剤であるメマンチンは、中等度から高度 AD の治療薬であり、NMDA 受容体の活性調節によって  $A\beta$  やグルタミン酸など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。近年、メマンチンが Tg2576 マウスなどの家族性 AD モデルと位置づけられる AD モデル動物の脳内  $A\beta$  量を減少させ、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、 $A\beta$  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  $A\beta$  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、孤発性 AD を模倣した正常動物の加齢に伴う脳内  $A\beta$  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  $A\beta$  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。

本研究では、すでに脳内に  $A\beta$  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  $A\beta$  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「 $A\beta$  産生阻害作用」、「 $A\beta$  凝集抑制作用」および「 $A\beta$  凝集解離作用」について、それぞれ検討した。

## 【方法と結果】

### 1. メマンチンの脳内 $A\beta$ 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  $A\beta$  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  $A\beta$  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、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  $A\beta_{40}$  量、 $A\beta_{42}$  量をいずれも減少させた。また可溶性  $A\beta$  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  $A\beta$  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  $A\beta_{42}$  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  $A\beta_{42}$  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  $A\beta$  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 $A\beta$ 低下作用の作用点

#### 2.1 $A\beta$ 産生抑制作用

メマンチンによる  $A\beta$  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  $A\beta$  量は濃度依存的に減少した。APP およびその切断酵素のタンパク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 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 $\beta$  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  $\beta$ -secretase による切断を減少させる可能性が示唆された。

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、他の NMDA 受容体阻害剤の A $\beta$  産生抑制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 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示された。

## 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  $\beta$  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) を用いて検討した。メマンチンをヒト A $\beta$ (1-42) とともに反応させ、A $\beta$  凝集形成過程に対する作用を評価したところ、有意に抑制が認められた。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 $\beta$  モノマー、オリゴマーともに認識する 6E10 およびオリゴマーを特異的に認識する 11A1 の 2 種類の抗 A $\beta$  抗体を用いた dot blot 法により、メマンチンが A $\beta$  オリゴマー形成を抑制していることが明らかとなった。また、長さの異なる A $\beta$  や FAD で発見された変異型 A $\beta$ 、さらにマウス A $\beta$  の凝集能に対する作用を ThT アッセイにて検討したところ、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 $\beta$  凝集体を減少させた。このことから、メマンチンには A $\beta$  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。

### 【総括】

本研究において、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 $\beta$  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 $\beta$  産生阻害作用」、また種々の凝集性のある A $\beta$  ペプチドに対する「A $\beta$  凝集抑制作用」、さらに「A $\beta$  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 $\beta$  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。以上の通り、本研究は AD の治療薬開発に大きく資するものであり、博士 (薬科学) の学位に相応しいものと考えられる。