アルツハイマー型老年期痴呆に対する神経成長因子戦略とモデル動物の作製

鍋島俊隆

名古屋大学医学部医療薬学・附属病院薬剤部,
〒466 名古屋市昭和区鶴舞町 65

**Nerve Growth Factor Strategy and Preparation of Animal Model
for Alzheimer-Type Senil Dementia**

Toshitaka NABESHIMA

*Department of Neuropsychopharmacology & Hospital Pharmacy,
Nagoya University School of Medicine, Showa-ku,
Nagoya 466, Japan*

(Received March 29, 1995)

Nerve growth factor (NGF) plays an important role in the survival and maintenance of cholinergic neurons in the central nervous system. In senile dementia of the Alzheimer type (SDAT), learning and memory are impaired by the loss of neurons in the magnocellular cholinergic neuronal system. It is, therefore, of interest to investigate the role of NGF in this degenerative disorder. Since NGF does not cross the blood-brain barrier and is easily metabolized by peptidases when administered peripherally, it can be used for medical treatment only when directly injected into the brain. We tried to develop drugs which could be taken orally and stimulate the NGF synthesis in the brain. In addition, we attempted to develop a SDAT animal model using osmotic minipump to infuse β -amyloid protein into cerebral ventricle, since there are no SDAT model animals accompanied with various pathophysiological changes.

We demonstrate here that the oral administration of propentofylline, idebenone and trimethylquinone derivative, potent *in vitro* NGF synthesis stimulators, induced the increase in NGF protein and mRNA, and in choline acetyltransferase activity, in basal forebrain-lesioned and aged rats, but not in intact young rats. These drugs also ameliorated the behavioral deficits in habituation, water maze, and passive avoidance tasks in these animals.

These results suggest that these drugs stimulated NGF synthesis *in vivo* and ameliorated the behavioral deficits which were accompanied with the reduced choline acetyltransferase activity in the basal forebrain-lesioned and aged rats.

In terms of the SDAT animal model, the performance of the water maze and passive avoidance tasks was impaired and choline acetyltransferase activity significantly decreased in β -amyloid protein-treated rats. Histochemical results showed the deposition of β -amyloid protein in the cortex and hippocampus and atrophy and loss of hippocampal neurons.

These results suggest that the deposition of β -amyloid protein in the brain is related to the impairment of learning and cholinergic neuronal degeneration, and

that β -amyloid protein-treated rats could be an animal model for SADT and used for the screening of drugs for SADT.

Key words—nerve growth factor (NGF); senile dementia of the Alzheimer type (SDAT); β -amyloid protein; learning-memory; neuronal degeneration; cholinergic neuronal system

はじめに

人口の高齢化とともに、老年期痴呆患者が急増しており、一大社会問題化しつつある。老年期痴呆はアルツハイマー型と脳血管性痴呆に大きく分類することができる。後者は、その原因の解明及び予防や治療方法が確立されつつあるが、前者は、現在のところ、その原因が解明されておらず、治療法も確立されていない。アルツハイマー型老年期痴呆は、1907年にアルツハイマーが初老期の痴呆患者において観察した病理学的所見を示す老年（65才以上）患者を言う。すなわち、その特徴的病理所見として、老人斑、神経原線維変化、神経細胞の顆粒空胞変性が観察される。それに伴って、シナプスが消失する。¹⁾ また、発病初期から、マイネルト基底核に局在しているコリン作働性神経の神経細胞が変性脱落し、マーカー酵素のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が、この神経の投射先の大脳皮質において低下し、それに伴って学習・記憶能も失われる。²⁾

アルツハイマー型痴呆のような神経変性疾患での中枢神経系の機能障害を改善する方法としては、いくつかの可能性がある。例えば、まず、第一に壊れたパーツである神経組織を交換する脳移植をする方法がある。この方法は、最も、理解し易い方法ではあるが、個々の人間をその人たらしめているのは、まさに脳そのものであり、他人の脳を移植することにより、その人がその人でなくなること、現在の移植では、脳死を基準として他の臓器の摘出を行っていることから、他人の脳は供給されないなどの欠点がある。可能性としては、堕胎をした胎児の脳細胞の利用が考えられるが、倫理面でやはり問題がある。現在までに試みられたのは、パーキンソン病患者に自分の副腎髄質クロム親和細胞をカテコールアミン産生をはかるために移植したケースがある。将来的には、自分のクローン細胞の利用なども考えられるが、まだまだ先のことであると思われる。

現在、臨床では変性、脱落からまぬがれた神経細胞の機能を賦活化することが試みられている。その1つが薬物による治療で、脳代謝賦活薬、脳エネルギー代謝改善薬及び脳循環改善薬が使用されている。他の1つがリハビリテーションによる治療で理学療法と作業療法が行われている。もう少し根本的な療法としては、脱落まではしていないが、萎縮したり、変性しかけている神経細胞の変性や死滅を防いだり、神経細胞の分化を促すような栄養（トロフィック作用を持つ）因子を利用する方法が考えられる。これには、ここで紹介する神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) を含む種々の神経栄養因子、ガングリオシドなどが試み始められている。

まず、最初に NGF がアルツハイマー型痴呆に対して有効ではないかと考えられたのは、NGF が前脳基底部を起始核として、中隔から海馬及び基底核から大脳皮質へ投射しているコリン作働性神経系の栄養因子としての作用を持つことが報告されたからである。^{3,4)} NGF は、コリン作働性神経系の機能を高め、⁵⁾ 海馬采を切断した時に中隔のコリン作働性神経細胞が死滅するのを防ぐ。⁶⁾ NGF は、前脳基底部のコリン作働性神経系を神経毒イボテン酸で破壊した時にみられるラットの学習・記憶障害を改善する。⁷⁾ NGF は、老齢ラットの萎縮した細胞を回

復し、学習・記憶障害を改善する。⁸⁾ 逆に、抗 NGF 抗体の活性フラグメントを脳室内に持続的に注入したり、抗 NGF モノ及びポリクローナル抗体を中隔へ持続的に注入すると、ラットの学習・記憶能が損傷され、神経細胞が萎縮し、^{9,10)} 海馬のコリンアセチルトランスフェラーゼの活性が低下する。¹¹⁾

NGF がコリン作働性神経の栄養因子であることに加えて、アルツハイマー型老年期痴呆では、低親和性 NGF 受容体 mRNA と受容体蛋白が患者の脳基底核に残存していること、¹²⁾ 及び受容体の親和性も最大結合量も対照群との間で差がないこと¹³⁾ が、NGF をアルツハイマー型老年期痴呆の治療の戦略に使う根拠となっている。この戦略が、具体性があるのはいかんと注目されるようになったのは、Olson ら (1992) が、アルツハイマー病の患者の脳室内へ NGF を 3 ヶ月間持続的に注入したところ、前頭及び側頭皮質での [¹¹C] ニコチンの結合量及び大脳皮質の血流量が増加し、後者の増加は NGF の注入を止めた 3 ヶ月後にも認められたこと、言語的エピソード記憶も改善されたことを報告してからである。¹⁴⁾

これらの結果は、NGF がアルツハイマー型老年期痴呆でのコリン作働性神経系の機能障害の治療に有効であることを示唆している。しかし、Olson らが採用した方法では、患者の頭蓋骨に穴をあけ、NGF を注入するためのカニューレを脳室内に植込んでおり、患者の quality of life を考える時、避けなければいけない方法である。NGF は、118 個のアミノ酸からなるペプチドであるために、末梢投与すると蛋白分解酵素で容易に分解され、吸収されても血液脳関門を通過することが難しい。これらの理由から、NGF を臨床において使用するには、NGF が蛋白分解酵素の影響を受けないで、血液脳関門を通過するような剤型を考えなければならない。

そこで我々は、経口投与が可能で、脳内に移行しやすい化学物質で、しかも、脳内で神経突起を伸展したり、NGF の合成分泌を賦活するような薬物がアルツハイマー型老年期痴呆の治療の重要な戦略になるという仮説のもとに研究を開始した。¹⁵⁾

アルツハイマー型痴呆では発症の初期よりマイネルト基底核のコリン作働性神経系が損傷を受けているので、このモデル動物として、前脳基底部のコリン作働性神経系を損傷した動物が汎用されてきた。しかし、上述したように、アルツハイマー型痴呆に認められる種々の特徴的病理所見を兼ね備えたモデル動物はなかった。老人斑には β -アミロイド蛋白が沈着しており、¹⁶⁾ β -アミロイド蛋白は *in vitro* で細胞毒性を示す。¹⁷⁾ 一方、ダウン症ではアルツハイマー型痴呆が頻発し、死後脳の研究によると、加齢に応じて老人斑、続いて神経原線維が発現してくる。これらのことから、 β -アミロイド蛋白がアルツハイマー型痴呆の発症の原因物質でないかという仮説がある。そこで、微量の β -アミロイド蛋白を脳室内へ持続的に注入することにより、アルツハイマー型痴呆モデル動物の作製を試みた。¹⁸⁾

1. 化学物質による培養神経細胞での神経突起の伸展及び NGF の合成分泌

1985 年に Morioka らは、プロテインキナーゼの阻害薬であるスタウロスポリンが培養 PC-12 神経細胞の突起を伸展することを報告した。¹⁹⁾ さらに、岐阜薬科大学の Furukawa らが、プロペントフィリン、²⁰⁾ Hayashi らがカテコールアミン誘導体、イデベノン及びトリメチルキノン誘導体 6-(4-hydroxybutyl)-2,3,5-trimethyl-1,4-benzoquinone³⁹⁾ が、休止アストログリア細胞において NGF の合成分泌を促進することを報告した。我々は、これらの報告に注目し、スタウロスポリン、プロペントフィリン、イデベノン及びトリメチルキノン誘導体を末梢投与することにより、前脳基底部破壊動物における学習・記憶障害が改善されるかどうか、また、脳内で NGF 含量が増加するのかどうか、さらに、前脳基底部破壊により惹起されたコリン作働性神経系の機能低下が回復するかどうかを *in vivo* で検討することにした。¹⁵⁾

2. NGF 様作用薬物は脳損傷動物における学習・記憶障害を改善するか？

ラットの前脳基底部に両側性に神経毒イボテン酸を注入すると、コリン作働性神経系を中心として、モノアミン作働性神経系の機能も低下する。その結果、水迷路学習、場所に対する慣れの学習及び受動的回避反応学習課題の学習・記憶の獲得や保持が悪くなる。例えば、水迷路学習課題では直径 140 cm の円形プールに水を張り、プラットホームを水面下に隠しておく。このプールにラットを入れると、ラットはプールから逃れるために、プール内を遊泳している間に偶然プラットホームを見つける。この訓練を繰り返すと、プール周辺の手懸かりを使ってプラットホームへ泳ぎ着くようになる。前脳基底部破壊動物では、訓練を重ねてもプラットホームへ泳ぎ着くまでの遊泳距離及び時間が短くなりにくい。

場所に対する慣れの学習課題では、ラットをホームケージから取り出し、ホームケージとは違ったケージで、ホームケージの設置されている場所とは異なる環境下で行動量を測定する。新奇場面にラットを置くと、ラットは探索行動を始め自発行動量が増加するが、同じ場所へ二度目に入れられた時には、その場所に対する記憶があることから新奇性が薄れ、探索行動量が減少する。この行動量の変化を学習・記憶の指標とする。前脳基底部破壊動物では、第一回目と第二回目の行動量の差が少なくなる。

受動的回避反応学習課題では、明室と暗室がギロチンドアで分けられており、暗室の床がグリッドから成る装置を使用する。ラットを明室へ入れると暗所を好む習性があるため、直ぐに暗室へ移動する。暗室へ入ったら直ちにギロチンドアを閉じ、床グリッドより電撃ショックを与える。次の日にラットを再び明室へ入れ、暗室へ移動するまでの時間（反応潜時）を測定する。ラットが前日受けた電撃による痛みを覚えていれば、反応潜時は延長する。前脳基底部破壊動物では、反応潜時が著しく短くなる。

2-1. スタウロスポリンによる学習・記憶障害に対する改善効果 前脳基底部の破壊 2 週間後から水迷路学習の訓練を開始し、1 日 1 回 2 週間訓練した。各訓練の 30 分前にスタウロスポリン (0.01, 0.03, 0.1 及び 0.3 mg/kg) を腹腔内へ投与した。受動的回避反応学習課題は水迷路学習課題の後に行った。スタウロスポリン (0.1 mg/kg) 2 週間投与群においてのみ、前脳基底部破壊による学習・記憶障害が改善され、水迷路学習課題でのゴールに泳ぎ着くまでの時間が短縮し、受動的回避反応学習課題での反応潜時が延長した。スタウロスポリン (0.3 mg/kg) は、後者の試験法では、毒性が認められ学習・記憶障害が悪化し、前者では無効であった。また、スタウロスポリンには血管拡張作用もあり、急性作用も考えられたので、スタウロスポリンの用量を下げ、投与は水迷路学習課題の訓練終了後に行った。すなわち、脳破壊の 2 週間後にスタウロスポリン (0.05, 0.1 及び 0.2 mg/kg) の投与を始め、その 2 週間後から水迷路学習課題の訓練を 1 日 1 回 2 週間行い、その後に受動的回避反応学習課題を行った。スタウロスポリン (0.05 及び 0.1 mg/kg) 4 週間投与により、水迷路学習課題の学習・記憶障害が改善され、スタウロスポリン (0.05, 0.1 及び 0.2 mg/kg) により、受動的回避反応学習課題の学習・記憶障害が改善された。^{22,23)}

2-2. プロペントフィリンによる学習・記憶障害に対する改善効果 プロペントフィリンは、脳血流量を増加し、²⁴⁾ 低酸素状態での脳代謝障害を改善し、²⁵⁾ 虚血による脳浮腫を改善する。²⁶⁾ また、アデノシンの取り込みを減少する。²⁷⁾ このアデノシン様作用により、虚血により惹起されるカルシウムカチオンの海馬の神経細胞内への流入及び壊死を防ぐ。^{28,29)}

そのため、プロペントフィリンは現在脳エネルギー代謝改善薬として脳血管障害後遺症の治療に使用されている。緒言で述べたように、プロペントフィリンは NGF 様作用を合わせ持つ

Fig. 1. Effects of 14-d Repeated Propentofylline Administration on Basal Forebrain Lesion-Induced Amnesia in Performance of the Water Maze Task by Rats³⁰⁾

●, sham; ▲, basal-forebrain-lesion + vehicle; □, basal forebrain-lesion + propentofylline (10 mg/kg); ■, basal forebrain-lesion + propentofylline (25 mg/kg). Each group consisted of 10 rats. Each value shows the mean. * $p < 0.05$ vs. sham group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. (basal forebrain-lesion + vehicle) group (Bonferroni's test).

ので、前脳基底部破壊動物の学習・記憶障害に対する効果を検討した。

前脳基底部の一侧にイボテン酸を注入1週間後に、他側にイボテン酸を注入し、その直後よりプロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg) の経口投与を始め、その2週間後より水迷路学習課題を1日1回10日間訓練し、その1日後慣れの学習課題の訓練、その1日後に慣れの学習課題の保持試行を行った。引き続き受動的回避反応学習課題の学習訓練を行った。学習・記憶試験中のプロペントフィリン投与は訓練直後に行った。

プロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg) 投与群において、水迷路学習課題における学習・記憶障害は改善され、学習・記憶能は偽手術群と同程度のレベルにまで回復した (Fig. 1)。

場所に対する慣れの学習課題では、プロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg, 24 日間投与) は学習・記憶障害を用量依存的に改善し、25 mg/kg では、偽手術群と同程度の学習・記憶レベルとなった (Fig. 2)。

受動的回避反応学習課題でも、プロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg, 26 日間投与) は、偽手術群のレベルまで学習・記憶能を回復した。³⁰⁾

アデノシンは脳血流量を増加する作用を有していることから、³¹⁾ プロペントフィリンの学習・記憶障害に対する作用が、アデノシン様作用によるものかどうか確かめるために、アデノシン拮抗薬テオフィリン (10 mg/kg) が、プロペントフィリンの上記作用を阻害するかどうか検討した。テオフィリンはプロペントフィリンの受動的回避反応学習課題における学習・記憶障

Fig. 2. Effects of 24-d Repeated Propentofylline Administration on Basal Forebrain Lesion-induced Amnesia in the Performance of the Habituation Task by Rats³⁰⁾

□, first day; ■, second day. Each group consisted of 10 rats. Each value shows the mean and S.E. ** $p < 0.01$ vs. the corresponding first day's count. @ $p < 0.05$ vs. sham group, # $p < 0.05$ vs. (basal forebrain-lesion + vehicle) group (Sign-Wilcoxon's test).

害改善作用に何ら影響を及ぼさなかった。このことから、上記プロペントフィリンの作用は、アデノシン様作用によらないことが示唆された。³⁰⁾

2-3. イデベノン及びトリメチルキノ誘導体による学習・記憶障害に対する改善効果

イデベノンは脳エネルギー代謝障害を改善し、³²⁾ 脳グルコース利用率、酸素消費を促進する。³³⁾ その結果、脳浮腫の発現を抑制する。^{34,35)} また、脳動脈硬化進展に関与するフリーラジカルの放出や過酸化脂質の生成を抑制する。³⁶⁻³⁸⁾

しかし、脳血流量に対しては影響を及ぼさないことから、脳エネルギー代謝を賦活することによって脳機能低下を改善するものと考えられる。³²⁾ そのため、イデベノンは現在、脳エネルギー代謝改善薬として脳血管障害後遺症の治療に使用されている。

プロペントフィリンと同様に、イデベノンとトリメチルキノ誘導体は、培養アストログリア細胞で NGF の合成分泌を促進する。²¹⁾ そこで、前脳基底部の一側にイボテン酸を注入後 1 週間してから他側にも注入し、その直後よりイデベノン (20 mg/kg) 及びトリメチルキノ誘導体 (5, 10 及び 20 mg/kg) を 1 日 1 回経口投与した。

投与 10 及び 11 日目に、場所に対する慣れの学習課題を、投与 23 日目から 27 日目に水迷路学習課題を 1 日 2 回訓練した。投与 28 及び 29 日目に受動的回避反応学習課題を行った。

慣れの学習課題では、イデベノンが、前脳基底部破壊による学習・記憶障害を改善し、偽手術群のレベルまで学習・記憶能を回復した。トリメチルキノ誘導体は、10 mg/kg をピークとするベル型の用量反応曲線を示したが、どの用量でも有意な効果は認められなかった。一方、水迷路学習課題における学習・記憶障害に対しては、イデベノン (20 mg/kg)、トリメチルキノ誘導体 (10 及び 20 mg/kg) は用量依存的にプラットホームに泳ぎ着くまでの遊泳時間を短縮し、20 mg/kg では、偽手術群とほぼ同じ学習曲線を示した。受動的回避反応学習課題の学習・記憶障害に対しては、イデベノン (20 mg/kg) 及びトリメチルキノ誘導体 (5, 10 及び 20 mg/kg) のどの用量でも改善作用を示した (Fig. 3)。^{39,40)}

3. 脳損傷動物における神経機能障害を NGF 様作用薬物は改善するか？

前脳基底部をイボテン酸で破壊すると、前頭-頭頂皮質のコリンアセチルトランスフェラーゼの活性が低下するが、スタウロsporin (0.05, 0.1 及び 0.2 mg/kg) を破壊 2 週間より 4 週間投与したところ、0.1 mg/kg の用量で、低下した酵素活性を有意に回復した。²³⁾

プロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg) を 1 日 1 回 28 日間投与したところ、前脳基底部破壊による前頭及び頭頂皮質のコリンアセチルトランスフェラーゼの活性低下に対しては無効であったが、学習・記憶に重要な役割を果たしている海馬の酵素活性が 25 mg/kg 投与群で有意に上昇した。³⁰⁾ 同様なスケジュールでプロペントフィリンを経口投与後、脳切片を作製し、³H]quinuclidinyl benzilate methyl chloride (QNB) を使用してムスカリン様アセチルコリン受容体の結合能を画像解析法により検討した。前脳基底部を破壊すると、海馬、前頭及び

Fig. 3. Effects of Idebenone (IDE) and Trimethylquinone (TMQ) on Performance in the Passive Avoidance Task^{39,40)}

Each value represents a median (column) and interquartile range (number in parenthesis) of step-through latency. The test was carried out on days 28 and 29 of administration. * $p < 0.05$ vs. sham, # $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. basal forebrain-lesion + vehicle (two-tailed Mann-Whitney U-test).

Fig. 4. Effects of IDE and TMQ on Choline Acetyltransferase Activity in Basal Forebrain-Lesioned (A) and Intact (B) Rats^{39,40)}

Choline acetyltransferase activity was measured after 21 days of successive administration of the drugs. Each column shows the mean $\pm$ S.E. First column, sham; 2nd column, vehicle; 3rd column, IDE (20 mg/kg); 4th column, TMQ (5 mg/kg); 5th column, TMQ (10 mg/kg); 6th column, TMQ (20 mg/kg). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. sham, # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. basal forebrain-lesion + vehicle (Tukey's test).

Fig. 5. Effects of IDE and TMQ on Nerve Growth Factor Content in Basal Forebrain-Lesioned (A) and Intact (B) Rats^{39,40)}

Nerve growth factor was measured by enzyme immunoassay after 21 days of successive administration of the drugs. Each column shows the mean $\pm$ S.E. First column, sham; 2nd column, vehicle; 3rd column, IDE (20 mg/kg); 4th column, TMQ (5 mg/kg); 5th column, TMQ (10 mg/kg); 6th column, TMQ (20 mg/kg). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. sham, # p < 0.05, ## p < 0.01 vs. basal forebrain-lesion + vehicle (Tukey's test).

頭頂皮質の受容体の親和性が低下し、最大結合量が増加した。プロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg) は用量依存的に低下した親和性を上昇し、増加した最大結合量を減少し、偽手術群のレベルに保った。低濃度の [^3H]QNB を使用して結合量を画像上で解析すると、前脳基底部破壊動物の脳切片では、偽手術群のそれと比べると著しく減少していた。プロペントフィリン投与群では、用量依存的に結合量が増加し、偽手術群との間に差が見られなくなった。⁴¹⁾

イデベノン (20 mg/kg) 及びトリメチルキノン誘導体 (5, 10 及び 20 mg/kg) を 1 日 1 回 21 日間投与後、コリンアセチルトランスフェラーゼの活性を測定したところ、正常動物の脳内酵素活性には何ら影響を及ぼさなかったが、前脳基底部破壊動物における頭頂皮質での酵素活性低下を両薬物とも 20 mg/kg の用量で防ぎ、偽手術群のレベルに保った。海馬では、両薬物ともすべての用量で酵素活性を有意に増加した (Fig. 4)。

4. NGF 様作用薬物は脳内の NGF や NGFmRNA 含量を増加するか？

培養アストログリア細胞での NGF の合成分泌を促進する化学物質が、経口投与により、脳損傷動物の学習・記憶障害を改善したり、コリンアセチルトランスフェラーゼの活性低下を防いだりしたが、脳内の NGF やその mRNA 含量を増加しているかどうかを明らかにするため、酵素免疫測定法及び RT-PCR 法でそれぞれ測定した。

イデベノン (20 mg/kg) 及びトリメチルキノン誘導体 (5, 10 及び 20 mg/kg) を 21 日間投与後測定したところ、正常動物の脳内 NGF 含量には全く影響を及ぼさなかったが、脳損傷動物の海馬の NGF 含量をイデベノン (20 mg/kg) 及びトリメチルキノン誘導体 (10 及び 20 mg/kg) は有意に増加した。トリメチルキノン誘導体の作用は用量依存的であった (Fig. 5).^{39,40)}

脳損傷動物の NGFmRNA については、イデベノン (10 及び 20 mg/kg) を 21 日間投与後、最終投与の 12 時間後に測定したところ、用量依存的に mRNA の含量が前頭、頭頂皮質及び海馬で増加していた (Fig. 6).⁴⁰⁾

プロペントフィリンとイデベノンの *in vivo* での NGF 合成促進作用を他の動物モデルで確認するため、老齢ラットで NGF 含量が低下することから、⁴²⁾ 老齢ラットの低下した NGF 含量を回復するかどうか検討した。

24 ヶ月齢のラットにプロペントフィリン (10 及び 25 mg/kg) 及びイデベノン (10 及び 20 mg/kg) を 1 日 1 回 21 日間経口投与し、8 週齢の若齢ラットにはイデベノン 20 mg/kg のみ投与した。投与 24 時間後に NGF 含量を測定し

Fig. 6. A—C Effects of Idebenone on the Expression of NGF mRNA in the Frontal Cortex (A), Parietal Cortex (B) and Hippocampus (C).⁴⁰⁾

In all pictures, lanes 1, 2, 3, and 4 show the NGF mRNA signal in the PCR of total RNA obtained from each brain region of vehicle, idebenone (10 mg/kg) and idebenone (20 mg/kg)-treated, and sham-operated rats, respectively. Rats were decapitated 12 h after the last administration of idebenone.

Table 1. Effects of Idebenone and Propentofylline on Brain NGF Content (pg/g Wet Weight) in Aged Rats^{43,44)}

Treatment	n	Olfactory bulb	Frontal cortex	Parietal cortex	Septum	Hippocampus
Young rats						
Vehicle	4	1773.3±337.0	3525.0±562.9	2958.3±454.8	507.7±122.9	5450.0±689.3
Aged rats						
Vehicle	4	1947.0±488.4	560.5±263.0 ^{b)}	1980.0±280.1 ^{a)}	426.0±39.1	2957.5±677.7 ^{a)}
Idebenone						
(10 mg/kg)	4	1471.0±166.1	1994.4±219.9 ^{c)}	3048.0±375.9 ^{c)}	381.0±81.1	4172.0±292.2
(20 mg/kg)	4	1420.0±264.9	1556.0±147.4 ^{c)}	2681.0±149.5	468.0±74.7	3990.0±746.6
Propentofylline						
(10 mg/kg)	4	1186.7±80.1	1850.0±101.0	3286.7±413.3 ^{c)}	486.0±68.9	2723.3±799.9
(25 mg/kg)	4	1311.2±271.2	2184.0±224.0 ^{c)}	2564.0±384.7	1080.8±574.2	2860.0±441.1

Values represent means±S.E. NGF was measured by EIA after 21-d successive administration of idebenone (10 and 20 mg/kg) and propentofylline (10 and 25 mg/kg). a) $p < 0.05$, b) $p < 0.005$ vs. vehicle-treated young rats, c) $p < 0.05$ vs. vehicle-treated aged rats.

Table 2. Effects of Idebenone on Brain NGF Content (pg/g Wet Weight) in Young Rats⁴⁴⁾

Treatment	n	Olfactory bulb	Frontal cortex	Parietal cortex	Septum	Hippocampus
Vehicle	4	1052.0±144.8	4227.5±1087.7	3880.0±698.6	315.8±14.0	5253.3±141.4
Idebenone						
(20 mg/kg)	4	1452.3±121.5	3946.7±897.0	3083.1±1072.7	286.5±96.1	4933.3±450.4

Values represent means±S.E. NGF was measured by EIA after 21-d successive administration of idebenone (20 mg/kg).

た。老齡ラットでは前頭皮質、頭頂皮質及び海馬の NGF 含量が低下していたが、嗅球及び中隔の NGF 含量は若齡動物と変わらなかった。プロペントフィリン及びイデベノン、前頭及び頭頂皮質の NGF 含量の低下を回復した。プロペントフィリンは、前者では 25 mg/kg、後者では 10 mg/kg で有意であった。⁴³⁾ 一方、イデベノンは、前者では 10 及び 20 mg/kg、後者では 10 mg/kg で有意であった (Table 1)。しかし、イデベノン 20mg/kg は若齡群の脳内 NGF 含量に対してどの部位においても影響を及ぼさなかった (Table 2)。⁴⁴⁾

5. β -アミロイド蛋白脳室内持続的注入によるアルツハイマー型痴呆モデル動物の作製

緒言で述べたように、 β -アミロイド蛋白がアルツハイマー型痴呆の原因物質であることが疑われており、この物質を脳内に単回投与して、痴呆モデル動物を作製することが多くの研究者により試みられたが、再現性のないものであった。老人斑は加齢に伴って徐々に沈着することから、我々は浸透圧ミニポンプを使用して、 β -アミロイド蛋白を脳室内に徐々に沈着させることにより、痴呆モデル動物が作製できるのではないかと試みた。^{18,45)}

ラットの脳室 (A -0.3, L 1.1, V 3.6) ヘカニューレを挿入し、これに β -アミロイド蛋白 (1—40) を入れた浸透圧ミニポンプ (Alzet 2002) を繋いだ。ミニポンプはラットの背部皮下に植え込んだ。 β -アミロイド蛋白の注入量は 0, 3, 30 及び 300 pmol/d とし、注入を始めてから 9—13 日目に水迷路学習課題、13—14 日目には受動的回避反応学習課題を行った。14 日目に屠殺し、脳を摘出し半数はコリンアセチルトランスフェラーゼ及びコリンエステラーゼ活性の測定に、残りは β -アミロイド蛋白の沈着の有無の確認などの組織化学的測定に供した。

溶媒持続的注入群の動物では、学習・記憶障害は認められなかったが、 β -アミロイド蛋白

(300 pmol/d) 持続的注入群では、水迷路学習課題においてプラットホームへの到達時間が延長し (Fig. 7), 受動的回避反応学習課題の反応潜時が短縮し、学習・記憶障害が認められた。

β -アミロイド蛋白持続的注入群では、海馬及び大脳皮質に β -アミロイド蛋白が沈着しており (Fig. 8), 前頭皮質及び海馬のコリンアセチルトランスフェラーゼ活性が低下していた (Fig. 9). また、海馬の神経細胞の萎縮、脱落及びグリア細胞の活性化が認められた。このように、我々の作製したモデル動物はアルツハイマー型痴呆の多くの病理学的特徴を兼ね備えていた。

おわりに

In vitro で NGF 様作用を示す化学物質プロペントフィリン、イデベノン及びトリメチルキノ誘導体などを経口投与すると、脳損傷動物や老齢動物のような脳細胞の萎縮や脱落が認められる動物の脳内で、NGF 含量やその mRNA の発現の増加が認められた。しかし、若齢動物にイデベノンを投与しても、NGF 含量は脳のどの部位においても変化しなかった。アストログリア細胞は加齢によって活性化され、^{46,47)} イボテン酸で前脳基底部を破壊すると、前脳皮質のアストログリア細胞が活性化される。⁴⁸⁾ 興味あることに、アルツハイマー病の大脳皮質のアストログリア細胞も活性化されている。^{50,51)} 上述したように、培養アストログリア細胞は NGF を合成する。^{52,53)} 正常状態では、NGF は神経細胞で合成されているが、⁵⁴⁾ 損傷を受けた

Fig. 7. Effects of Continuous Infusion of β -Amyloid Protein on the Performance in the Water Maze Task⁴⁵⁾

Each value represents a mean of latency. The task was carried out the day 9–13 after the start of infusion of β -amyloid protein. * $p < 0.05$ vs. vehicle (β -amyloid protein: 0 pmol/d-treated rats (Tukey's test).

○, 0 pmol/d; ●, 3 pmol/d; ■, 30 pmol/d; ▲, 300 pmol/d.

Fig. 8. The Desposition of Immunoreactivity with β -Amyloid Protein⁴⁵⁾
 β -Amyloid protein was infused into the cerebral ventricle for 14 d.

脳部位では活性化されたアストログリア細胞でも合成される。⁵⁵⁾ したがって、*in vitro* において NGF 合成を促進する上記薬物は、損傷を受けた脳や老化した脳において活性化されたアストログリア細胞における NGF の合成を促進していると考えられる。

プロペントフィリン、イデベノン及びトリメチルキノン誘導体は *in vivo* でも NGF の合成を促進し、イデベノンは NGF mRNA の発現も増加した。NGF はコリン作働性神経の生存を維持しているといわれており、これら薬物も前脳基底部破壊動物の頭頂皮質におけるコリンアセチルトランスフェラーゼの活性低下を回復したり、海馬での活性を増加した。さらに、プロペントフィリンはムスカリン様受容体の機能低下を改善した。

学習・記憶には大脳皮質と海馬が重要な役割を果たしていることが知られており、これら薬物は前脳基底部破壊動物の学習・記憶障害を改善すると考えられる。

以上の点から、NGF の合成を促進する薬物をスクリーニングする上で培養マウスアストログリア細胞を使用するのは理にかなっている。近い将来、アルツハイマー病などの神経変性を伴う痴呆の初期診断が可能となり、NGF 合成を促進する薬物が神経細胞が脱落する前の段階、神経細胞の萎縮が認められるような状態に適用されれば治療に有効かと思われる。

しかし、イボテン酸で前脳基底部を破壊するとコリン作働性神経系以外の神経にも損傷が認められること、上記薬物は NGF 合成促進作用以外にも脳のエネルギー代謝、血液レオロジー因子の改善などの作用もあるので、これらの要因も考える必要がある。

また、アルツハイマー病患者の死後脳では NGF mRNA の発現も、⁵⁶⁾ NGF 蛋白含量も⁵⁷⁾ 変化していないこと、アルツハイマー病患者の脳では成長抑制因子が減少するため、むしろ NGF 活性が高くなる⁵⁸⁾ などの報告があり、NGF による戦略がアルツハイマー病の治療に有効かどうかは、より臨床像を反映したアルツハイマー病動物モデルを開発して NGF の効果を詳細に検討する必要がある。さらに最近では、NGF ファミリーやその受容体のクローニングの成功についても多数報告されているが、その生理作用や作用機序などの詳細なことは、まだ明らかになってはいない。しかし、これまで述べてきたような NGF 様の作用を考える時、これら栄養因子をアルツハイマー病に対する戦略に使うことができないか検討する必要がある。

アルツハイマー型痴呆のモデル動物としては、 β -アミロイド蛋白の遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの開発などが試みられている。しかし、ヒトで認められるような病理学

Fig. 9. Effects of Continuous Infusion of β -Amyloid Protein on ChAT Activity in the Frontal Cortex, Parietal Cortex, Striatum, and Hippocampus in Rats⁴⁵⁾

Rat was decapitated and brain was removed for ChAT activity assay after the two week continuous infusion of β -amyloid protein (0, 3, 30, 300 pmol/d). Each column shows the mean $\pm$ S.E.M. of four animals. * $p < 0.05$ vs. vehicle (β -amyloid protein: 0 pmol/d)-treated rats (Tukey's test).

□, 0 pmol/d; ▨, 3 pmol/d; ▩, 30 pmol/d; ■, 300 pmol/d.

的变化を示すようなモデル動物の作製に成功していなかったが、この稿を終える直前の1995年2月9日号のNatureに、アルツハイマー型の神経病理所見を示すトランスジェニックマウスの開発に成功したという報告が掲載された。⁵⁹⁾ 我々の開発したアルツハイマー型痴呆のモデル動物は、上述したように、アルツハイマー型痴呆の種々の病理学的特徴を兼ね備えており、特殊な技術を必要とせず、簡単に作成できるので、現在のところ、ラットを使用したモデルとしては最も病態を反映したモデルといえよう。今後、このモデル動物の種々の生理機能の変化をより詳細に検討して、アルツハイマー型痴呆の発症機序の解明や抗痴呆薬の開発に役立てたい。

謝辞 本研究は、主として名古屋大学医学部において、長谷川高明、山田清文、新田淳美の各博士、伊藤亜紀雄修士、福田種男、成橋和正、西村京子の各学士、大西丈二、荻原由子の両学生の御協力によりなされたものである。また、研究の多くは、岐阜薬科大学・林 恭三前教授、古川昭栄教授、古川美子、村瀬勝人の各博士、竹内理恵、村上 豊、川面 渉の各修士、名城大学薬学部・亀山 勉教授、平松正行博士、小川伸一、富士和之、林 佐織の各修士との共同研究として行われた。この論文作製に当たっては、中山 忍、高村美香両学士の多大な尽力を得た。これらの方々に深謝致します。本研究の一部は、サンド老化及び老年医学研究基金、厚生省長寿科学総合研究費(91A-2406)、喫煙科学研究財団、臨床薬理研究振興財団、文部省科学研究費、一般研究B(#05454148)、日本脳神経財団、及び上原記念生命科学財団の研究助成によった。スタウロスポリン、プロペントフィリン及びイデベノン、それぞれ旭化成工業、ヘキストジャパン及び武田薬品工業K.K.より提供をしていただいた。

引用文献

- 1) Coyle J. T., Price D. L., Delong M. R., *Science*, **219**, 1184 (1983).
- 2) Bartus R. T., Dean R. L., Beer B., Lippa A. S., *Science*, **217**, 408 (1982).
- 3) Hefti F., Harrikka J., Eckenstein F., Gnahn H., Heumann R., Schwab M., *Neuroscience*, **14**, 55 (1985).
- 4) Hefti F., *J. Neurosci.*, **6**, 2155 (1986).
- 5) Mobley W. C., Rutowski J. L., Tennekoon G. I., Buchanan K., Johnston M. V., *Science*, **229**, 284 (1985).
- 6) Williams L. R., Varon S., Peterson G. M., Wilcortin K., Fischer W., Björklund A., Gage H. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 9231 (1986).
- 7) Ogawa S., Nabeshima T., Kameyama T., Hayashi K., *Jpn. J. Pharmacol.*, **61**, 141 (1993).
- 8) Fischer W., Wilcortin K., Björklund A., Williams L. R., Varon S., Gage F. H., *Nature* (London), **329**, 65 (1987).
- 9) Nabeshima T., Ogawa S., Ishimaru H., Kameyama T., Fukuta T., Takeuchi R., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **175**, 215 (1991).
- 10) Nabeshima T., Ogawa S., Yamada K., Ishimaru H., Fuji K., Kameyama T., Fukuta T., Takeuchi R., Hayashi K., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **74**, 141 (1991).
- 11) Nitta A., Murase K., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Neuroscience*, **57**, 495 (1993).
- 12) Hefti H., Mash D. C., *Neurobiol. Aging*, **10**, 75 (1989).

- 13) Treanor J. J. S., Dawbarn D., Allen S. J., Macgowan S. H., Wilcock G. K., *Neurosci. Lett.*, **121**, 73 (1991).
- 14) Olson L., Nordberg A., von-Holst H., Bäckmann L., Ebendal T., Alafusoff I., Amberla K., Hartvig P., Herlitz A., Lilja A., Lundqvist H., Längstrom B., Meyerson B., Persson A., Viitanen M., Winblad B., Seiger Å, *J. Neural Transm. [Park. Dis. Dement. Sect.]*, **4**, 79 (1992).
- 15) Nabeshima T., Nitta A., Fuji K., Kameyama T., Hasegawa T., *Gerontology*, **40**, 46 (1994).
- 16) Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L., Beyreuther K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4245 (1985).
- 17) Yankner B. A., Duffy L. K., Kirschner D. A., *Science*, **250**, 279 (1990).
- 18) Nabeshima T., Nitta A., *Tohoku J. Exp. Med.*, **174**, 241—249 (1994).
- 19) Morioka H., Ishihara M., Shibai H., Suzuki T., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1957 (1985).
- 20) Shinoda I., Furukawa Y., Furukawa S., *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1813 (1990).
- 21) Takeuchi R., Murase K., Furukawa Y., Furukawa S., Hayashi K., *FEBS Lett.*, **261**, 63 (1990).
- 22) Nabeshima T., Ogawa S., Nishimura H., Fuji K., Kameyama T., Sasaki Y., *Neurosci. Lett.*, **122**, 13 (1991).
- 23) Nabeshima T., Ogawa S., Nishimura H., Fuji K., Kameyama T., Sasaki Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 562 (1991).
- 24) Hadlicka O., Komarek J., Wright A. J. A., *Br. J. Pharmacol.*, **72**, 723 (1981).
- 25) Stefanovich V., Nagata K., *IRCS Med. Sci.*, **11**, 972 (1983).
- 26) Mrsulja B. B., Micic D. V., Djuricic B. M., *Adv. Biosci.*, **43**, 45 (1983).
- 27) Fredholm B. B., Lindström K., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **58**, 187 (1986).
- 28) DeLeo J., Toth L., Schubert P., Rudolphi K., Kreutzberg G. W., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **7**, 745 (1987).
- 29) DeLeo J., Schubert P., Kreutzberg G. W., *Stroke*, **19**, 1535 (1988).
- 30) Fuji K., Hiramatsu M., Kameyama T., Nabeshima T., *Eur. J. Pharmacol.*, **236**, 411 (1993).
- 31) Winn H. R., Rubio G. R., Berne R. M., *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, **1**, 239 (1981).
- 32) Nagaoka A., Suno M., Shibota M., Kakihana M., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **84**, 303 (1984) (in Japanese).
- 33) Nagai Y., Shibota M., Narumi S., Miyamoto M., Kakihana M., Nagaoka A., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **13**, 13 (1985) (in Japanese).
- 34) Nagaoka A., Shino A., Kakihana M., Iwatsuka H., *Jpn. J. Pharmacol.*, **36**, 291 (1984).
- 35) Nagaoka A., Shino A., Hamajo K., *Jpn. Pharmacol. Ther.*, **13**, 283 (1985) (in Japanese).
- 36) Suno M., Nagaoka A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **35**, 196 (1984).
- 37) Suno M., Nagaoka A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 1046 (1984).
- 38) Suno M., Nagaoka A., *J. Takeda Res. Lab.*, **44**, 30 (1985) (in Japanese).
- 39) Nitta A., Murase K., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Eur. J. Pharmacol.*, **250**, 23 (1993).
- 40) Nitta A., Murakami Y., Furukawa Y., Kawatsura W., Hayashi K., Yamada K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **349**, 401 (1994).

- 41) Fuji K., Hiramatsu M., Hayashi S., Kameyama T., Nabeshima T., *Neurosci. Lett.*, **150**, 99 (1993).
- 42) Larkfors L., Ebendal T., Whittemore S. R., Persson H., Hoffer B., Olson L., *Mol. Brain Res.*, **3**, 55 (1987).
- 43) Nabeshima T., Nitta A., Hasegawa T., *Jpn. J. Psychopharmacol.*, **13**, 89 (1993).
- 44) Nitta A., Hasegawa T., Nabeshima T., *Neurosci. Lett.*, **163**, 219 (1993).
- 45) Nitta A., Itoh A., Hasegawa T., Nabeshima T., *Neurosci. Lett.*, **170**, 63 (1994).
- 46) Gross J. R., Finch C. E., Morgen D. G., *Neurobiol. Aging*, **12**, 165 (1991).
- 47) O'Callaghan J. P., Miller D. B., *Neurobiol. Aging*, **12**, 171 (1991).
- 48) Anezaki T., Yanagisawa K., Takahashi H., Nakajima T., Miyashita K., Ishihara A., Ikuta F., Miyatake T., *Brain Res.*, **574**, 63 (1992).
- 49) Nitta A., Furukawa Y., Hayashi K., Hasegawa T., Nabeshima T., *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 34 (1994).
- 50) Delacourte A., *Neurology*, **40**, 33 (1990).
- 51) Duffy P. E., Rapport M., Graf L., *Neurology*, **30**, 778 (1980).
- 52) Furukawa S., Furukawa Y., Satoyoshi E., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147**, 1048 (1987).
- 53) Yoshida K., Kakihana M., Chen L. S., Ong M., Baird A., Gage F. H., *J. Neurochem.*, **59**, 919 (1992).
- 54) Spillantini M. G., Aloe L., Alleva E., Simone R. D., Levi-Montalcini R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 8555 (1989).
- 55) Lu B., Yokoyama M., Dreytus C. F., Black T. B., *J. Neurosci.*, **11**, 318 (1991).
- 56) Phillips H. S., Hains J. M., Armanini M., Laramie G. R., Johnson S. A., Winslow J. W., *Neuron*, **7**, 695 (1991).
- 57) Murase K., Nabeshima T., Robitaille Y., Quirion R., Ogawa M., Hayashi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **193**, 198 (1993).
- 58) Uchida Y., Tomonaga M., *Brain Res.*, **481**, 190 (1989).
- 59) Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Berthelette P., Blackwell C., Carr T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnson-Wood K., Khan K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah E., McConlogue L., Montoya-Zavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J., *Nature (London)*, **373**, 523 (1995).