

嗅球摘出マウスにおけるドネペジルによるアセチルコリン神経保護効果

山本由似, 塩田倫史, 韓 峰, 森口茂樹, 福永浩司*

**Donepezil-induced Neuroprotection of Acetylcholinergic Neurons
in Olfactory Bulbectomized Mice**Yui YAMAMOTO, Norifumi SHIODA, Feng HAN, Shigeki MORIGUCHI, and Kohji FUKUNAGA*
*Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University,
Aramaki-Aoba, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan*

(Received November 17, 2009)

In the brain of Alzheimer's patients, the cholinergic neurons innervated the hippocampus and cerebral cortex degenerates before accumulation of beta-amyloid protein. Donepezil, a potent acetylcholinesterase (AChE) inhibitor is reported to rescue neurons from excitotoxic injury in culture. However, there is no evidence to confirm its neuroprotective effect on ACh neurons *in vivo*. Using olfactory bulbectomy (OBX) mice, we defined the neuroprotective mechanisms of donepezil on the medial septum cholinergic neurons with concomitant improvement of the impaired cognitive function. Bilateral olfactory bulbs of DDY mouse were removed by surgery. After olfactory bulbectomized (OBX), donepezil (1 or 3 mg/kg/day) was administered for 15 days and mouse brain was fixed with paraformaldehyde perfusion at day 18. Then, the neuroprotective effect of donepezil was evaluated by counting the number of Choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactive neurons in the medial septum. The number of ChAT immunoreactive neurons in the medial septum reduced by 40% of that in sham-operated animals. The reduced ChAT positive neurons were restored by donepezil treatments. Consistent with these observations, the cognitive deficits observed in OBX mice were significantly improved by the donepezil treatment. Taken together, donepezil treatment rescues the cholinergic neurons in the medial septum from the neurodegeneration by OBX. We will also discuss the mechanism underlying the donepezil-induced neuroprotection in the medial septum cholinergic neurons.

Key words—neurogenesis; cognitive function; donepezil; Alzheimer's disease

1. はじめに

脳を構成する細胞, すなわちニューロンやグリアは, 神経管内側の脳室下帯に存在する未分化な神経幹細胞が分化・増殖することにより作られる。これまでヒトやげっ歯類の神経細胞は脳発達期に産生され, 成体の脳では増えることはないと考えられていたが, 近年, 哺乳類の成体の脳において盛んに神経細胞が新生し, 神経回路が再構築されている領域が主に2つあることが分かってきた。1つは海馬歯状回顆粒細胞下層 (SGZ) で, もう1つが側脳室下帯 (SVZ) である。^{1,2)} SVZにおいて産生された新生神経細胞は分裂しながら, rostral migratory stream

(RMS) と呼ばれる経路に沿い, 嗅球へと移動し, 最終的には嗅脳顆粒細胞及び傍系球体細胞に分化する。一方, SGZにおいて産生された新生神経細胞の一部は, 海馬歯状回顆粒細胞層へ移動する。新生神経細胞は, 実際に神経ネットワークに組み込まれ機能している可能性が高い。海馬神経幹細胞は, 学習や豊かな環境下でその増殖頻度が上昇し, 反対にストレス負荷,³⁾ 加齢⁴⁾によって低下することが報告されている。また, 海馬歯状回における神経前駆細胞が痙攣発作,^{5,6)} 外傷性脳損傷⁷⁾や脳虚血⁸⁻¹¹⁾によって一過性に増加することが明らかとなっている。しかし, これらの神経前駆細胞は短命であり, 機能的に成熟した神経細胞に分化しない。

近年, 脳虚血後の内在性神経細胞新生の発生と生存を促進するため, 細胞膜チロシンキナーゼ受容体を活性化する神経栄養因子 epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) を脳室

東北大学大学院薬学研究科薬理学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

*e-mail: fukunaga@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第129年会シンポジウムGS5で発表したものを中心に記述したものである。

内へ持続的に投与する実験が行われている。^{12,13)}しかし、タンパク質である神経栄養因子の脳室内投与による臨床への応用は困難である。一方、アルツハイマー病治療薬のドネペジル投与によって海馬の神経新生が亢進されることが報告されている。¹⁴⁻¹⁶⁾ドネペジルは、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) の阻害作用によりアルツハイマー型認知症の治療薬として用いられている。しかし、*in vivo* における神経保護作用とそのメカニズムについては不明な点が多い。本論文では、ドネペジル末梢投与による中隔野アセチルコリン神経保護効果について、嗅球摘出マウスを用いて明らかにする。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患によって生じる脳障害に対する神経再生療法としての有用性について、神経新生を促進する薬物についても考察する。

2. 嗅球摘出マウスにおけるドネペジルによる中隔野におけるアセチルコリン神経保護効果と認知機能改善

ドネペジルが、グルタミン酸、 $A\beta$ による神経細胞死に対して保護作用を示すことが報告されている。この神経保護作用には、ニコチン性アセチルコリン $\alpha 4, \alpha 7$ 受容体の活性化が関与しており、PI3K-Akt 経路を賦活化し Bcl-2 発現を増加することが示唆されている。¹⁷⁾ また、プロテインキナーゼ B (Akt) の下流分子として glycogen synthesis kinase- 3β (GSK- 3β) や低酸素誘導因子 hypoxia inducible factor- 1α (HIF- 1α) がある。Akt の活性化は GSK- 3β の活性を低下させ、その下流の β -catenin のリン酸化を抑制する。脱リン酸化型の β -catenin は核内に移行し、転写調節因子 lymphoid enhancer-binding factor-1 (Lef-1) を介して neurotrophin-3 (NT-3) 等を発現誘導し、¹⁸⁾ 神経保護作用を発現することも考えられる。

私達はドネペジルを用いて、嗅球摘出 (OBX) 後の中隔野におけるアセチルコリン神経保護効果について検討した。さらに、ドネペジルによる認知機能の回復を評価するために行動解析を行った。中隔野から嗅球へはアセチルコリン神経の投射があり、嗅球を除去すると中隔野のアセチルコリン神経が逆行性に変性する。私達は中隔野からの大脳皮質、海馬へのアセチルコリン神経が変性するため、認知機能障害が起こると考えている。実際にアセチルコリン作動性薬物投与により OBX マウスの認知機能障

害が改善すること、^{19,20)} $A\beta$ の脳内濃度も上昇することから、²¹⁾ アルツハイマー病のモデルマウスとして有用である。私達は DDY マウスの嗅球を摘出した。直後に起きる炎症性の反応の影響を除去するため、摘出後 3 日目からドネペジル (1 あるいは 3 mg/kg, 腹腔内投与) を 15 日間投与し、18 日目に灌流固定を行い、中隔野でのアセチルコリン神経の回復をコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の抗体を用いた免疫染色法にて検討した。Sham 群に比較し、OBX マウス群では著しくアセチルコリン作動性神経の数が低下した (Fig. 1)。ドネペジ

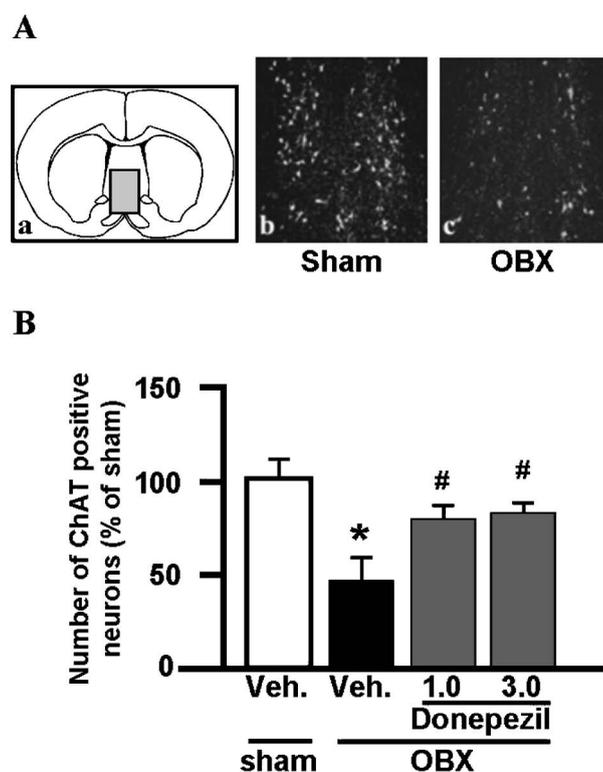
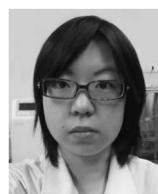


Fig. 1. Neuroprotective Effect of Donepezil on the OBX-induced ACh Neuronal Damage

A, representative septum region (a) stained by ChAT antibody showing changes in the number of cholinergic neurons. Cholinergic neurons were identified by ChAT immunostaining in sham (b), OBX (c) mice. Confocal laser scanning images showed marked reduction of ChAT positive cholinergic neurons after OBX. B, quantitative analysis of ChAT positive neurons was undertaken by counting ChAT-immunoreactive neurons. Data are expressed as percentage of values of sham-operated animals (mean \pm S.E.M.; $n = 6$). *, $p < 0.05$ versus sham-operated mice; #, $p < 0.05$ versus vehicle-treated mice. Veh, vehicle treatment.²²⁾



山本由似

2009年東北大学大学院薬学研究科修士課程修了。東北大学大学院薬学研究科・薬理学分野博士課程在学中。宮城県岩沼市出身。研究テーマ：神経変性疾患モデルマウスを用いた神経疾患の原因と治療に関する研究。

ル腹腔内投与により、有意かつ用量依存性にアセチルコリン作動性神経細胞数が回復した。さらに、新奇物体認知試験の行動解析により、ドネペジルの慢性投与により認知機能低下を改善することを確認した。以上の結果より、ドネペジルによる認知機能改善作用はアセチルコリン作動性神経保護作用と相関することを確認した。

次に、ドネペジルによる神経細胞保護効果のメカニズムを明らかにする目的で、中隔野を摘出し、Aktとextracellular signal regulated kinase (ERK)の活性に関与する、酵素のリン酸化反応について調べた。AktとERKのリン酸化反応はshamマウスに比べてOBXマウス中隔野で各々50%と60%に低下した。ドネペジルの1.0及び3.0 mg/kg投与はAktとERKのリン酸化反応の低下をほぼ完全に抑制した。これまでの私達の仮説通りに、ドネペジルはAktとERKを活性化して神経保護効果を発揮すると考えられる。さらに、中隔野アセチルコリン神経膜上に $\alpha 7$ 受容体の発現も確認した。

私達は最近、海馬においてアセチルコリン放出を高めるZSET1446化合物が海馬での Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII (CaMKII)を活性化することにより、OBXマウスの認知機能を改善することを報告した。²²⁾ ZSET1446はOBXで低下する中隔野でのアセチルコリン神経の数には影響しないことから、ドネペジルとは異なるメカニズムで認知機能を改善すると考えられる。

3. 海馬における神経新生を亢進させる薬物とその標的

神経栄養因子以外で、海馬の神経新生を促進する薬物として、抗うつ薬の選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) や、バルプロ酸ナトリウム、炭酸リチウムなどの気分安定薬、及び、ニューロステロイドのdehydroepiandrosterone (DHEA) が知られている (Table 1).²³⁾ SSRIは、brain-derived neurotrophic factor (BDNF)の発現を増強することが知られている。³⁰⁾ SSRIのフロキセチンは、BDNFヘテロ欠損マウスにおいて神経新生増強作用の減弱が報告されている。³⁰⁾ さらに、セロトニン5-HT_{1A}受容体の欠損マウス及び5-HT_{1A}受容体阻害剤のWAY 100635によってフロキセチンの神経新生促進作用が抑制されることから、SSRIによる神経新生促進作用は5-HT_{1A}受容体を介していると考えられる。³⁰⁾ 一方、バルプロ酸ナトリウムはERK経路を活性化しcAMP-response element-binding protein (CREB)を介して抗アポトーシス因子であるBcl-2の発現を高め、成体ラットの海馬SGZでの神経新生を促進するという報告がある。³¹⁾ 炭酸リチウムも同様にBcl-2の誘導が報告されている。³²⁾ また、CREBのドミナントネガティブ変異マウスでは、脳虚血による海馬歯状回の神経新生が抑制されることから、³³⁾ Bcl-2だけでなく、BDNF等の他のCREB下流遺伝子も神経新生に関与する可能性が考えられる。このようにERK経路はBcl-2, BDNFの発現を介して神経新生を促進する。また、ニュー

Table 1. Drugs Stimulating Hippocampal Neurogenesis²³⁾

Antidepressant	Tricyclic antidepressants SSRI	Santareli L. <i>et al.</i> , Sciences, 2003 ²⁴⁾ Malberg J. E. <i>et al.</i> , Neurosci., 2000 ²⁵⁾
Mood stabilizer	Lithium Valproic acid	Longo F. M. <i>et al.</i> , Curr. Alz. Res., 2006 ²⁶⁾
Cognitive enhancers	Galantamine Memantine Donepezil	Jin K. <i>et al.</i> , Brain Res., 2006 ¹⁴⁾ Kaneko N. <i>et al.</i> , Gene Cells, 2006 ¹⁵⁾ Kotani S. <i>et al.</i> , Neurosci., 2006 ¹⁶⁾
Anesthetics	Ketamine	Keilhoff G. <i>et al.</i> , Biol. Psychiatry, 2004 ²⁷⁾
Steroids	Estradiol Dehydroepiandrosterone (DHEA) Allopregnanolone	Longo F. M. <i>et al.</i> , Curr. Alz. Res., 2006 ²⁶⁾ Wolkowitz O. M. <i>et al.</i> , Neurology, 2003 ²⁸⁾ Brinton & Wang, Curr. Alz. Res., 2006 ²⁹⁾
Other	Rolipram Statines Sildenafil	Longo F. M. <i>et al.</i> , Curr. Alz. Res., 2006 ²⁶⁾

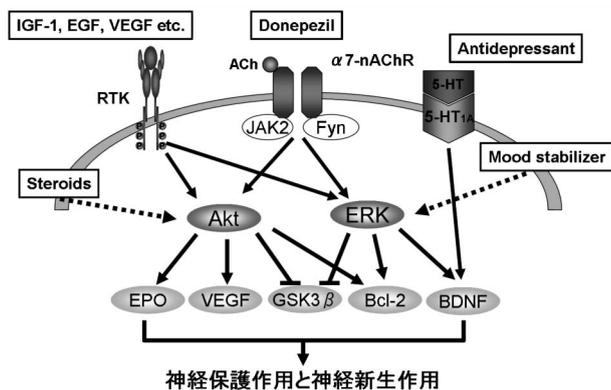


Fig. 2. Possible Mechanisms Underlying Neurogenesis Enhancement by Psychotic Stimulants, Neurosteroids and Alzheimer's Drugs Including Donepezil

RTK; Receptor tyrosine kinases, EPO; erythropoietin.

ロステロイドである dehydroepiandrosterone(DHEA) は、細胞の生存シグナルである Akt を活性化することにより、神経新生において重要な役割を担っている。培養神経前駆細胞に DHEA で刺激すると、Akt の活性を上昇し、神経前駆細胞の増殖を促進する。さらにこの活性上昇は、PI3K 阻害薬の LY294002 によって抑制される。²⁴⁾ 上述したように、神経新生を促進するためには、Akt と ERK 経路の活性化による神経新生因子と分化因子誘導が鍵となる (Fig. 2)。

4. おわりに

本研究では、ドネペジルの末梢投与による嗅球摘出後の中隔野でのアセチルコリン神経の保護作用について明らかにした。ドネペジルは Akt と ERK 経路を活性化することによって神経保護作用を示すと考えられる。さらにドネペジルは、嗅球摘出により低下した認知機能を改善することから、ドネペジルはアセチルコリン分解を抑制して認知機能を高めることに加えて、Akt と ERK 経路を介して神経保護効果を発揮することにより認知機能改善薬として薬効を発現すると考えられる。

REFERENCES

- 1) Altman J., Das G. D., *J. Comp. Neurol.*, **124**, 319–335 (1965).
- 2) Gage F. H., *Science*, **287**, 1433–1438 (2000).
- 3) Gould E., Tanapat P., McEwen B. S., Flugge G., Fuchs E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3168–3171 (1998).
- 4) Cameron H. A., McKay R. D., *Nat. Neurosci.*, **2**, 894–897 (1999).
- 5) Bengzon J., Kokaia Z., Elmer E., Nanobashvili A., Kokaia M., Lindvall O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10432–10437 (1997).
- 6) Parent J. M., Yu T. W., Leibowitz R. T., Geschwind D. H., Sloviter R. S., Lowenstein D. H., *J. Neurosci.*, **17**, 3727–3738 (1997).
- 7) Dash P. K., Mach S. A., Moore A. N., *J. Neurosci. Res.*, **63**, 313–319 (2001).
- 8) Liu J., Solway K., Messing R. O., Sharp F. R., *J. Neurosci.*, **18**, 7768–7778 (1998).
- 9) Kee N. J., Preston E., Wojtowicz J. M., *Exp. Brain Res.*, **136**, 313–320 (2001).
- 10) Gu W., Brannstrom T., Wester P., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 1166–1173 (2000).
- 11) Jin K., Minami M., Lan J. Q., Mao X. O., Batteur S., Simon R. P., Greenberg D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4710–4715 (2001).
- 12) Nakatomi H., Kuriu T., Okabe S., Yamamoto S., Hatano O., Kawahara N., Tamura A., Kirino T., Nakafuku M., *Cell*, **110**, 429–441 (2002).
- 13) Teramoto T., Qiu J., Plumier J. C., Moskowitz M. A., *J. Clin. Invest.*, **111**, 1125–1132 (2003).
- 14) Jin K., Xie L., Mao X. O., Greenberg D. A., *Brain Res.*, **1085**, 183–188 (2006).
- 15) Kaneko N., Okano H., Sawamoto K., *Gene Cells*, **11**, 1145–1159 (2006).
- 16) Kotani S., Yamauchi T., Teramoto T., Ogura H., *Neuroscience*, **142**, 505–514 (2006).
- 17) Takatori Y., *Yakugaku Zasshi*, **126**, 607–616 (2006).
- 18) Patapoutian A., Reichardt L. F., *Curr. Opin. Neurobiol.*, **10**, 392–399 (2000).
- 19) Yamamoto T., Jin J., Watanabe S., *Behav. Brain Res.*, **83**, 57–62 (1997).
- 20) Hozumi S., Nakagawasai O., Tan-No K., Niijima F., Yamadera F., Murata A., Arai Y., Yasuhara H., Tadano T., *Behav. Brain Res.*, **138**, 9–15 (2003).
- 21) Aleksandrova I. Y., Kuvichkin V. V., Kashparov I. A., Medvinskaya N. I., Nestero-va I. V., Lunin S. M., Samokhin A. N., Bobkova N. V., *Biochemistry*, **69**, 176–180 (2004).
- 22) Han F., Shioda N., Moriguchi S., Yamamoto Y., Raie A. Y., Yamaguchi Y., Hino M.,

- Fukunaga K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **326**, 127–134 (2008).
- 23) Scharfman H. E., Hen R., *Science*, **315**, 336–338 (2007).
- 24) Santarelli L., Saxe M., Gross C., Surget A., Battaglia F., Dulawa S., Weisstaub N., Lee J., Duman R., Arancio O., Belzung C., Hen R., *Science*, **301**, 805–809 (2003).
- 25) Malberg J. E., Eisch A. J., Nestler E. J., Duman R. S., *J. Neurosci.*, **20**, 9104–9110 (2000).
- 26) Longo F. M., Yang T., Xie Y., Massa S. M., *Curr. Alz. Res.*, **3**, 5–10 (2006).
- 27) Keilhoff G., Bernstein H. G., Becker A., Grecksch G., Wolf G., *Biol. Psychiatry*, **56**, 317–322 (2004).
- 28) Wolkowitz O. M., Kramer J. H., Reus V. I., Costa M. M., Yaffe K., Walton P., Raskind M., Peskind E., Newhouse P., Sack D., De Souza E., Sadowsky C., Roberts E., *Neurology*, **60**, 1071–1076 (2003).
- 29) Brinton R. D., Wang J. M., *Curr. Alz. Res.*, **3**, 11–17 (2006).
- 30) Pinnock S. B., Lazic S. E., Wong H. T., Wong I. H., Herbert J., *Neuroscience*, **158**, 1644–1651 (2009).
- 31) Hao Y., Creson T., Zhang L., Li P., Du F., Yuan P., Gould T. D., Manji H. K., Chen G., *J. Neurosci.*, **24**, 6590–6599 (2004).
- 32) Chen G., Rajkowska G., Du F., Seraji-Bozorgzad N., Manji H. K., *J. Neurochem.*, **75**, 1729–1734 (2000).
- 33) Zhu D. Y., Lau L., Liu S. H., Wei J. S., Lu Y. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9453–9457 (2004).
- 34) Zhang L., Li B., Ma W., Barker J. L., Chang Y. H., Zhao W., Rubinow D. R., *Mol. Brain Res.*, **98**, 58–66 (2002).