

アルツハイマー病モデル動物におけるニコチン性アセチルコリン受容体の機能障害

新田 淳美*、鍋島 俊隆*

はじめに

我々は喫煙科学研究財団より研究助成を平成4年(2002年)から頂き、主に「アルツハイマー病などの認知症モデル動物におけるニコチン性アセチルコリン受容体の機能障害」についての研究を行ってきた。“喫煙者にはアルツハイマー病患者が少ない”という疫学調査の結果を示した論文¹⁾は、我々にとって大きなインパクトがあり、ニコチンを応用したアルツハイマー病治療薬の開発を最終目標として、本プロジェクトを開始した。アルツハイマー病の直接的な原因は現在でも完全には解明されていないが、15年前には、“アルツハイマー病患者脳では神経栄養因子が減少し、神経細胞が機能を維持出来なくなり、認知症が起きるのではないか?”という考え方も有力視されていた。特に、“老齡ラットで観察される学習記憶障害が、神経成長因子を脳室内へ持続的に注入することによって抑制された”という報告²⁾は“神経栄養因子やその産生を脳で促進する化合物がアルツハイマー病の治療薬に結びつくかもしれない”という期待を高めさせた。このような状況の折に、『静止期に導入した培養アストロサイト細胞にニコチンを作用させると、神経成長因子の産生が増加する』というホットな情報が共同研究者で当時岐阜薬科大学教授であった林恭三博士から個人的にもたらされ³⁾、“ニコチンやその誘導体がアルツハイマー病の治療薬になるかもしれない”と考え、我々も大きな興奮を覚えた。ニコチン自

身が記憶障害を改善する直接的な効果を示すことは、スコポラミン誘発や AF64 での脳破壊による記憶障害ラットでしか示すことができなかったが⁴⁾⁵⁾、本助成研究を通じてアルツハイマー病の認知障害とニコチン性アセチルコリン受容体の機能変化とを結び付けるいくつかの知見を得ることが出来たので、紹介する。

アルツハイマー病モデル動物の確立

アルツハイマー病患者脳では、凝集したアミロイドβタンパクがシナプス機能を障害し、その結果、神経機能を障害していると考えられている。遺伝子改変によりアルツハイマー病モデルを実験に使用することが一般的になる前であった1994年に、我々は、アミロイドβタンパクをラット脳室内に持続的に注入することにより、アルツハイマー病モデル動物の作成に成功した⁶⁾。本モデルラットでは、水迷路や受動的回避試験法での学習記憶能力低下や記憶学習に重要であるアセチルコリンの合成酵素活性が低下していることを見出した⁶⁾。アミロイドβタンパクが引き起こす神経障害の直接的な原因を明らかにすることがアルツハイマー病発症原因の解明に結びつくと考え、神経機能障害発現メカニズムについての検討を続けた。

アルツハイマー病モデルラット脳でのニコチン性アセチルコリン受容体の機能低下

アルツハイマー病患者脳では、ニコチン性アセチルコリン受容体の発現量や機能が低下していることが報告されている⁷⁾。そこで、本モデルラットにおけるニコチン刺激時の神経伝達物

* 名古屋大学大学院医学系研究科・医学部附属病院

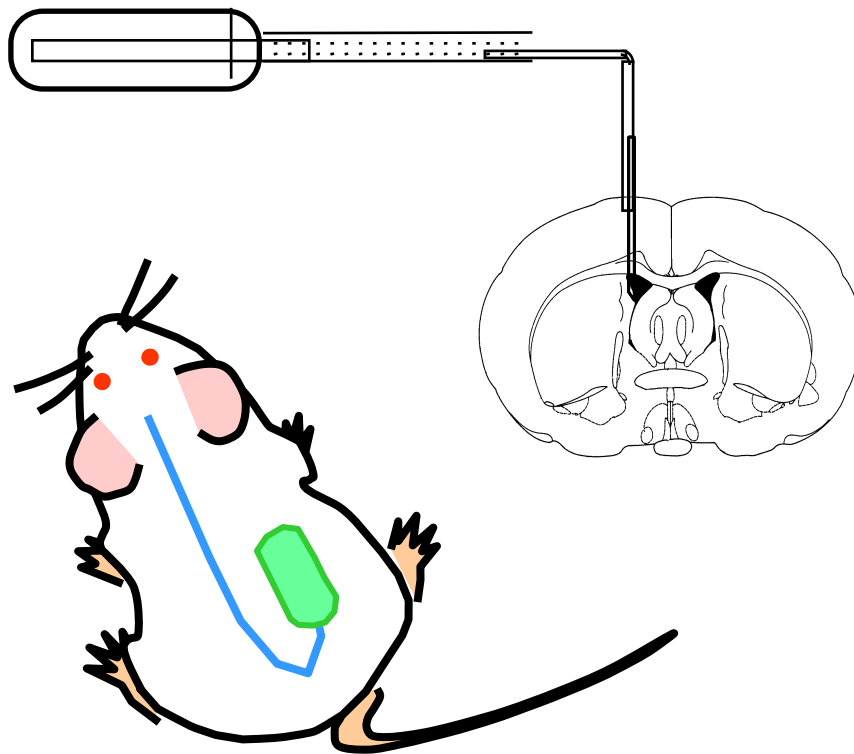


図-1 ラット脳室への Aβ1-40 持続注入によるアルツハイマー病モデル

質遊離量を検討し、ニコチン性アセチルコリン受容体の機能について *in vivo* マイクロダイアリス法を用いて検討し、ラットの海馬と皮質に透析膜を挿入後、リンゲル液を灌流し、その中に回収されるアセチルコリンやドパミンの濃度を高速液体クロマトグラフィーで測定した。無刺激時には、コントロールとアルツハイマー病モデルラットの間にはアセチルコリンやドパミン遊離量に差異はなかった。しかし、ニコチン (3 mM) を灌流液中に含有させ、ニコチン性アセチルコリン受容体を刺激すると、コントロールラットでは、アセチルコリンやドパミンの遊離量が著しく増加するが、アルツハイマー病モデルラットでは、増加の程度が少なかった⁸⁾。これらの実験結果から、アミロイドβタンパクによる記憶障害は、ニコチン性アセチルコリン受容体を介する神経伝達物質の遊離の低下に依っていることが強く示唆された。

アルツハイマー病モデルラットにおける ニコチンによる神経細胞の興奮伝達

神経細胞に刺激を加えると、細胞内外のイオ

ン濃度が変動することにより、興奮の伝達が行われる。短時間に高い頻度で刺激を加えるとシナプスの機能が強化され、弱い刺激を 1 度だけ加えても神経興奮の程度が増加し、持続する“長期増強 (LTP)”という現象が観察される。この現象は、記憶形成のメカニズムであると考えられている。培養神経細胞や動物脳スライスを用いて、これらの現象を再現する方法は、神経機能の検討には欠かすことの出来ない方法である。海馬スライスに電気やニコチンで刺激を与えた場合、アルツハイマー病モデルのスライスでは、コントロールラットに比べて LTP の形成が有意に抑制されていた⁹⁾。また記憶や学習に重要と考えられている海馬のシェーファー副側枝に刺激電極を挿入し、電気刺激を与えると 2 回目の刺激では 1 回目と比較して海馬内 CA1 錐体細胞で大きな反応が観察される。これを paired-pulse facilitation (PPF) といい、神経前シナプスの機能を示していると考えられている。海馬スライスの灌流液に 50 μM のニコチンを加えると PPF が増強されたが、アルツハイマー病モデル動物から作成した海馬

切片では PPF の増加は観察されなかった⁹⁾。これらの研究結果によっても、アミロイドβタンパクがニコチン性アセチルコリン受容体の機能を低下させることを直接的に証明することが出来た。

ニコチン性アセチルコリン受容体は、いくつものサブユニットの複合体によって構成され、神経系に存在するニコチン性アセチルコリン受容体は、α1 から 9 および β1 から 4 のサブユニットによって構成されている。しかし、各サブユニットや複合体の機能については、あまり明らかにされていない。アミロイドβタンパクとの関係について注目されている α7 サブユニットの特異的アゴニストやアンタゴニストを用いて、実験を行った¹⁰⁾。前述したようにアルツハイマー病モデルラット海馬スライスでは、ニコチン灌流による PPF や LTP の増加が抑制されるが、ニコチン灌流前に α7 サブユニットのアゴニストを前灌流しておく、抑制が観察されなくなった¹⁰⁾。また、コントロールラットの海馬スライスに α7 サブユニットアンタゴニストを前灌流しておく、ニコチンの作用が抑制され、アルツハイマー病モデル動物スライスを用いた場合と同様の結果が得られた¹⁰⁾。これらの現象は、他のいくつかのサブユニットのアゴニストやアンタゴニストを使用した場合には観察されなかった。これらのことから、アミロイドβによるニコチン性アセチルコリン受容体機能の低下は、α7 受容体を介している可能性が大きいと考えられる。

アルツハイマー病モデル動物でニコチン性アセチルコリン受容体の機能が低下しているメカニズムは？

行動薬理学、生化学および電気生理学的研究の結果からアミロイドβタンパクによるニコチン性アセチルコリン受容体の機能低下は受容体に対するニコチンとの結合能の低下に基づくと考えられる。しかし、そのメカニズムは全く不明であった。そこで、ニコチン性アセチルコリン受容体の機能の調節をして、その他多

くの神経伝達シグナルに関与しているプロテインキナーゼ C に着目した。フォルボール・ジブチレートがプロテインキナーゼ C に結合することによって、その下流シグナルを活性化することが知られている¹¹⁾。そこで、アルツハイマー病モデルラット脳組織とトリチウム標識したフォルボール・ジブチレートへの結合能について検討した。実験に用いた皮質、海馬および線条体いずれの部位でも、フォルボール・ジブチレート最大結合量はコントロール動物のものと比べて変化がなかった。しかし、平衡解離定数 (Kd と示され、数字が大きいほど結合能が下がっていることの指標となる) は、検討した全ての脳部位でコントロールラットと比べて有意に増加していた¹²⁾。これらの結果は、アミロイドβタンパクによる神経機能低下は、ニコチン性アセチルコリン受容体の機能低下を含め、プロテインキナーゼ C を介している多くのシグナル伝達の低下に依っている可能性が考えられた。

アルツハイマー病モデル動物脳で変性を受けているタンパクは？

一酸化窒素 (NO) は、細胞間情報伝達物質として脳機能調節に重要な役割を果たしている。しかし、一方で、サイトカインなどの刺激により誘導される誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) により合成される大量の NO は細胞障害を引き起こし、脳虚血後の神経障害などにも関与していることが知られている。そこで、アルツハイマー病モデル動物のニコチン性アセチルコリン受容体の機能低下に iNOS が関与しているかどうか検討し、その結果、アルツハイマー病モデル動物では、海馬での iNOS mRNA 発現量がコントロール動物と比較して有意に増加していた¹³⁾。In vivo マイクロダイアリシス法を用いた実験を行ったところ、コントロールラットの海馬からのアセチルコリン量はニコチン刺激で著しく増加するが、前述したように本モデルでは、増加率が有意に低い。本モデルに iNOS 阻害剤のアミノグアニジン前投与しておく、ニコ

チン刺激によるアセチルコリン遊離量増加率低下が抑制された¹⁴⁾。しかし、神経型 NOS の阻害剤である 7-ニトロインダゾールを投与しても、アルツハイマー病モデルラット海馬をニコチン刺激した時のアセチルコリン遊離量の増加率は少ないままであった¹⁴⁾。本実験結果から、神経伝達物質の放出に重要な機能を果たしているシナプス機能に障害がおこっているのではないかと仮説をたて次の研究を行った。本モデルラットでは、シナプス関連のタンパクがニトロ化を受けていることを見出し、このようなタンパク変性がシナプス機能および学習・記憶障害や神経障害の原因の1つと考えている¹³⁾。

まとめ

我々が開発し、15 年来にわたって使用してきたアルツハイマー病モデルラットは、市販されているアミロイドβタンパク、持続注入のためのミニ浸透圧ポンプおよびラットさえあれば、世界中どのような研究室で作成することも可能である。また、本モデルラット確立後、マウスでも類似のモデルが考案され、遺伝子組み換えマウスでの実験が可能となり、応用の幅が広がった。我々は、ラットと遺伝子組み換えマウスも用いて、アミロイドβタンパクが引き起こす神経機能障害のメカニズムについての研究を続行中である。最近、アミロイドβタンパク注入以外のアルツハイマー病モデル動物の作成にもチャレンジした¹⁵⁾。アミロイドβタンパクの分解酵素のネプリライシンの阻害剤のチオルファンをラット海馬に持続的に注入することにより、アミロイドβタンパクの蓄積が起り、学習記憶ならびにニコチン性アセチルコリン受容体の機能が低下していることを見出している¹⁵⁾。アミロイドβタンパク注入モデルラットでは、人工的に合成したペプチドタンパクを使用していることから、凝集後のアミロイドβタンパクの三次元構造等が生理的なものと完全に一致しているかどうかの確証がなかった。チオルファン注入の場合はラットの生体内で産生されたアミロイドβタンパクが脳に

過剰に蓄積していることから、生理的なものと同一であるというプライオリティがある。これらのアルツハイマー病モデルラットを中心に、遺伝子組み換えマウスも活用し、アルツハイマー病の発症の機序を解明し、薬効が高く副作用が少ない新しいアルツハイマー病治療薬の開発に役立てたい。

上記研究に対して助成をいただきました財団法人喫煙科学研究財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) van Duijn CM, Hofman A. Relation between nicotine intake and Alzheimer's disease. *BMJ* 1991; 302: 1491-4.
- 2) Fischer W, Wictorin K, Bjorklund A, Williams LR, Varon S, Gage FH. Amerioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 1987; 329: 65-8.
- 3) Hayashi K. Biochemical studies on functional proteins in the brain nervous system. *Neurobiochemical studies on nerve growth factor*. *Yakugaku Zasshi* 1996; 116: 286-306.
- 4) Hiramatsu M, Yamatsu T, Kameyama T, Nabeshima T. Effects of repeated administration of (-)-nicotine on AF64A-induced learning and memory impairment in rats. *J Neural Transm* 2002; 109: 361-75.
- 5) Nitta A, Katono Y, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. Nicotine reverses scopolamine-induced impairment of performance in passive avoidance task in rats through its action on the dopaminergic neuronal system. *Pharmacol Biochem Behav* 1994; 49: 807-12.
- 6) Nitta A, Itoh A, Hasegawa T, Nabeshima T. β-Amyloid protein-induced Alzheimer's disease animal model. *Neurosci Lett* 1994; 28: 170: 63-6.
- 7) Perry E, Martin-Ruiz C, Lee M, Griffiths M, Johnson M, Piggott M, Haroutunian V, Buxbaum JD, Nasland J, Davis K, Gotti C, Clementi F, Tzartos S, Cohen O, Soreq H, Jaros E, Perry R, Ballard C, McKeith I, Court J. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol* 2000; 393: 215-22.
- 8) Itoh A, Nitta A, Nadai M, Nishimura K, Hirose M, Hasegawa T, Nabeshima T. Dysfunction of cholinergic and dopaminergic neuronal systems in β-amyloid protein-infused rats. *J Neurochem* 1996; 66: 1113-7.

- 9) Itoh A, Akaike T, Sokabe M, Nitta A, Iida R, Olariu A, Yamada K, Nabeshima T. Impairments of long-term potentiation in hippocampal slices of β -amyloid-infused rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 382: 167-75.
- 10) Chen L, Yamada K, Nabeshima T, Sokabe M. $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor as a target to rescue deficit in hippocampal LTP induction in beta-amyloid infused rats. *Neuropharmacology* 2006; 50: 254-68.
- 11) Waggoner LE, Dickinson KA, Poole DS, Tabuse Y, Miwa J, Schafer WR. Long-term nicotine adaptation in *Caenorhabditis elegans* involves PKC-dependent changes in nicotinic receptor abundance. *J Neurosci* 2000; 20: 8802-11.
- 12) Olariu A, Yamada K, Mamiya T, Hefco V, Nabeshima T. Memory impairment induced by chronic intracerebroventricular infusion of β -amyloid (1-40) involves down-regulation of protein kinase C. *Brain Res* 2002; 957: 278-86.
- 13) Tran MH, Yamada K, Nakajima A, Mizuno M, He J, Kamei H, Nabeshima T. Tyrosine nitration of a synaptic protein synaptophysin contributes to amyloid- β -peptide-induced cholinergic dysfunction. *Mol Psychiatry* 2003; 8: 407-12.
- 14) Tran MH, Yamada K, Olariu A, Mizuno M, Ren XH, Nabeshima T. Amyloid beta-peptide induces nitric oxide production in rat hippocampus: association with cholinergic dysfunction and amelioration by inducible nitric oxide synthase inhibitors. *FASEB J* 2001; 15: 1407-9.
- 15) Zou LB, Mouri A, Iwata N, Saido TC, Wang D, Wang MW, Mizoguchi H, Noda Y, Nabeshima T. Inhibition of neprilysin by infusion of thiorphan into the hippocampus causes an accumulation of amyloid β and impairment of learning and memory. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317: 334-40.