

Diosgenin の記憶改善作用に関する研究

申請代表者	後藤 幸織	McGill University Department of Psychiatry	Assistant Professor
所外共同研究者	李 英娥	McGill University Department of Psychiatry	Postdoctoral Fellow
所内共同研究者	東田 千尋	民族薬物研究センター 薬効解析部 (現 病態制御部門 神経機能学)	准教授

【報告セミナー要旨】

【背景・目的】

共同研究者・東田は、これまでに、山薬の主成分である Diosgenin に着目しアルツハイマー病改善作用を研究してきており、Diosgenin を正常マウスに3日間投与すると物体認知記憶が亢進すること、重篤なアルツハイマー病モデルの5XFADマウスに14日間-18日間投与すると、空間記憶障害、物体認知記憶障害が有意に改善されることを明らかにしてきた。そこで本研究では、Diosgenin が神経可塑性を促進させることの証明、およびDiosgenin の作用メカニズムの解析を行うことを目的とした。

【結果・考察】

正常マウスにおける *in vivo* 電気生理学的解析

C57B/6 マウス(オス, 8週齢)にDiosgenin (Sigma-aldrich) 10 $\mu\text{mol/kg}$ を21日間腹腔内投与した。Urethane麻酔下で実験を行った。PFC (Prefrontal cortex), あるいはHPC (Dorsal hippocampal CA1) にstereotaxicに刺激電極, 記録電極を刺入した。実験終了後, 速やかに脳を摘出しニッスル染色により電極刺入部位の位置を確認した。

1) Diosgenin 投与によるLTPの変化

Diosgenin 投与によるPFCとHPCにおけるLTPの変化は見られなかった。今回用いたTetanic刺激は弱いものであり, LTPによるevoked field potentialの増加そのものが小さいものであったことから, より強いTetanic刺激を用いたLTP実験の検討が必要であると考えている。

2) Diosgenin 投与によるspike firing activityの変化

神経細胞の活動レベルの指標となる, 自発性spike frequencyを解析した結果, PFCでもHPCでもDiosgenin 投与によるspike frequencyの有意な上昇が見られた。これらの結果からDiosgenin 投与によりPFCおよびHPCの神経細胞が活性化したことが示唆される。錐体細胞における情報処理能力を示唆するとされている神経発火 (burst) 頻度を解析した結果, PFCでDiosgenin 投与による有意な増加が認められた。記憶の固定化に重要とされているPFCとHPCの同時発火頻度を検討したところ, HPC-PFC間での神経細胞群の同時発火はDiosgenin 投与により有意に上昇した。

3) Diosgenin 投与によるLocal field potentialパターンの変化

Local field potential を0.1-1.0 Hz (slow), 1.0-4.0 Hz (delta), 4.0-10 Hz (theta), 30-50 Hz (gamma) の範囲で解析した。その結果, PFCのgamma帯のoscillationがDiosgenin 投与により有意に増加した。近年の研究でPFCでのgamma oscillationは錐体細胞と介在神経の同期活動によって生じるもので, 特にPFCでは認知機能に強く関わっていることが示されている。

5XFAD マウスにおける記憶障害改善と軸索変性の改善

アルツハイマー病モデルマウス5XFAD (メス, 6-8か月齢) にDiosgenin (Wako) 10 $\mu\text{mol/kg}$

を20日間腹腔内投与した。Diosgenin投与により、物体認知記憶の障害が有意に改善され、大脳皮質、海馬でのAmyloid plaqueに限局して見られる軸索・プレシナプスの変性も有意に改善された。またDiosgenin投与は神経原線維変化の増加を有意に抑制した。

Diosgenin受容体の探索

以前の研究(東田)よりDiosgenin受容体候補と目していた1,25D3-MARRSについて検討した。1,25D3-MARRSの生理的リガンドである1 α , 25-dihydroxy vitamin D3の結合を大脳皮質神経細胞で検出し、それをDiosgeninがreplaceすることを見出した。また、大脳皮質神経細胞で1,25D3-MARRSをノックダウンさせると、Diosgeninによる突起伸展が完全に見られなくなった。以上の結果は、Diosgeninが1,25D3-MARRSを介してシグナル伝達することを示唆する。

【結論・今後の方針】

Diosgenin投与により、認知機能亢進に関わる種々の神経活動が増強されることが示され、正常動物においても記憶機能を高めるDiosgeninの作用が、神経生理学的知見からも支持された。5XFADマウスにおけるDiosgenin作用の電気生理学的な検討も、現在準備中である。また、Diosgeninのシグナリングの詳細をさらに検討することや、Diosgenin受容体をより強く活性化し得る新化合物の合成も今後の課題とし、記憶障害改善作用に繋がる治療戦略の前進を目指す。

■背景・目的

共同研究者・東田は、これまでに、山薬の主成分であるDiosgeninに着目しアルツハイマー病改善作用を研究してきており、Diosgeninを正常マウスに3日間投与すると物体認知記憶が亢進すること、重篤なアルツハイマー病モデルの5XFADマウスに14日間-18日間投与すると、空間記憶障害、物体認知記憶障害が有意に改善されることを明らかにしてきた。そこで本研究では、Diosgeninが神経可塑性を促進させることの証明、およびDiosgeninの作用メカニズムの解析を行うことを目的とした。

■結果・考察

正常マウスにおける*in vivo*電気生理学的解析

C57B/6マウス(オス, 8週齢)にDiosgenin (Sigma-aldrich) 10 μ mol/kgを21日間腹腔内投与した。Urethane麻酔下で実験を行った。PFC (Prefrontal cortex), あるいはHPC (Dorsal hippocampal CA1) にstereotaxicに刺激電極, 記録電極を刺入した。実験終了後, 速やかに脳を摘出しニッスル染色により電極刺入部位の位置を確認した。PFC (Prelimbic cortex) の場合はAnterior Posterior (AP) : +1.5mm, Lateral (L) : +0.4mm, Ventral (V) : -2.8mmに, HPC (Dorsal CA1) の場合はAP: -2.3mm, L: +1.7mm, V: -1.5mm近辺からの記録とした。

Single/multi unit 記録はスパイク:ノイズの比が3:1以上のものを5分間記録した。またsingle/multi unit 記録の後, Local field potential (0.1 – 100 Hz) を5分間記録した。

LTP誘起に用いたTetanic 刺激は, PFCの場合, 30秒のintervalで10set (1set=10trains@10Hz, 1train=5pulses@100Hz, 1pulse=200 μ sec), HPCの場合には30秒のintervalで10set (1set=10trains@5Hz, 1train=5pulses@100Hz, 1pulse=200 μ sec) のバースト刺激を用いた。刺激電極はPFCの場合は記録電極近傍(およそ500 μ mはなれた場所), HPCの場合はPerforant Path (CA3からCA1への投射: AP: -1.8mm, L: +1.0mm, V: +1.6mm) に設定した。20分間のベースライン記録の後, Tetanic刺激をし, その後60分間記録をした。

データ解析はClampfit 10.2と Neuro Exploer 4用いた。

1) Diosgenin 投与によるLTPの変化

Diosgenin投与によるPFCとHPCにおけるLTPの変化は見られなかった。今回用いたTetanic刺激は弱いものであり、LTPによるevoked field potentialの増加そのものが小さいものであったことから、より強いTetanic刺激を用いたLTP実験の検討が必要であると考えている。

2) Diosgenin 投与によるspike firing activityの変化

神経細胞の活動レベルの指標となる、自発性spike frequencyを解析した結果、PFCでもHPCでもDiosgenin投与によるspike frequencyの有意的な上昇が見られた。これらの結果からDiosgenin投与によりPFCおよびHPCの神経細胞が活性化したことが示唆される。錐体細胞における情報処理能力を示唆するとされている神経発火 (burst) 頻度を解析した結果、PFCでDiosgenin投与による有意な増加が認められた。記憶の固定化に重要とされているPFCとHPCの同時発火頻度を検討したところ、HPC-PFC間での神経細胞群の同時発火はDiosgenin投与により有意に上昇した。

3) Diosgenin 投与によるLocal field potentialパターンの変化

Local field potential を0.1-1.0 Hz (slow), 1.0-4.0 Hz (delta), 4.0-10 Hz (theta), 30-50 Hz (gamma)の範囲で解析した。その結果、PFCのgamma帯のoscillationがDiosgenin投与により有意に増加した。近年の研究でPFCでのgamma oscillationは錐体細胞と介在神経の同期活動によって生じるもので、特にPFCでは認知機能に強く関わっていることが示されている。

5XFAD マウスにおける記憶障害改善と軸索変性の改善

アルツハイマー病モデルマウス5XFAD (メス, 6-8か月齢) にDiosgenin (Wako) 10 $\mu\text{mol/kg}$ を20日間腹腔内投与した。Diosgenin投与により、物体認知記憶の障害が有意に改善され、大脳皮質、海馬でのAmyloid plaqueに限局して見られる軸索・プレシナプスの変性も有意に改善された。またDiosgenin投与は神経原線維変化の増加を有意に抑制した。

Diosgenin 受容体の探索

以前の研究(東田)よりDiosgenin受容体候補と目していた1,25D3-MARRSについて検討した。1,25D3-MARRSの生理的リガンドである $1\alpha,25\text{-dihydroxy vitamin D}_3$ の結合を大脳皮質神経細胞で検出し、それをDiosgeninがreplaceすることを見出した。また、大脳皮質神経細胞で1,25D3-MARRSをノックダウンさせると、Diosgeninによる突起伸展が完全に見られなくなった。以上の結果は、Diosgeninが1,25D3-MARRSを介してシグナル伝達することを示唆する。

■結論

Diosgenin投与により、認知機能亢進に関わる種々の神経活動が増強されることが示され、正常動物においても記憶機能を高めるDiosgeninの作用が、神経生理学的知見からも支持された。5XFADマウスにおけるDiosgenin作用の電気生理学的な検討も、現在準備中である。また、Diosgeninのシグナリングの詳細をさらに検討することや、Diosgenin受容体をより強く活性化し得る新化合物の合成も今後の課題とし、記憶障害改善作用に繋がる治療戦略の前進を目指す。

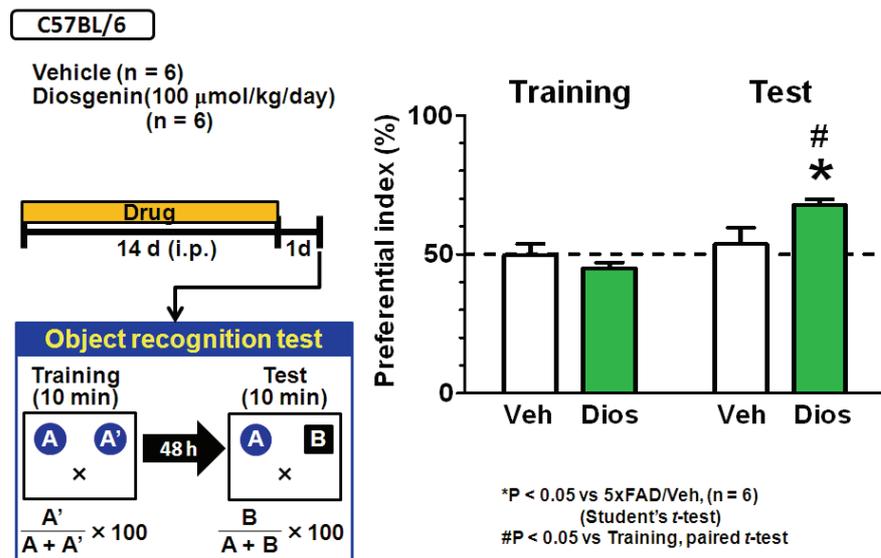
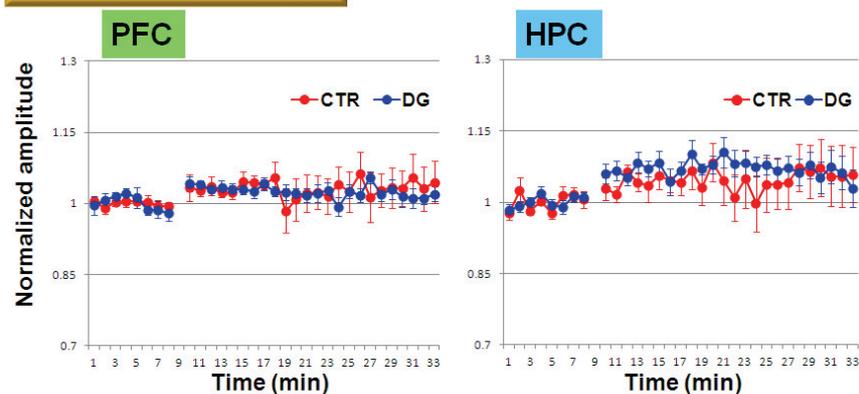


図1 C57B/6 マウスの物体認知記憶に対する Diosgenin の促進作用

長期増強反応への影響



Tetanic stimulation

PFC 10 sets (1set = 10 trains @10Hz, 1 train = 5 pulse@100 Hz, 1 pulse = 200 μsec)

HPC 10 sets (1set = 10 trains @5Hz, 1 train = 5 pulse@100 Hz, 1 pulse = 200 μsec)

図2 C57B/6 マウスの前頭皮質および海馬における長期増強反応に対する Diosgenin の作用

単一神経細胞の活性化の程度

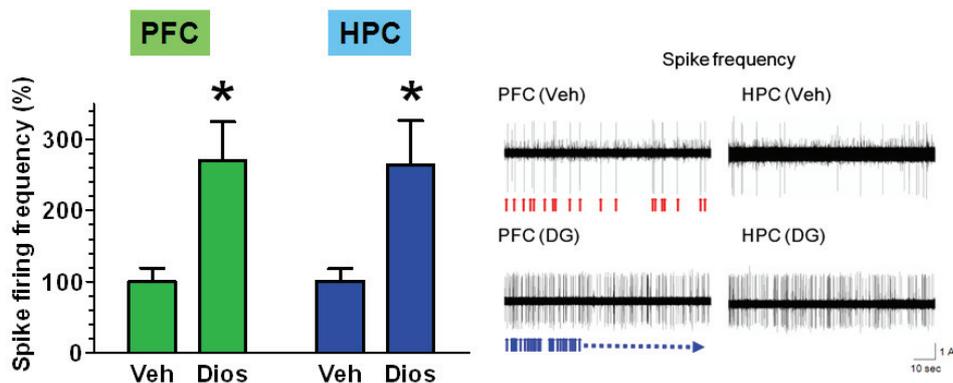


図3 C57B/6 マウスの前頭皮質および海馬における自発性発火頻度に対する Diosgenin の促進作用

PFC-HPC間の神経発火の同期性

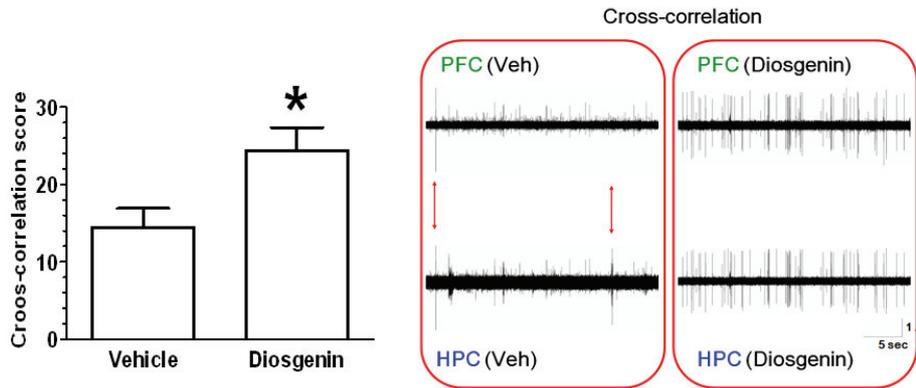


図4 C57B/6 マウスの前頭皮質と海馬間の自発性発火の同期性に対する Diosgenin の促進作用

集合電位の周波数特性

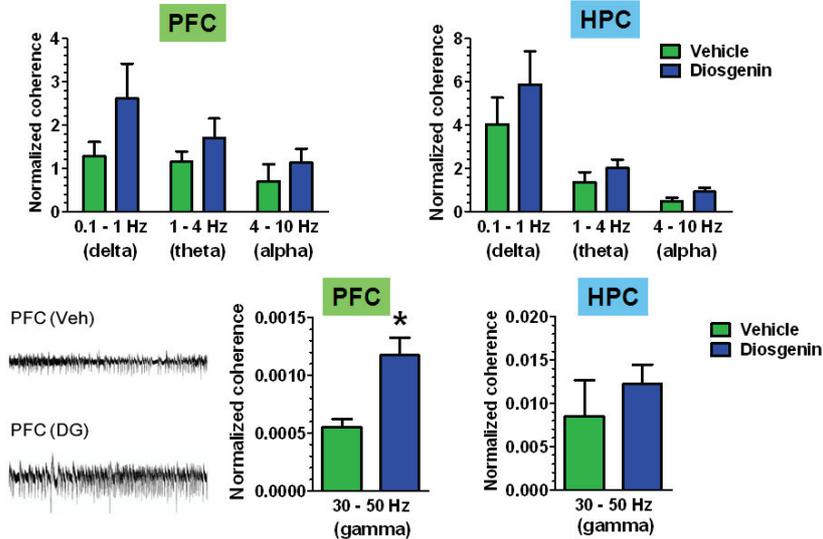


図5 C57B/6 マウスの前頭皮質および海馬における集合電位に対する Diosgenin の促進作用

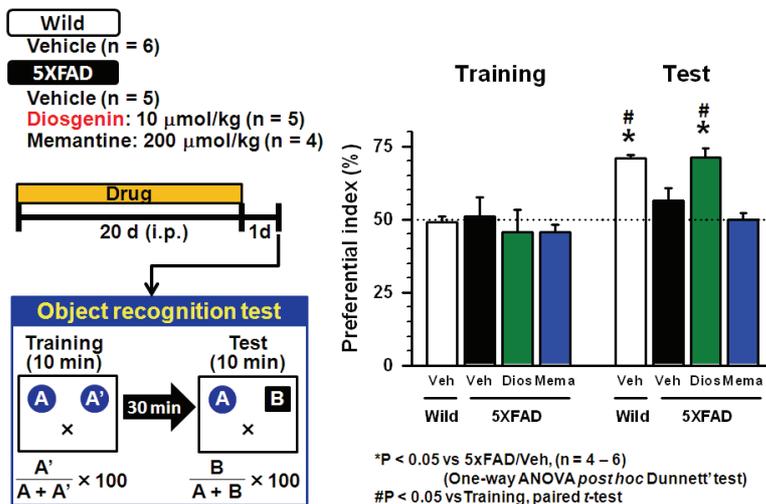


図6 5XFAD マウスの物体認知記憶障害に対する Diosgenin の改善作用と Memantine の無効性

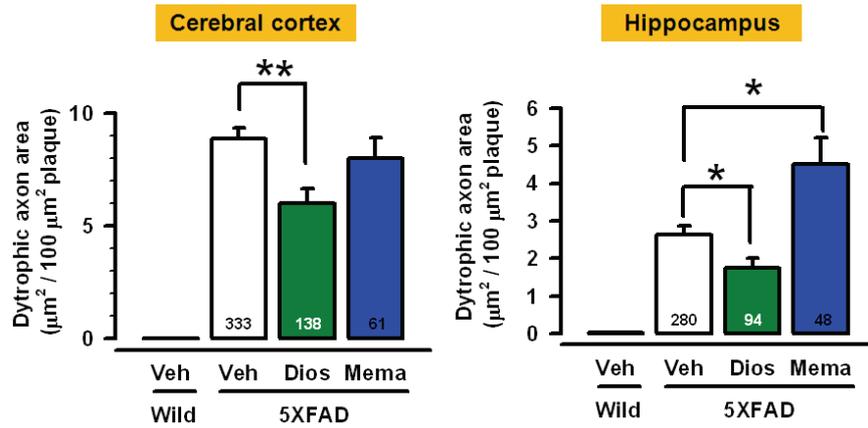


図7 5XFAD の大脳皮質と海馬における Amyloid plaque 内に局限した変性軸索の増加に対する Diosgenin の抑制作用と Memantini の無効性

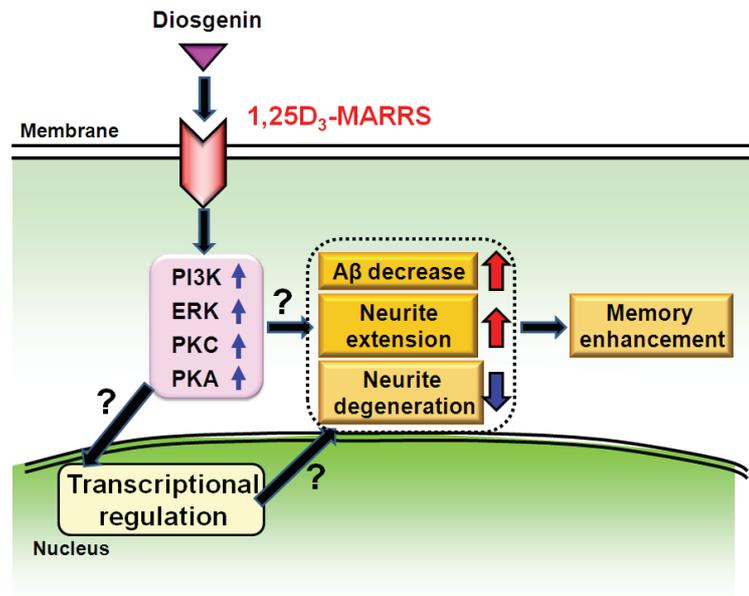


図8 本研究で示唆された Diosgenin のシグナリング