

研究ノート

アルツハイマー型認知症治療薬ドネペジルによる神経幹細胞から神経細胞への分化誘導に関する研究

¹木下由佳、²工藤明星、³三輪沙也加、
⁴玉江仁美、⁵山川真貴子、⁶眞田法子、
⁷木津良一

¹同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別任用助教（2018年3月退職）

²同志社女子大学・薬学部・医療薬学科（2009年度卒業生）

³同志社女子大学・薬学部・医療薬学科（2011年度卒業生）

⁴同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・6年次生

⁵同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・5年次生

⁶同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・特別任用助教

⁷同志社女子大学・薬学部・医療薬学科・教授

Studies on the Differentiation of Neural Stem Cells into Neurons by Donepezil, a Drug for Alzheimer's Disease

¹Yuka Kinoshita, ²Akari Kudo, ³Sayaka Miwa
⁴Hitomi Tamae, ⁵Makiko Yamakawa, ⁶Noriko Sanada
⁷Ryoichi Kizu

¹Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Special Appointment Assistant Professor (Retirement in March 2018)

²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2009

³Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Graduate of 2011

⁴Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, 6th Grader

⁵Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, 5th Grader

⁶Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Special Appointment Assistant Professor

⁷Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's College of Liberal Arts, Professor

1. 序文

近年、高齢化に伴い認知症の患者数が増加し、認知症患者の夜間徘徊、迷子、事故が後を絶たず深刻な社会問題となっている。現在我が国の認知症患者数は推定240万人と言われており、認知症の原因として最も多いのがアルツハイマー病である。アルツハイマー病の主症状は、脳内の神経細胞が徐々に死滅し、記憶・認知機能の低下である。治療薬としてはアセチルコリンエステラーゼ阻害薬の donepezil, galantamine, rivastigmine, NMDA受容体拮

抗薬の memantine があり、donepezil が最も多く用いられている。しかしこれら医薬品は症状の進行抑制を目的とするものであり、症状が進行してしまった記憶・認知機能を回復する長期的な治療法はまだ開発されていない。

アルツハイマー病は患者の脳内の神経細胞は徐々に死滅していく疾患であり、その原因についての研究は多岐にわたる。中でも最も多く研究されているのは、神経細胞が死滅する原因とされる β -アミロイドタンパク質 [1] やタウタンパク質 [2] の発現や蓄積についてであるが、依然としてそのメカニズムについては明らかとなっていない。一

方、アルツハイマー病の治療法の1つとして、脳内に神経細胞を移植する方法が検討されているが、移植手術は高齢者に負担が大きく予後に影響を及ぼす懸念がある。

記憶・学習機能を司る神経細胞の元となる神経幹細胞は、胎児や乳児だけでなく成人になっても新生し続け、中枢神経系の細胞へ分化していること [3]、アルツハイマー病患者の脳内にも神経幹細胞が新生していること [4] が明らかとなっている。高齢化が進み、認知症患者の増加が見込まれる中、脳内で神経幹細胞の新生の促進、神経幹細胞から神経細胞へ分化を促進させ、委縮した脳を少しでも回復させることができればアルツハイマー病の根治的な治療につながると考えられる。

ヒト副腎髄質由来のPC12細胞は神経突起様突起を伸張することから、神経幹細胞のモデル細胞として用いられている。アルツハイマー病における神経細胞の再生に関連する研究で、アセチルコリンエステラーゼ阻害薬のdonepezilがPC12細胞の神経突起様突起の伸張を促進することが報告された [5]。しかしながら、donepezilのメカニズムについては未だ不明であるほか、PC12細胞は副腎髄質由来褐色細胞腫であり、神経突起様突起を伸張するものの、神経幹細胞や神経細胞としての特質は示さない。そこで本研究では、アルツハイマー病患者における神経細胞の再生を促進する研究の一環として、マウス由来で海馬中の神経幹細胞と同等性が認められているマウス小脳由来神経幹細胞の株化細胞であるC17.2細胞 [6] を用い、神経幹細胞から神経細胞への分化に及ぼすdonepezilの効果を検討した。

2. 方法

2-1. 使用薬物・化合物

マウス小脳神経幹細胞C17.2細胞は、DSファーマバイオメディカルから購入した。donepezilは塩酸塩を和光純薬工業から、(-)-nicotineは酒石酸ナトリウム塩をSigma-Aldrichから購入した。その他の試薬類は全て市販品を用いた。donepezilは純水に溶解し、ポアサイズが $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターでろ過滅菌して使用した。

2-2. C17.2細胞の培養

C17.2細胞の培養において、継代・維持には基本培地 [DMEM-10% fetal bovine serum (FBS) -100 U/mL penicillin-100 mg/mL streptomycin]、分化実験には分化用培地 [DMEM-1% FBS] を用いた。培養は 37°C 、

$5\% \text{CO}_2$ -95%空気、湿度飽和の条件下で行った。

2-3. C17.2細胞の増殖および生存に対するdonepezilの影響

C17.2細胞を基本培地に懸濁し、 $2 \times 10^3 \text{ cell/cm}^2$ となるように48-wellプレートに播種した。24時間後にPBSで洗浄したのち、donepezilを1または2 Mとなるように添加した分化用培地を加え、培養を続けた。培養96時間後に生細胞数はCellTiter-Glo[®]Luminescent Cell Viability Assayキット (Promega) を用いて、また死細胞数はCytoTox 96[®]Non-Radioactive Cytotoxicity Assayキット (Promega) を用いて評価した。いずれにおいても操作はキットのプロトコールに従った。

2-4. データ解析

得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計学的有意差はStudent's *t*-testで検定し、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ で有意差ありと判定した。

3. 結果及び考察

3-1. C17.2細胞の生存に対するdonepezilの影響

まず最初に、donepezilがC17.2細胞の生存に及ぼす影響について検討した。C17.2細胞を1、2、 $5\mu\text{M}$ のdonepezilで96時間処理した後、生細胞数と死細胞数を評価した。その結果をFigure 1に示した。donepezil処理の生細胞数は無処理と比較して統計学的な有意差は無いものの、 $1-5\mu\text{M}$ の範囲で濃度依存的に低くなる傾向が見られた (Figure 1A)。死細胞数でも同様に、donepezil処理では無処理と比較して低くなる傾向が見られた (Figure 1B)。検討した濃度範囲でdonepezilは細胞死を惹起することは無く、増殖を抑制する可能性があることから、以下の検討においてはdonepezil濃度は $2\mu\text{M}$ 以下とすることに定めた。

3-2. C17.2細胞の分化に対するdonepezilの効果

上記の結果に基づき、C17.2細胞を1または $2\mu\text{M}$ のdonepezilで処理し、全細胞数に対するdC17.2細胞の割合を算出した。その結果をFigure 2に示した。Figure 1Aには無処理のC17.2細胞と $1\mu\text{M}$ donepezilで処理した顕微鏡画像を示した。矢印は伸張した神経突起を示しており、donepezil処理により神経突起の伸張が促進されている。

Figure 2Bには無処理およびdonepezil処理における全細

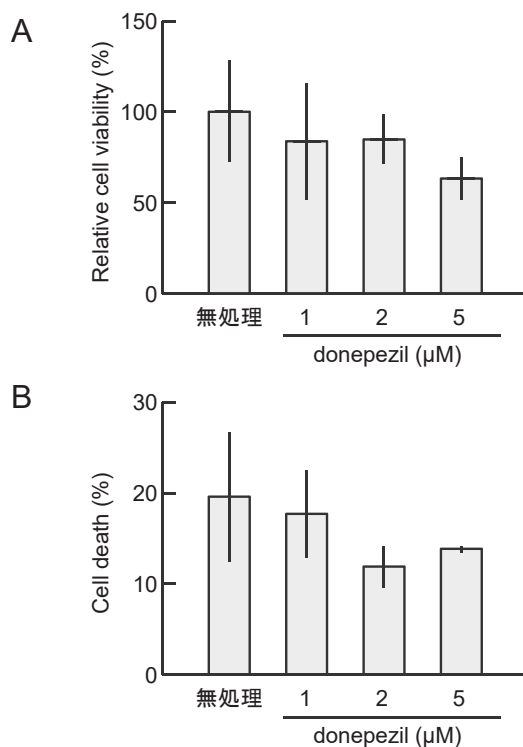


Figure 1. C17.2細胞の増殖および生存に及ぼすdonepezilの効果

- (A) 無処理およびdonepezil処理した場合の細胞数 (相対値)
 (B) 無処理およびdonepezil処理した場合の総細胞数に対する死細胞数の割合
 平均値 ± SE (n = 4)

胞数に対するdC17.2細胞数の割合 (%) を示した。dC17.2細胞の割合は、無処理では約3%であったが、1 μM処理では約9%、2 μM処理では約18%であった。donepezilによる濃度依存的な伸張突起伸張の促進が観察され、donepezilはC17.2細胞において神経細胞への分化を促進することが明らかになった。

Figure 1Aではdonepezil処理により生細胞数が減少する傾向が見られた。神経細胞は細胞分裂せず増殖しない。神経突起を伸張したC17.2細胞の分裂能についてはまだ知見がないが、神経細胞への分化が進行するに従い分裂能が低下することは十分考えられる。donepezil処理により神経細胞への分化が促進された結果、細胞の増殖が低下したものと考えられ、Figure 1AとFigure 2Bの結果は良く整合するものと考えられた。

Figure 1Bに示したように、統計学的な有意差はないものの、donepezil処理により細胞死が減少する、言い換えると、生存率が向上する傾向が見られた。2 μM

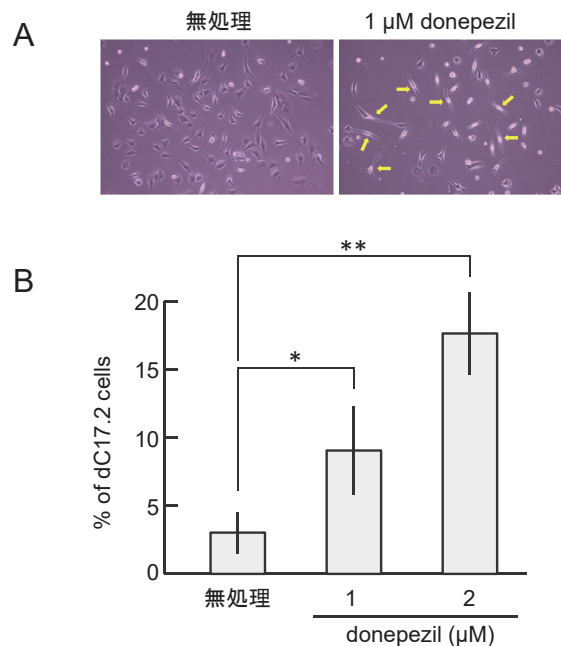


Figure 2. C17.2細胞の神経突起伸張に及ぼすdonepezilの効果

- (A) 無処理およびdonepezil処理した細胞の顕微鏡画像
 黄色矢印は神経突起を伸張した細胞。
 (B) 無処理およびdonepezil処理した場合のdC17.2細胞の割合
 平均値 ± SE (n = 4)、* : $P < 0.05$ 、** : $P < 0.01$

donepezil処理における生細胞数は無処理の約85% (Figure 1A) である一方、死細胞割合は無処理の約60% (Figure 1B) まで低下しており、donepezilはC17.2細胞の非分化細胞/分化細胞に対して細胞死保護作用を示す可能性がある。

ラット大脳皮質においてグルタミン酸で惹起される神経細胞障害に対して、donepezilはアセチルコリン受容体への作用を介して保護作用を示すことが報告されている [7]。本研究においても、解析途上であるがC17.2細胞でアセチルコリン受容体が発現しているとの結果が得られている。本研究で観察されたdonepezilの分化促進作用や細胞死保護作用とアセチルコリン受容体の関連を明らかにすることが重要と考えられる。

4. 謝辞

本研究の一部は、2015年度同志社女子大学研究助成金 (個人研究) により行われた。

5. 参考文献

- [1] Toda N, Okamura T, Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **32**, 569-578 (2012).
- [2] Takach O, Gill TB, Silverman MA, Modulation of insulin signaling rescues BDNF transport defects independent of tau in amyloid- β oligomer-treated hippocampal neurons. *Neurobiol Aging*, **36** (3), 1378-1382 (2015).
- [3] Reynolds BA, Weiss S, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, **255**, 1707-1710 (1992).
- [4] Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA, Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 343-347 (2003)
- [5] Oda T, Kume T, Katsuki H, Niidome T, Sugimoto H, Akaike A, Donepezil Potentiates nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *J Pharmacol Sci*, **104**, 345-354 (2007).
- [6] Zang Y, Yu LF, Pang T, Fang LP, Feng X, Wen TQ, Nan FJ, Feng LY, Li J, AICAR induces astroglial differentiation of neural stem cells via activating the JAK/STAT3 pathway independently of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **283**, 6201-3208 (2007).
- [7] Takada Y, Yonezawa A, Kume T, Katsuki H, Kaneko S, Sugimoto H, Akaike A, Nicotinic acetylcholine receptor-mediated neuroprotection by donepezil against glutamate neurotoxicity in rat cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, **306**, 772-777 (2003).