

日本神経化学会奨励賞受賞者研究紹介

## 軸索再伸長を基盤としたアルツハイマー病の 根本的治療戦略の開発

楊 熙蒙

富山大学 和漢医薬学総合研究所 神経機能学領域

### はじめに

近年、認知症患者数の急増は深刻な社会問題となっており、2025年には高齢者の5人に1人が認知症に罹患すると推測されている。認知症の過半数を占めるのが、アルツハイマー病 (AD) である。ADでは、脳に amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) が沈着することで、様々な神経機能を担う神経回路網が破綻し、認知機能障害を始めとした脳機能障害が引き起こされる。しかし、長年承認薬として用いられてきたコリンエステラーゼ阻害薬 (ドネペジル、ガランタミン、リバスチグミン) や NMDA 受容体拮抗薬 (メマンチン) は、認知機能障害の進行を遅らせる対症療法にとどまっている。また、2023年に原因物質 ( $A\beta$ ) の除去を狙った新薬として、 $A\beta$  抗体のレカヌマブが各国で承認された。軽度認知障害または軽度 AD の比較的早期のステージからレカヌマブを投与すると、脳内の  $A\beta$  が減少し認知機能障害の進行は数ヶ月遅れるものの、認知機能の低下が完全に止まるわけではないことが示されている<sup>1)</sup>。この理由は、AD 発症よりも 20-30 年も前の無症状期から  $A\beta$  の蓄積が始まっており、それに伴って神経回路が進行性に変性するため、 $A\beta$  の除去だけでは既に破綻した神経回路の修復は困難だからである。

そこで筆者は、“破綻した脳の神経回路を再形成する”ことが、AD の根本的治療に必須であると考えた。神経回路の形成には、神経細胞の軸索が投射先の神経細胞の樹状突起にシナプス結合する必要があるが、特に軸索は遠く離れた脳部位に向かって

長く伸長しなければならない。しかし、成体の脳においては、一度変性した軸索は再伸長できないと長年考えられてきたため、治療戦略としてほとんど着目されてこなかった。近年、成体脳においても軸索が近位には自発的に再伸長することが報告されたものの<sup>2,3)</sup>、軸索が遠く離れた投射先に向かって再伸長するかどうかを評価するには至っておらず、これを達成できる薬物も見出されてこなかった。本稿では、AD モデルマウス脳内の軸索を長距離に向かって再伸長させ、記憶障害を回復させた和漢薬成分 “diosgenin” の研究成果について紹介する。

### アルツハイマー病モデルマウスの記憶障害を回復させる化合物 diosgenin

筆者の研究グループでは、かねてより、初代培養神経細胞において  $A\beta$  で萎縮した軸索を再伸長させる薬物を探索してきた。その中で、特に優れた軸索再伸長活性を示したのが、山薬 (ヤマノイモ科 *Dioscorea japonica* または *D. batatas* の根茎) 中に含有されるステロイドサポゲニン化合物の diosgenin である (図1)。また、diosgenin を AD モデル (5XFAD) マウスに投与し、記憶障害の回復作

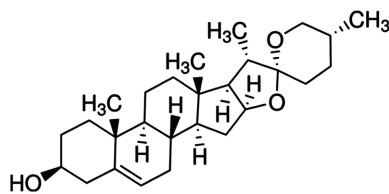


図1 Diosgenin の構造式

用を検討した。5XFAD マウスとは、5種類の家族性アルツハイマー病変異遺伝子を神経細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスである<sup>4)</sup>。このマウスでは、約2ヶ月齢から脳で $A\beta$ の蓄積が始まり、4-5ヶ月齢から記憶障害が生じる。記憶障害が進行した6-8ヶ月齢の5XFAD マウスにdiosgeninを20日間投与すると、マウスの物体認知記憶障害が回復した<sup>5)</sup>。

### Diosgenin の軸索再伸長及び記憶回復に関わる分子の探索

Diosgenin の軸索再伸長及び記憶回復に関わる直接結合タンパク質を drug affinity responsive target stability (DARTS) 法で網羅的に探索したところ、活性型ビタミンD3受容体である $1,25D_3$ -membrane-associated rapid response steroid-binding receptor ( $1,25D_3$ -MARRS) が同定された<sup>5, 6)</sup>。また、diosgenin による $1,25D_3$ -MARRS の刺激後に神経細胞内で引き起こされる分子シグナル変化を解析した結果、野生型マウスと比べて5XFAD マウスの脳では増加するが、diosgenin を投与した5XFAD マウスの脳で減少したタンパク質として、heat shock cognate (HSC) 70 を同定した。HSC70 の活性阻害剤である VER-155008 を初代培養神経細胞に処置すると、 $A\beta$ で萎縮した軸索が再伸長した。また、VER-155008 を5XFAD マウスに投与すると、マウスの物体認知記憶、空間記憶、エピソード記憶の

いずれの障害も改善され、脳内の軸索終末の変性や $A\beta$ プラーク、リン酸化タウの蓄積も減少した。この際、投与された VER-155008 が脳に移行していることも確認された<sup>7)</sup>。さらに、HSC70 の発現量が減少した後に、軸索再伸長に直接つながる下流分子を探索した結果、神経細胞中で HSC70 と結合するタンパク質として、細胞骨格タンパク質である $\alpha$ -tubulin を同定した。HSC70 は、様々な結合タンパクの分解を促進するが、 $A\beta$ を処置した軸索上では $\alpha$ -tubulin が減少した。一方、 $A\beta$ 処置後から diosgenin を処置すると、軸索上の $\alpha$ -tubulin 量が正常レベルにまで増加した。よって、diosgenin は HSC70 を減少させることで、HSC70 による $\alpha$ -tubulin の分解を抑制し、軸索再伸長や記憶回復に関わる可能性が示された (図2)<sup>8)</sup>。

### Diosgenin による AD モデルマウスの脳内での軸索再伸長作用とその分子メカニズム

Diosgenin 投与が5XFAD マウス脳内の萎縮した軸索をつなげるべき脳部位に再伸長させるかどうかを検討するために、記憶形成に関わる海馬-前頭前野に着目した<sup>9)</sup>。野生型マウス及び5XFAD マウスの前頭前野に、赤色蛍光の逆行性トレーサー Dextran Texas Red (3000 MW) を注入後、溶媒または diosgenin を14日間経口投与し、同じ前頭前野に緑色蛍光の逆行性トレーサー Dextran FITC (3000 MW) を注入した。その7日後に脳を摘出し、海馬切片を観

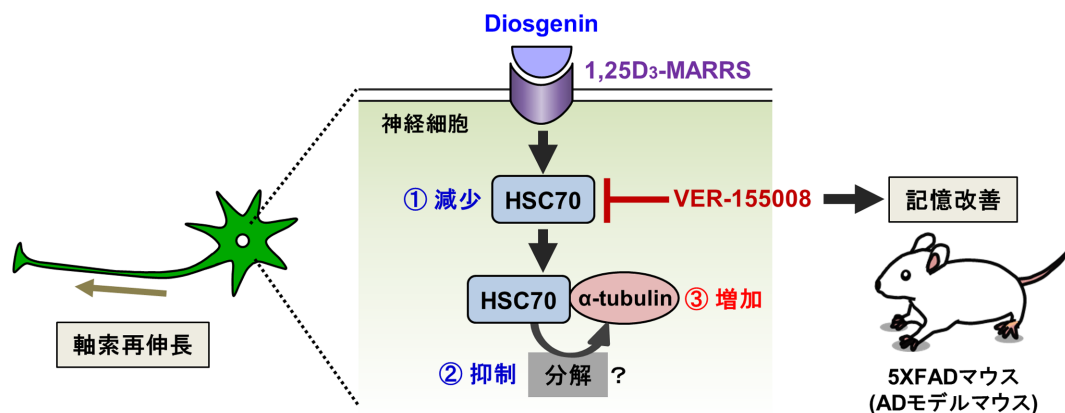


図2 Diosgenin の軸索再伸長及び記憶回復に関わる分子

察した。薬物投与によって海馬-前頭前野において軸索が萎縮した神経細胞は赤色のみで、軸索が再伸長した神経細胞は緑色のみで、軸索が伸びも縮みもしなかった神経細胞は赤・緑色の2色で標識された。解析の結果、5XFAD マウスでは海馬-前頭前野に投射する軸索が減少していること、また、diosgenin の投与により本回路の軸索が再伸長することがそれぞれ示された<sup>10)</sup>。続いて、本回路において軸索が再伸長した海馬神経細胞をレーザーマイクロダイセクションによって採取し、発現量が変化する遺伝子を網羅的に探索した。その結果、軸索が再伸長した神経細胞において発現量が最も増加したタンパク質として、SPARC (Secreted protein acidic rich in cysteine) 及び Galectin-1 (lectin, galactose binding soluble 1) を同定した。

AAV9 ベクターを用いて海馬神経細胞特異的に

SPARC または Galectin-1 を過剰発現すると、5XFAD マウスの物体認知記憶及び空間記憶の障害が回復し、海馬から前頭前野に投射する軸索の再伸長も促進された。また、DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs) システムを用いて、5XFAD マウスの海馬から前頭前野に軸索を再投射した神経細胞特異的に、その興奮性活動を抑制すると、SPARC の過剰発現によっていったん示された記憶改善作用が消失した<sup>10)</sup>。さらに、軸索伸長中の軸索では特に軸索膜上で SPARC が増加すること、軸索の軌跡に沿うように細胞外 I 型 collagen が並ぶこと、軸索が萎縮しても I 型 collagen は残ること、軸索膜上の SPARC は細胞外に残存した I 型 collagen をたどるように相互作用することで、元々伸びていた方向に軸索が再伸長することを明らかにした<sup>10)</sup>。また、Galectin-1 は海馬

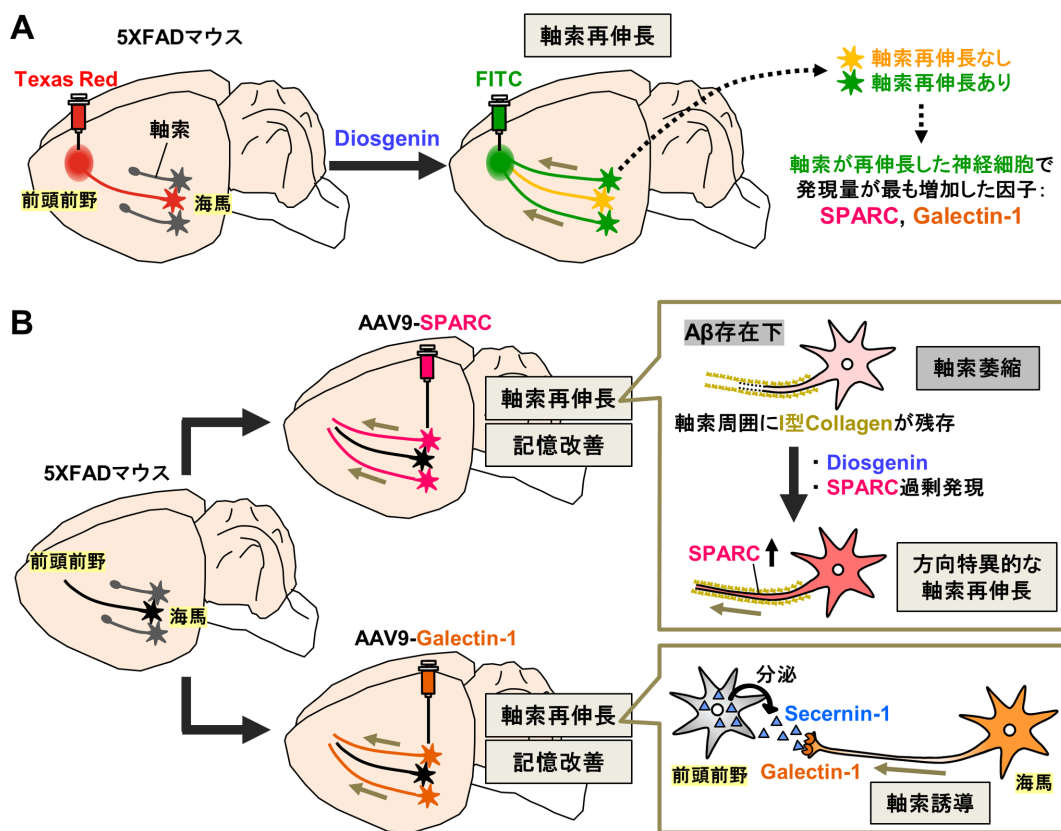


図3 Diosgenin による脳内での軸索再伸長作用とその分子メカニズム

(A) 5XFAD マウスに diosgenin を投与すると、海馬-前頭前野において軸索が再伸長した。(B) 海馬-前頭前野での軸索再伸長に関わる神経細胞中の機能分子として、SPARC 及び Galectin-1 を同定した。

神経細胞の成長円錐膜上で発現し、前頭前野から分泌される新規軸索誘導因子 Secernin-1 の受容体としてはたらくことで、海馬-前頭前野の軸索誘導に関わることを示した<sup>11)</sup>。以上より、diosgenin が AD 脳内の軸索を長距離に再伸長させることを明らかにし、本現象を担う責任分子として SPARC 及び Galectin-1 を同定した (図3)。

## Diosgenin 高濃度山薬エキスによる正常マウス及び健常人の記憶亢進作用の検討

ここまでの研究成果より、diosgenin が AD に対して有力な新規治療薬候補であることを提示してきた。Diosgenin の基礎研究を社会実装するにあたり、臨床研究の実行可能性の観点から、化合物 diosgenin での創薬だけでなく、diosgenin を含有した山薬エキスでのトランスレーショナルリサーチを進めることにした。山薬が食薬区分上の非医であることを生かし、これを機能性表示食品として開発することを視野に入れ、正常マウスに対する山薬エキスの記憶亢進作用を検討した。山薬中の diosgenin 含量は、*Dioscorea* 属の種類に依存して大きく異なる。特に、日本薬局方で規定される山薬 (基原植物が *D. japonica* 又は *D. batatas*) は、diosgenin 含量が非常に低い<sup>12)</sup>。一方で、山薬中には、種々の diosgenin 配糖体が含有されており、服用後に生体内 (主に腸内細菌による) で diosgenin に代謝されるとされているが<sup>13)</sup>、その代謝効率は低い<sup>14)</sup>。そこで、日本薬局方の山薬を常法通り熱水抽出した場合の常法山薬エキス、及び中国河南省で栽培された diosgenin 配糖体の含量が高い *D. batatas* を基原とする山薬を含水エタノールで抽出後、酸加水分解処置を施し、エキス中の diosgenin 含量を 15-16% まで高めた diosgenin 高濃度山薬エキスを用いて、正常マウスに対する記憶亢進作用を検討した。その結果、日本薬局方の山薬熱水抽出エキス中には diosgenin がほとんど含まれておらず、経口投与後に十分量の diosgenin が脳移行しないため、記憶亢進作用を示さなかった。一方で、diosgenin 高濃度山薬エキスを油溶媒で経口投与すると、diosgenin の脳移行が格段に向上し、

マウスの記憶が亢進した<sup>15,16)</sup>。

続いて、この diosgenin 高濃度山薬エキスを用いて、健常人に対する認知機能向上作用を検討することを目的として、臨床試験を行った。20-81 歳の 28 名の被験者に対し、ランダム化二重盲検クロスオーバー試験にてプラセボまたは山薬エキスの 12 週間服用前後で、認知機能を測る Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status (RBANS) 試験を行った。その結果、プラセボ群と比較して山薬エキスを 12 週間服用した群では、認知機能が向上することが示された<sup>17)</sup>。現在は、軽度認知障害及び軽度 AD 患者の認知機能に対する臨床試験を実施し終え、結果解析中である。さらに、これらの科学的根拠に基づき、機能性表示食品「ジオスゲニン・ゴールド (レジオ株式会社)」の開発に繋げることができた。

## おわりに

成体脳では、損傷した神経回路は二度と再生できないと長年認識されてきたため、AD を始めとした神経変性疾患の根本的治療は不可能であると一般的に考えられてきた。しかし、diosgenin の発見により、AD 脳の破綻した神経回路を再形成し、脳機能を再び活性化しうることを示すことができた。病因物質に着目し AD の発症や進行を遅らせるという治療戦略に加えて、発症後の機能障害の回復が実現してこそ、真の根本的治療となる。今後も、diosgenin をはじめ神経回路の再形成に有用な薬物の作用メカニズム解析を展開し、脳の神経回路が修復される分子機構のさらなる解明を目指していきたい。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、学部生時代から現在に至るまで、様々な面から親身なご指導を賜いました富山大学和漢医薬学総合研究所神経機能学領域 東田千尋教授に、この場をお借りして心より厚く御礼申し上げます。また、日々支えてくださいました研究室の皆様、多くの共同研究者の先生方にも心より感謝申し上げます。



今でも、学部生の時に初めて日本神経化学会大会の若手道場セッションで発表させていただいた緊張感を鮮明に覚えています。日本神経化学会の先生方には、多くの刺激と成長の機会を与えていただき、深く感謝申し上げます。また、この度、日本神経化学会奨励賞を賜り、本稿の執筆機会を与えて下さいました日本神経化学会優秀賞・奨励賞選考委員の先生方、ならびに関係者の先生方、編集部の皆様に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*, 388(1), 9–21 (2023).
- 2) Jin Y, Dougherty SE, Wood K, Sun L, Cudmore RH, Abdalla A, Kannan G, Pletnikov M, Hashemi P, Linden DJ. Regrowth of serotonin axons in the adult mouse brain following injury. *Neuron*, 91(4), 748–762 (2016).
- 3) Li S, Overman JJ, Katsman D, Kozlov SV, Donnelly CJ, Twiss JL, Giger RJ, Coppola G, Geschwind DH, Carmichael ST. An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci*, 13(12), 1496–1504 (2010).
- 4) Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, Guillozet-Bongaarts A, Ohno M, Disterhoft J, Van Eldik L, Berry R, Vassar R. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 26(40), 10129–10140 (2006).
- 5) Tohda C, Urano T, Umezaki M, Nemere I, Kuboyama T. Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D<sub>3</sub>-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep*, 2(1), 535 (2012).
- 6) Tohda C, Lee YA, Goto Y, Nemere I. Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D<sub>3</sub>-MARRS. *Sci Rep*, 3(1), 3395 (2013).
- 7) Yang X, Tohda C. Heat shock cognate 70 inhibitor, VER-155008, reduces memory deficits and axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol*, 9, 48 (2018).
- 8) Yang X, Tohda C. Diosgenin restores A $\beta$ -induced axonal degeneration by reducing the expression of heat shock cognate 70 (HSC70). *Sci Rep*, 8(1), 11707 (2018).
- 9) Wang C, Furlong TM, Stratton PG, Lee CCY, Xu L, Merlin S, Nolan C, Arabzadeh E, Marek R, Sah P. Hippocampus-prefrontal coupling regulates recognition memory for novelty discrimination. *J Neurosci*, 41(46), 9617–9632 (2021).
- 10) Yang X, Tohda C. Diosgenin restores memory function via SPARC-driven axonal growth from the hippocampus to the PFC in Alzheimer's disease model mice. *Mol Psychiatry*, 28(6), 2398–2411 (2023).
- 11) Yang X, Tohda C. Axonal regeneration mediated by a novel axonal guidance pair, Galectin-1 and Secernin-1. *Mol Neurobiol*, 60(3), 1250–1266 (2023).
- 12) Vendl O, Wawrosch C, Noe C, Molina C, Kahl G, Kopp B. Diosgenin contents and DNA fingerprint screening of various yam (*Dioscorea* sp.) genotypes. *Z Naturforsch C J Biosci*, 61(11–12), 847–855 (2006).
- 13) Yi T, Fan LL, Chen HL, Zhu GY, Suen HM, Tang YN, Zhu L, Chu C, Zhao ZZ, Chen HB. Comparative analysis of diosgenin in *Dioscorea* species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. *BMC Biochem*, 15(1), 19 (2014).
- 14) Okawara M, Tokudome Y, Todo H, Sugibayashi K, Hashimoto F. Enhancement of diosgenin distribution in the skin by cyclodextrin complexation following oral administration. *Biol Pharm Bull*, 36(1), 36–40 (2013).
- 15) Yang X, Nomoto K, Tohda C. Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of Yam extracts. *J Nat Med*, 75(1), 207–216 (2021).
- 16) Tohda C, Yang X, Nomoto K. Transported amount of diosgenin to the brain is differed by a solvent fat. *JJFCS*, 27(2), 102–105 (2020).
- 17) Tohda C, Yang X, Matsui M, Inada Y, Kadomoto E, Nakada S, Watari H, Shibahara N. Diosgenin-rich yam extract enhances cognitive function: a placebo-controlled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults. *Nutrients*, 9(10), 1160 (2017).