

アルツハイマー病における脳糖尿病仮説の実証 ～メマンチンは脳インスリンシグナルを改善する～

森口 茂樹

(東北大学大学院薬学研究科薬理学分野)

はじめに

アルツハイマー病 (AD) は、軽度から重度の認知機能障害を主症状とする疾患であり、進行状況に応じて周辺症状である徘徊、暴言、攻撃症状、うつ症状、不安症状などの精神障害の出現が報告されている。日本での認知症の患者数は 462 万人 (2012 年度厚生労働省患者調査) と推計されており、約 60% が AD であり患者数は毎年増加している。経済産業省の技術戦略マップ 2010 においても、AD は糖尿病とがんに並ぶ重要疾患に位置付けられ、技術開発の一つの柱は「認知機能維持・回復のための治療」であり、新規作用機序を持つ医薬品の開発を挙げている。具体的には、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤など対症療法、セクレターゼ阻害剤やアミロイド β ・タウ免疫療法などの根本治療薬の開発である。現在、AD 治療薬としてアセチルコリン神経系の機能低下に注目したアセチルコリン賦活化作用をもつアセチルコリンエステラーゼ阻害剤が開発され、ドネペジル、リバスチグミンおよびガランタミンが承認を受け、また、神経細胞保護効果に注目した NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンも同様に承認を受けた。近年 AD のアミロイド β ($A\beta$) 仮説に基づき、 $A\beta$ を標的とした作用機序の医薬品開発が多数進められている (2013 年時点で 60 化合物以上) が、現状ではどれも上市されていない。このことから AD 治療薬の治療満足度・貢献度は共に十分ではなく、患者の QOL 向上を考慮する上で、認知機能改善効果だけでなく周辺症状を改善する新しい作

用機序を有する低分子化合物の開発が望まれている。

最近、AD 患者の脳ではインスリンシグナルの機能異常が報告され¹⁾、「AD は脳糖尿病」という仮説の実証が進められている。糖尿病は AD のリスクファクターとして考えられてきたが、脳内グルコースによる糖代謝異常が AD の神経変性疾患に関与する可能性が示唆される。本稿では、AD の脳糖尿病仮説について、著者らの研究報告と共に、その最新の知見を紹介する。

K_{ATP} チャネルの分布と生理機能

ABC タンパクファミリーに属するスルフォニルウレア受容体 (SUR) と膜 2 回貫通型の ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャネル (Kir6.1/Kir6.2 チャネル) は、異種八量体 (hetero-octamer) 構造を形成する。K_{ATP} チャネルは、細胞内の ATP 濃度が増加すると閉鎖し、逆に、ATP 濃度が減少するもしくは ATP 合成を減少させる 2,4-dinitrophenol (DNP) の濃度が上昇すると開口する、すなわち、細胞の代謝状態により細胞興奮を調節している²⁾。K_{ATP} チャネルは、膵臓 β 細胞、心筋、骨格筋、平滑筋、中枢および末梢神経細胞などの組織において、その発現が確認されている³⁾。現在までに、糖尿病治療薬として用いられてきた SUR 剤 (トルブタミド、グリベンクラミドなど) は、SUR を介して K_{ATP} チャネルを特異的に抑制することにより、膵臓 β 細胞からのインスリン分泌を高める。一方、SUR-Kir 複合体は中枢におい

でも広く発現が確認されており、SUR1-Kir6.1、SUR1-Kir6.2、SUR2-Kir6.2などの様々な複合体が海馬の錐体細胞や介在ニューロンにおいて発現している⁴⁾。中枢においては、Kir6.2チャネルの発現が優位であり、グルコース代謝調節や神経細胞の興奮性調節に関与している⁵⁾。一方、Kir6.1チャネルは主にグリア細胞（アストロサイトやミクログリア）に発現しており、海馬における神経新生に関与することが報告されている⁶⁾。著者らは、マウス海馬における K_{ATP} チャネルの局在についてKir6.1抗体およびKir6.2抗体を用いて免疫組織化学法により詳細に検討した結果、Kir6.2チャネルはPSD95と共局在することから、シナプス伝達の役割を担うスパインへの局在が明らかとなった。一方、Kir6.1チャネルは神経細胞体およびグリア細胞に多く発現することを確認した⁷⁾。

メマンチンによる K_{ATP} チャネルの抑制

メマンチンは2011年に承認されたADの新薬であり、NMDA受容体を阻害することによりADにおける過剰なグルタミン酸放出によるシナプスの“ノイズ”を除去し、神経細胞を安定化することを目的とした治療薬である。著者らは K_{ATP} チャネル（Kir6.1/Kir6.2チャネル）の過剰発現Neuro2A (N2A)細胞を用いて、メマンチンが K_{ATP} チャネルの特異的な阻害薬であるトルブタミドと同様に K_{ATP} チャネルを抑制し、細胞内カルシウム濃度を上昇させることを電気生理学的解析（Whole-cell patch-clamp法）およびカルシウムイメージング解析により同定した（図1）。この結果は、メマンチンによる K_{ATP} チャネルの抑制が、細胞膜の閾値上昇を介して細胞内へカルシウムを動員することを示唆している。

次に、著者らは、メマンチンによる細胞内カルシウム動員のメカニズムについて検討するため、海馬のスパインに局在する記憶分子であるカルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKII）の自己リン酸化反応についてメマンチンの濃度依存的な効果をKir6.2チャネルの過剰発現N2A細胞を用いて検討した。その結果、メ

マンチンによるCaMKIIの自己リン酸化反応の亢進は、100pMより惹起され、1μMにおいて最大効果を示した（図2）。本結果により、メマンチンによるKir6.2チャネルの抑制により、細胞内において記憶分子であるCaMKIIの活性亢進が引き起こされていることを明らかにした。

ADモデルマウスにおけるメマンチンの効果

著者らは、ADモデルマウスであるAPP23マウスをNovartis Pharmaより供与を受けた。APP23マウスはKM670/671NLによりAβ産生の上昇を示すヒトAPP過剰発現マウスである^{8)~10)}。12ヶ月齢のAPP23マウスにメマンチンを1mg/kg p.o.の条件で28日間慢性投与を行い記憶学習関連行動試験（Y-maze試験、新規物体認識試験、恐怖条件付記憶学習試験）により解析した。APP23マウスにおいて認められる認知機能障害に対して、メマンチンの慢性投与は有意な改善効果を示した。さらに、記憶学習の指標として確立している海馬におけるシナプスの可塑的变化について長期増強現象（long-term potentiation：LTP）を指標として電気生理学的手法により検討した結果、APP23マウスにおいて低下しているLTPはメマンチンの慢性投与により有意な改善効果を示した。興味深いことに、メマンチンによるLTPの改善効果は K_{ATP} チャネル開口薬であるピナシジル処置により消失した（図3）。本結果により、 K_{ATP} チャネルの抑制機能不全によりメマンチンのLTP改善効果が消失したことから、メマンチンによるLTPの改善効果は K_{ATP} チャネルを介した細胞内へのカルシウム動員により惹起したCaMKキナーゼIIの賦活化が重要であることを示唆している。

Kir6.2チャネル欠損マウスにおけるメマンチンの認知機能改善効果の消失

次に、著者らは K_{ATP} チャネル欠損マウス（Kir6.1/Kir6.2チャネル欠損マウス）を用いてメマンチンによる認知機能改善効果について検討した。

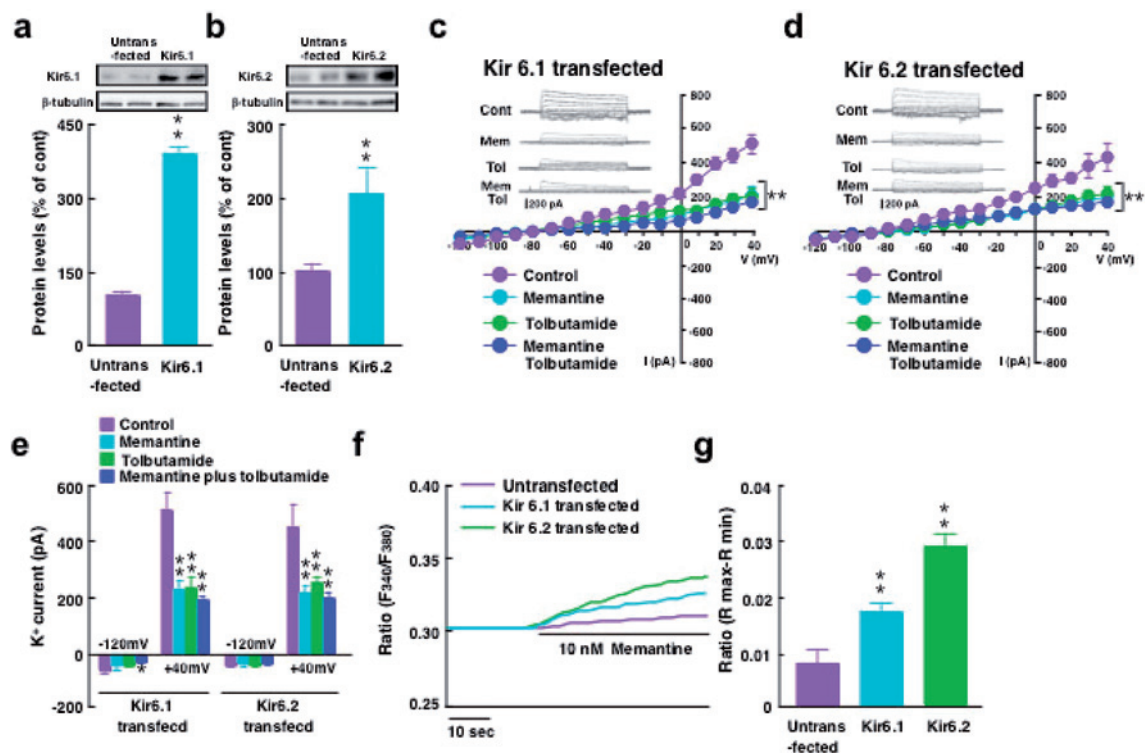


図1 Memantineによる細胞内カルシウム濃度の上昇とK⁺ATPチャネル過剰発現細胞におけるK⁺電流の抑制。(a-b) K⁺ATPチャネル過剰発現Neuro2A細胞におけるK⁺ATPチャネルの発現量。(c-e) MemantineおよびtolbutamideはK⁺ATPチャネル過剰発現Neuro2A細胞において外向きK⁺電流を有意に抑制する。(f-g) MemantineはK⁺ATPチャネル過剰発現Neuro2A細胞において細胞内カルシウム濃度を有意に上昇する。(Moriguchi et al., Molecular Psychiatry (2016) より引用)

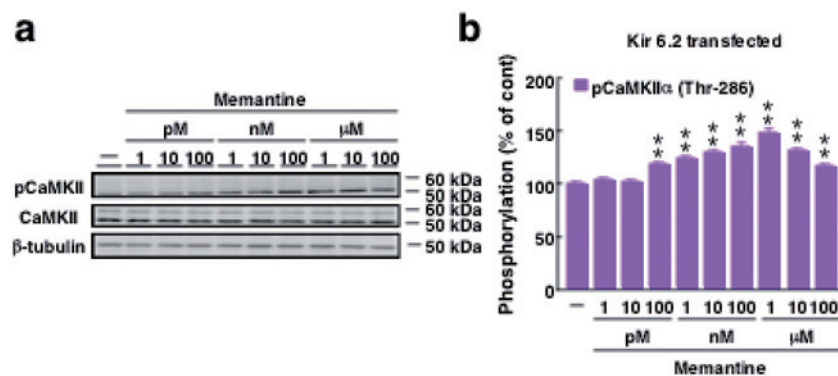


図2 MemantineによるCaMキナーゼIIの活性調節。(a-b) K⁺ATPチャネル過剰発現細胞においてMemantineはCaMキナーゼIIの自己リン酸化反応を有意に亢進する。(Moriguchi et al., Molecular Psychiatry (2016) より引用)

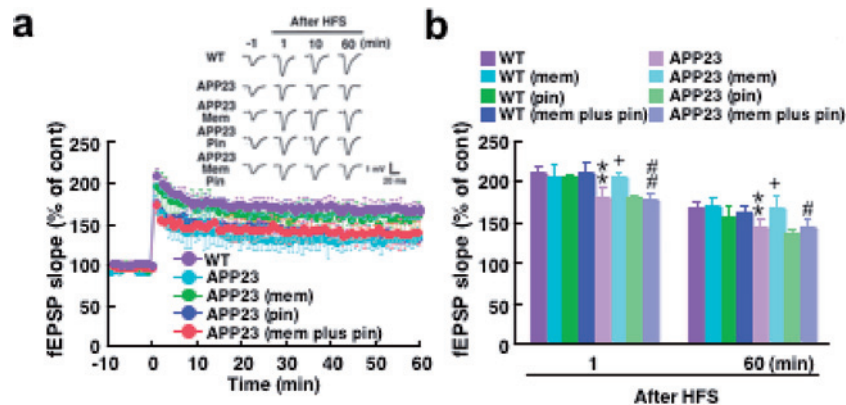


図3 Memantineによる海馬長期増強現象 (LTP) の改善効果。(a-b) APP23 マウス (12 ヶ月齢) において海馬 CA1 領域における LTP の減弱が確認され、memantine の慢性投与 (28 日間) は減弱している LTP を有意に改善する。この改善効果は、 K_{ATP} チャンネル開口薬である pinacidil 処置により消失する。(Moriguchi et al., Molecular Psychiatry (2016) より引用)

K_{ATP} チャンネル欠損マウスは清野進教授 (神戸大学医学部) より供与を受けた¹¹⁾¹²⁾。電気生理学的解析により K_{ATP} チャンネル欠損マウスの海馬 CA1 領域の LTP について測定した結果、Kir6.2 チャンネル欠損マウスにおいて野生型と比較して有意な LTP の減弱が確認された。一方、Kir6.1 チャンネル欠損マウスでは野生型と比較して LTP に有意な変化は認められなかった。この結果は、少なくとも Kir6.2 チャンネルは海馬 CA1 領域において記憶学習に必須の分子であることが明らかとなった。さらに、Kir6.2 チャンネル欠損マウスにおける LTP の減弱は、メマンチンの慢性投与 (28 日間) により有意な改善効果は確認できなかった (図 4)。前述の通り、著者らは海馬 CA1 領域において Kir6.2 チャンネルと PSD95 の共局在を同定し Kir6.2 チャンネルのスパインへの局在を明らかにしている⁷⁾。このことから、Kir6.2 チャンネルは海馬のスパインにおいてメマンチンによる認知機能調節に必須の分子であり、メマンチンによる Kir6.2 チャンネルの抑制は細胞内における CaMKII の賦活化に重要な役割を担うことが示唆される。しかしながら、Kir6.2 チャンネル欠損マウスでは Kir6.2 チャンネルの欠損により認知機能障害が惹起されている。この現象は、著者らによるメマンチンによる K_{ATP} チャンネルの抑制による認知機能改善効果と一致しない。何

らかの代償機構が働き、本現象を惹起していると推察されるが、少なくとも Kir6.2 チャンネルは海馬において記憶学習に必須であることが証明され、メマンチンの標的部位であることは明確にできたと考えられる。

CaMKII 欠損マウスにおけるメマンチンの認知機能改善効果の消失

さらに、著者らはメマンチンによる APP23 マウスにおける認知機能障害の改善効果が K_{ATP} チャンネルを介した CaMKII の賦活化に重要であることを再確認するため、CaMKII 欠損マウスを用いてメマンチンの認知機能改善効果について検討した。CaMKII 欠損マウスは宮川剛教授 (藤田保健衛生大学医学部) より供与を受けた。CaMKII 欠損マウスは顕著な認知機能障害が報告されており¹³⁾、本研究ではメマンチンの慢性投与 (28 日間) において CaMKII 欠損マウスにおける認知機能障害の改善効果は認められなかった (図 5)。本結果により、改めて CaMKII の賦活化がメマンチンによる認知機能改善効果に必須であることが示唆された。

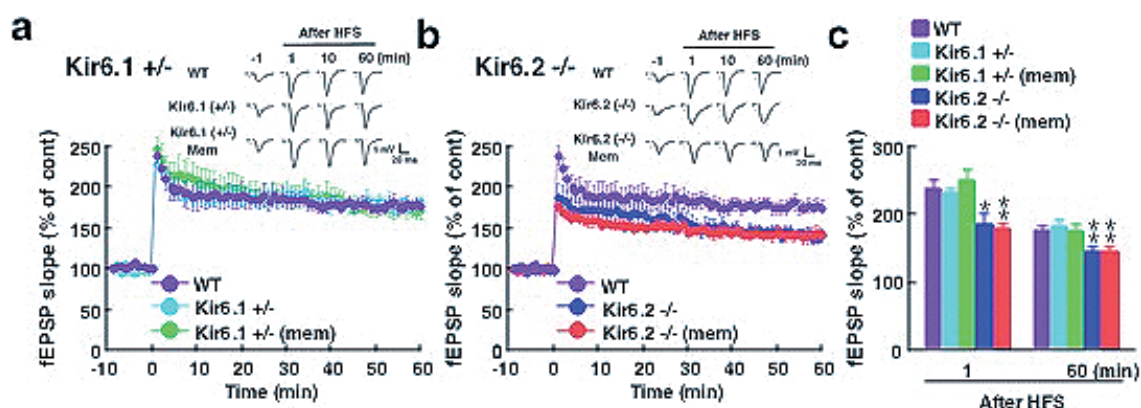


図4 K_{ATP} チャンネル欠損マウスを用いた Memantine による LTP 改善効果の消失。Kir6.2 欠損マウス (2 ヶ月齢) において海馬 CA1 領域における LTP の減弱が確認され、memantine の慢性投与は減弱している LTP を改善しない。一方、Kir6.1 欠損マウス (2 ヶ月齢) では LTP の減弱は認められない。(Moriguchi et al, Molecular Psychiatry (2016) より引用)

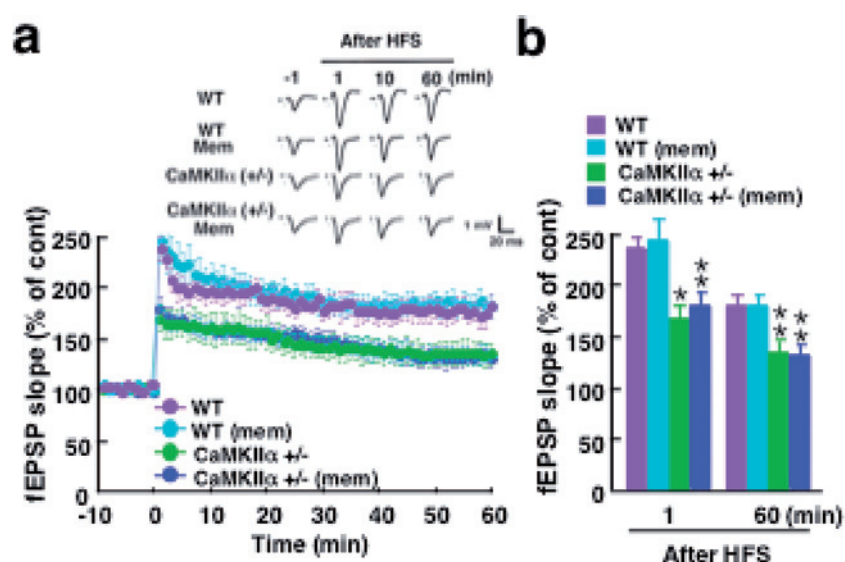


図5 CaMKII 欠損マウスを用いた Memantine による LTP 改善効果の消失。(a-b) CaM キナーゼ II 欠損マウス (2 ヶ月齢) において海馬 CA1 領域における LTP の減弱が確認され、memantine の慢性投与は減弱している LTP を改善しない。(Moriguchi et al, Molecular Psychiatry (2016) より引用)

Kir6.1 チャンネル欠損マウスのうつ様症状に対するメマンチンの効果

最後に、著者らは AD 周辺症状の一つであるうつ症状を指標としてメマンチンによる Kir6.1 チャンネルの抑制による影響について検討した。こ

れまでの研究報告により、メマンチンは様々なうつ様症状を示す動物モデルにおいてうつ様症状を改善することが報告されている^{14)~17)}。一方、Kir6.1 チャンネルは海馬における神経新生に関与することが報告されていることから⁶⁾、著者らは、Kir6.1 チャンネル欠損マウスのうつ様症状について検討し

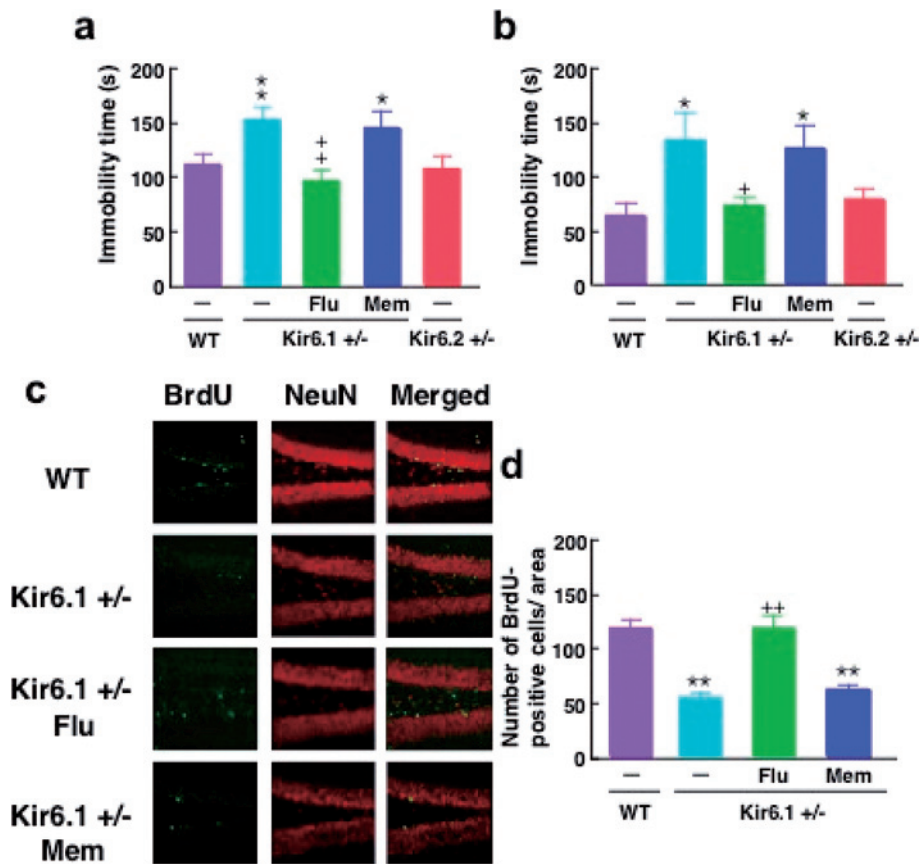


図6 メマンチンによる Kir6.1 チャンネルの抑制を介した海馬神経新生の促進効果とうつ様症状の検討。(a-b) マウスの無動時間を指標とした tail-suspension 試験 (a) および forced-swim 試験 (b) によるうつ様症状の検討。Kir6.1 チャンネル欠損マウスのうつ様症状の亢進に対してメマンチンは効果を示さない。(c-d) 海馬歯状回 (DG) における BrdU 陽性細胞数を指標とした神経新生の効果。Kir6.1 チャンネル欠損マウスの DG ではメマンチンによる神経新生促進効果は消失する。(Moriguchi et al., Molecular Psychiatry (2016) より引用)

た結果、Kir6.1 チャンネル欠損マウスはうつ様症状の惹起していることを tail-suspension 試験および forced-swim 試験による無動時間の測定より明らかにした (図 6)。興味深いことに、メマンチンの慢性投与 (1mg/kg, p.o.) (14 日間) では有意な改善効果は確認できなかった。さらに、海馬歯状回 (DG) における神経新生の影響を検討するために、bromodeoxyuridine (BrdU) (50mg/kg, i.p.) のマウスへの慢性投与 (5 日間) による BrdU 陽性細胞数を測定した結果、Kir6.1 チャンネル欠損マウスにおいて減少している BrdU 陽性細胞数は、メマンチンの慢性投与により有意な改善効果を示さなかつ

た (図 6)。本結果は、メマンチンによるうつ様症状の改善効果は Kir6.1 チャンネルの抑制を介している可能性を示唆している。

おわりに

著者らの研究は、AD 治療薬であるメマンチンの認知機能改善効果 (AD 中核症状) およびうつ様症状改善効果 (AD 周辺症状) に関する新しい脳内機序として K_{ATP} チャンネル抑制効果を提唱した (図 7)。この発見は、メマンチンが脳インスリンシグナルを賦活化することにより認知・精神機能を改

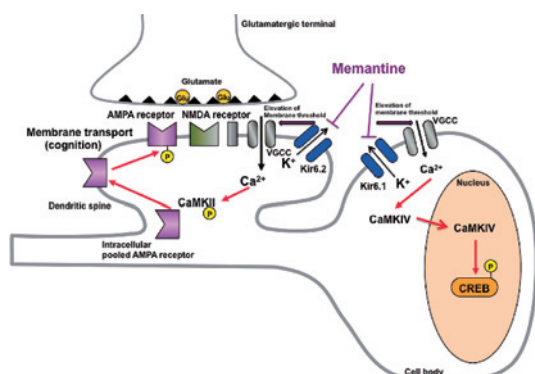


図7 海馬におけるメマンチンによる K_{ATP} チャネル (Kir6.1およびKir6.2)の抑制効果に関する概念図。スパインに局在するKir6.2チャネルに対するメマンチンの抑制効果により、細胞内カルシウム濃度の上昇を介したCaMKIIの賦活化が引き起こされ、AMPA受容体の膜輸送が促進され、認知機能が改善する。(Moriguchi et al., Molecular Psychiatry (2016)より引用)

善することから、ADの脳糖尿病仮説について実証した結果である。今後、更なるAD脳糖尿病仮説の実証ならびに K_{ATP} チャネルを標的とした認知・精神機能改善薬の創薬が期待される。

謝 辞

本報告で紹介した研究成果は、東北大学大学院薬学研究科薬理学分野において実施されました。多大なるご指導を賜りました同分野の福永浩司教授に厚く御礼を申し上げます。また、 K_{ATP} チャネル欠損マウスをご供与くださいました清野進教授(神戸大学医学部)、CaMKII欠損マウスをご供与くださいました宮川剛教授(藤田保健衛生大学医学部)、APP23マウスをご供与くださいましたNovartis Pharmaに厚く感謝申し上げます。さらに、このような執筆の機会を頂きました澤本和延教授ならびに神経化学会の編集部の皆様に厚く感謝を申し上げます。

文 献

- 1) Hokama M, Oka S, Leon J, Ninomiya T, Honda H, Sasaki K, Iwaki T, Ohara T, Sasaki T, LaFerla

FM, Kiyohara Y, Nakabeppu Y. Altered expression of diabetes-related genes in Alzheimer's disease brains: the Hisayama study. Cerebral Cortex, 24, 2476-2488 (2014).

- 2) Terzic A, Jahangir A, Kurachi Y. Cardiac ATP-sensitive K^+ channels: regulation by intracellular nucleotides and K^+ channel-opening drugs. Am J Physiol, 269, C525-C545 (1995).
- 3) Babenko AP, Aguilar-Bryan L, Bryan J. A view of sur / KIR 6. X, KATP channels. Annu Rev Physiol, 60, 667-687 (1998).
- 4) Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A, Neumcke B. Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. J Physiol, 514, 327-341 (1999).
- 5) Thomzig A, Laube G, Pruss H, Veh RW. Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution. J Comp Neurol, 484, 313-330 (2005).
- 6) Sun XL, Hu G. ATP-sensitive potassium channels: A promising target for protecting neurovascular unit function in stroke. Clin Exp Pharmacol Physiol, 37, 243-252 (2010).
- 7) Moriguchi S, Ishizuka T, Yabuki Y, Shioda N, Sasaki Y, Tagashira H, Yawo H, Yeh JZ, Sakagami H, Narahashi T, Fukunaga K. Blockade of the K_{ATP} channel Kir6.2 by memantine represents a novel mechanism relevant to Alzheimer's disease therapy. Mol Psychiatry, in press (2016).
- 8) Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer's disease-like pathology. Proc Natl Acad Sci USA, 94, 13287-13292 (1997).
- 9) Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M. Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. Ann NY

- Acad Sci, 920, 134-139 (2000).
- 10) Rossor MN, Newman S, Frackowiak RS, Lantos P, Kennedy AM. Alzheimer's disease families with amyloid precursor protein mutations. *Ann NY Acad Sci*, 695, 198-202 (1993).
 - 11) Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 10402-10406 (1998).
 - 12) Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S. Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med*, 8, 466-472 (2002).
 - 13) Silva AJ, Paylor R, Wehner JM, Tonegawa S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257, 206-211 (1992).
 - 14) Reus GZ, Stringari RB, Kirsch TR, Fries GR, Kapczinski F, Roesler R, Quevedo J. Neurochemical and behavioral effects of acute and chronic memantine administration in rats: Further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? *Brain Res Bull*, 81, 585-589 (2010).
 - 15) Rogoz Z, Skuza G, Maj J, Danysz W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Neuropharmacology*, 42, 1024-1030 (2002).
 - 16) Quan MN, Zhang N, Wang YY, Zhang T, Yang Z. Possible antidepressant effects and mechanisms of memantine in behaviors and synaptic plasticity of a depression rat model. *Neuroscience*, 182, 88-97 (2011).
 - 17) Tokita K, Fujita Y, Yamaji T, Hashimoto K. Depressive-like behavior in adrenocorticotrophic hormone-treated rats blocked by memantine. *Pharmacol Biochem Behav*, 102, 329-334 (2012).