

軽度認知障害およびアルツハイマー病の認知機能を評価する認知機能試験の研究

申請代表者	松井 三枝	金沢大学・国際基幹教育院	教授
所外共同研究者	稲田 祐奈	金沢大学・国際基幹教育院（～2020, 10）	研究員
研究統括者	東田 千尋	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	教授
所内共同研究者	楊 熙蒙	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域	助教
所内共同研究者	稲田 祐奈	研究開発部門病態制御分野神経機能学領域（2020, 11～）	助教

■背景・目的

【現状】現在開発中の、アルツハイマー病(AD)の原因物質である Aβ や tau を標的にした治験薬では、認知機能改善効果が明確には認められずいまだ承認に至ったものはない。病因物質をターゲットにした治療薬開発だけでは AD の克服は難しい。研究統括者・東田は、これまでの研究において、AD の機能を回復する本質的な戦略として神経回路網の破綻を修復により記憶障害を回復させることを目標年、軸索の修復・再伸展活性を有する非常に有望な化合物として Diosgenin を同定し、動物モデルにおける記憶改善効果も確認してきた。

【課題】しかしヒトでの証拠、すなわち Diosgenin が軸索伸展によって AD 患者の認知機能障害を改善させるかについては未検討であった。

【目的】そこで本研究は、軸索を修復する神経回路再構築型の薬物(Diosgenin)が、アルツハイマー病の記憶障害を回復させられることをヒトで実証し、新しい AD 根本的治療薬の開発につなげる。以上の取り組みによって、脳機能回復に本質的に必要な、変性軸索の修復と回路再構築の分子メカニズムを解明し、新しいコンセプトの根本的 AD 治療薬を提示する。また、東田・楊は、記憶障害を発症した AD モデルの 5XFAD マウスにおける Diosgenin 投与の効果の継続期間、また Diosgenin の効果的な脳移行性についてなどを動物実験で検討する。

	松井・稲田	東田・楊	
2019年度	認知機能試験に影響を与える要因を検討する	MCIおよびAD患者での臨床研究の準備	ADモデルマウスにおける Diosgeninの記憶改善作用の継続性を検討する
2020年度	認知機能を測定する	MCIおよびAD患者での臨床研究の実施	ADモデルマウスにおける Diosgeninの脳移行性について検討する

■結果・考察

（1）臨床研究

高濃度 Diosgenin 含有ヤマモエキスを試験薬とした、特定臨床研究「軽度認知障害および軽度アルツハイマー型認知症における山芋エキスの有効性を検討するランダム化二重盲検群間比較試験」の申請を行い、富山大学倫理委員会の承認を受けた（2020年7月3日）。jRCTに登録の上、被験者リクルートを開始し、2021年3月31日現在、症例登録者数は4人、この後の初回スクリーニング予定者は約30人となっている（目標登録者数40人）。また試験開始に先立ち、認知機能検査をRBANSからADAS-cogに変更した。ADAS-cogは、軽度認知障害およびアルツハイマー病の認知機能の検出に国際的に最も広く使用されている評価法であり、患者が被験者である研究での実績が高い。これに前頭葉機能をより詳細に評価するために Verbal Fluency Test を追加することで、評価法全体の精度を高め、認知障害における試験薬の効果をより精度よく検出できる。稲田は、ADAS-cog 実施者の資格を取得した。

主要評価項目：

1) Mini Mental State Examination (MMSE)の質問項目の得点の合計を算出し、投与前後の得点の変化量を算出して群間比較する。

2) Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog)を用い、記憶、言語、行為の3領域12項目（単語再生、単語遅延再生、口頭言語能力、言語の聴覚的理解、自発話における喚語困難、口頭命令に従う、手指及び物品呼称、構成行為、観念運動、見当識、単語再認、テスト教示の再生能力）の機能評価を行なう。これに加えて、前頭葉機能をより詳細に評価するため、Verbal Fluency Test (VFT) による「言語流暢性」の評価を行う。それぞれについて、投与前後の得点の変化量を算出し、群間比較する。

副次評価項目：

1) 血漿 NF-L の定量を行う。NF-Lは軸索を構成する中間系線維の一つであり、軸索変性に伴って血中に増えかつ安定的に検出され、しかもアルツハイマー病発症前から徐々に血漿中に増加し始めることが知られているバイオマーカーである。被験者脳内の神経軸索が器質的に修復されるかどうかを判断するものである。

安全性の評価項目：

1) 一般血液検査を行う（検査項目：総タンパク、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、直接ビリルビン、間接ビリルビン、グルコース、総コレステロール、中性脂肪、尿素窒素、クレアチン、尿酸、ナトリウム、カリウム、クロール、アミラーゼ、CK、ロイシンアミノペプチダーゼ、 γ -GTP、コリンエステラーゼ、AST、ALT、LDH、アルカリフォスファターゼ、白血球数、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット、MCV、MCH、MCHC、血小板数、アルブミン、タンパク分画（ALB、A1-G、A2-G、B-G、G-G、A/G）。採血量は14ml（5ml、2ml、7mlの3本）とする。

2) その他有害事象

試験薬の概要

研究薬名（一般名）：ヤマモ抽出物含有加工食品

剤形：ソフトカプセル

成分・含量：1日摂取目安量（6粒）あたり、機能性関与成分：ジオスゲニン 16.7mg、添加物：オリーブ油、ゼラチン、グリセリン、ミツロウ、グリセリン脂肪酸エステル、カラメル色素、ビタミンE

貯法 直射日光：高温多湿を避けて、冷暗所にて保存してください。

用法・用量：1回3カプセルを朝食後と夕食後の1日に2回、計1日6カプセルを水または白湯で飲む。

種目（特定研究）

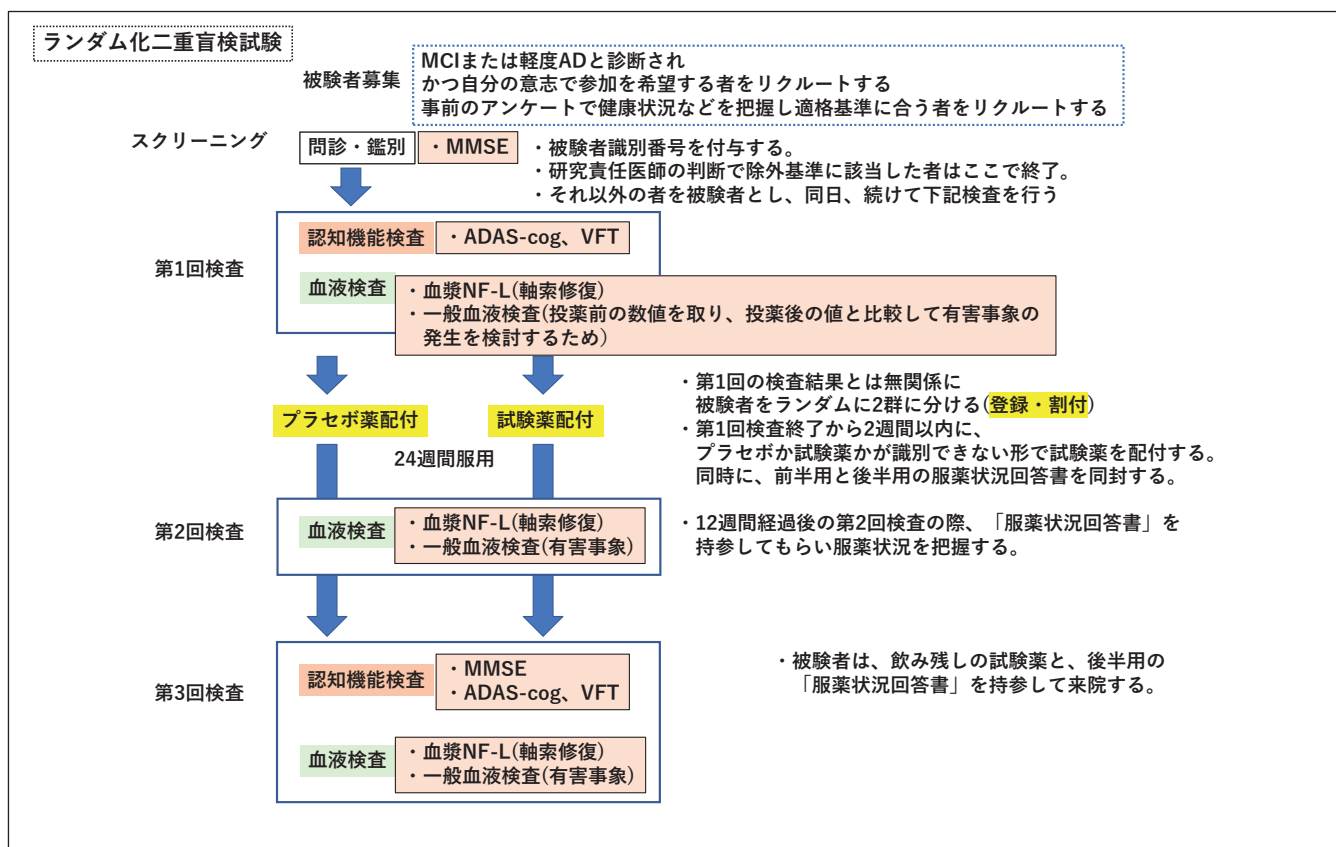


図1 本特定臨床研究のフロー

また、本共同研究チームが2019年度に実施した別の臨床研究「認知機能およびストレス抵抗性に対する骨碎補エキスとエゾウコギ葉エキス合剤の効果の研究」における検討の中で、松井・稲田は、認知機能の解析を行い、この共同臨床研究は論文として公開された¹⁾。

(2) マウスでの研究

Diosgeninによる記憶障害改善作用の持続性

生後5か月齢のアルツハイマー病モデルマウス5XFADにDiosgeninを0.1 μmol/kgの用量で2週間、経口投与した。投与終了後、1日後、8日後、15日後、29日後、57日後の各時点で、インターバル時間1時間の条件で物体認知記憶試験を行った。野生型マウスに比べて、5XFADマウスの溶媒投与群では、いずれの時点でも物体認知記憶が損なわれていた。これに対し、Diosgenin投与による記憶障害の有意な改善が投与終了後1日後から29日後まで認められた(図2)。この結果は、Diosgeninによる記憶障害改善作用が断薬後少なくとも29日間は継続していることを示している。5XFADマウスでは、月齢とともに記憶障害の悪化が進行するが、Diosgeninの断薬後も持続する記憶改善作用は、Diosgeninによって脳内の器質的回復が起きていることを示唆するものである。

種目 (特定研究)

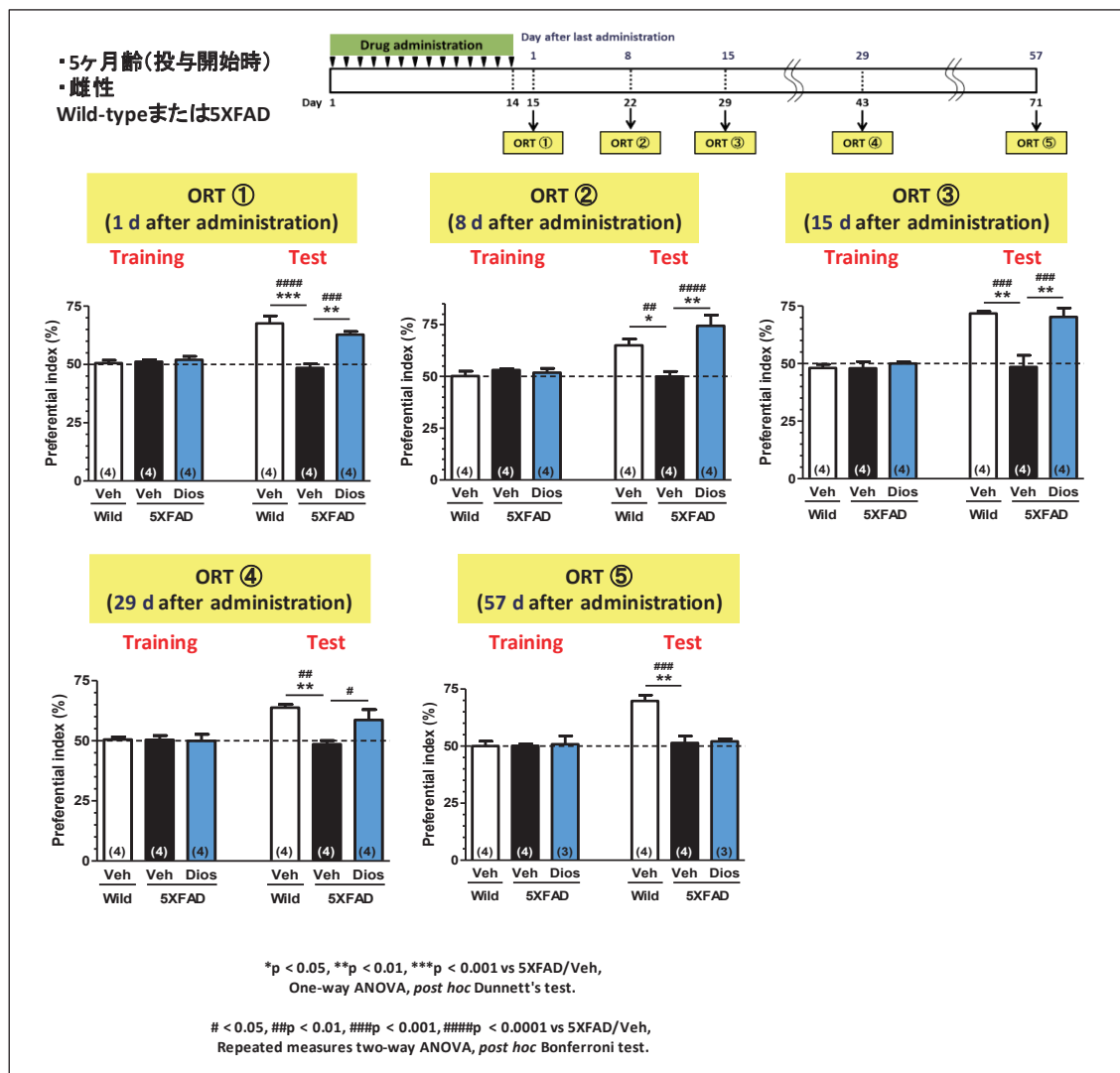


図2 Diosgenin 経口投与後の断薬期間と記憶改善作用の継続性

記憶障害を改善しうる山薬エキスの検討²⁾

日本薬局方で規定されている山薬 (*Dioscorea batatas* の根茎) を用いて、熱水抽出エキスを作製した。この山薬水エキス中の Diosgenin 含量を LC-MS 法で検討したところ、検出できるほどの Diosgenin は含まれていなかった。また以前の我々の研究では、山薬成分と言われている Diosgenin を正常マウスに経口投与すると、記憶能力が向上することが示されている。そこで、山薬水エキスの記憶能力向上効果を調べた。正常マウスに、水 (対照群)、山薬水エキス(100 mg/kg/day)、あるいは同じ山薬水エキス(100 mg/kg/day)に Diosgenin(16 mg/kg/day)を足して投与する群を比較した。7日間の経口投与後、物体認知記憶試験を行うと、山薬エキス+Diosgenin の群では、溶媒のみ投与の対照群と比べて認知機能が向上した。一方、山薬エキスのみ投与群では全く効果が見られなかった (図 3)。この時のマウス脳内への Diosgenin 移行を検出したところ、山薬エキス+Diosgenin 投与マウスの脳内には Diosgenin が検出されたが、山薬エキスのみ投与マウスでは、血中にも脳内にも Diosgenin は全く検出されなかった。また加工処理により Diosgenin を高濃度 (16%) 含有する山薬エキスをオリーブ油を溶媒としてマウスに経口投与すると、Diosgenin が脳移行し、物体認知機能が向上することも示された。一連の結果は、Diosgenin の効果を山薬エキスなど植物エキスに期

種目 (特定研究)

待するには、もともと Diosgenin 含量の高い植物を選ぶか、Diosgenin 含量を高めるエキス作製を行う必要があることを示す。加えて、山薬中の Diosgenin 以外の成分には、認知機能向上の効果がないことも示唆された。

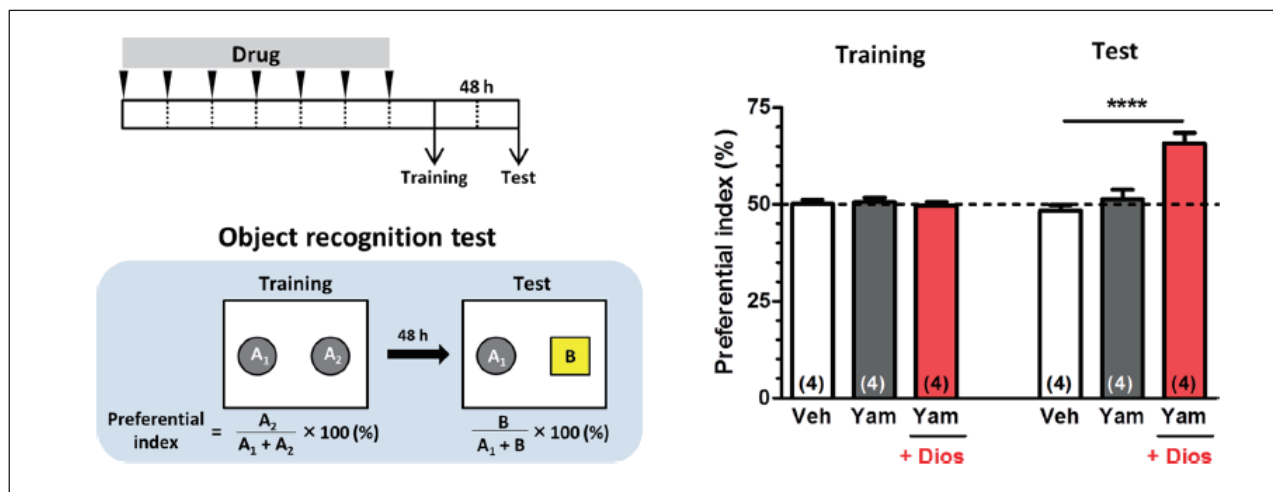


図 3 Diosgenin が検出されない山薬エキスの投与では正常マウスの記憶力向上作用が見られない (論文 2 より引用)

Diosgenin を脳移行させる溶媒の検討³⁾

Diosgenin の生物学的利用率は低いことがよく知られているが、我々の以前の研究では、Diosgenin をオリーブ油に溶解させて経口投与すると、脳に良く移行し記憶促進作用も認められた。そこで、油脂の違いによる脳移行性の差異を調べるため、オリーブ油、魚油、中鎖脂肪酸トリグリセリドのそれぞれに Diosgenin を溶解させたときの、経口投与後の血漿移行量と脳移行量を調べた。Diosgenin の血漿移行量(図 4)と脳移行量 (図 5) は、オリーブ油に溶解した場合が極めて高く、魚油はそれに比べると少なかった。中鎖脂肪酸トリグリセリドではさらに、Diosgenin の移行量が低かった。この結果は、溶媒として用いる油脂の違いにより、経口投与後に血中および脳へ移行する Diosgenin の量が異なることを示す。

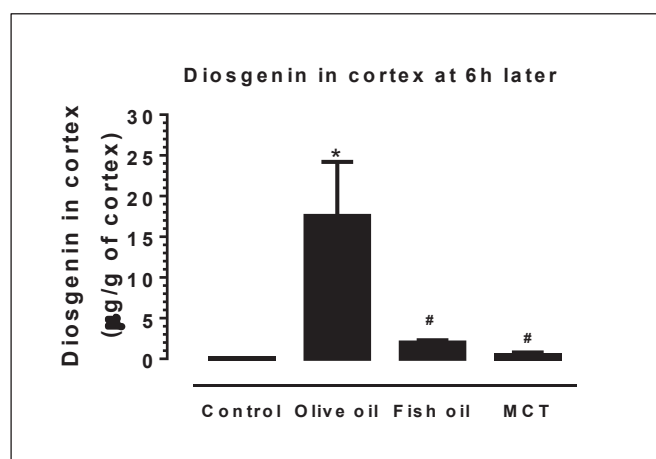
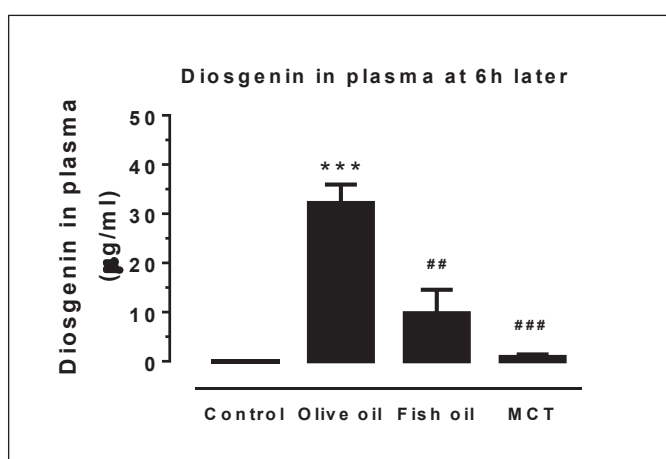


図 4 Diosgenin 経口投与 6 時間後の血漿中濃度 (いずれも論文 3 より引用)

図 5 Diosgenin 経口投与 6 時間後の大脳皮質濃度

■結論

特定臨床研究の実施を進め症例登録数を増やした。全試験が終了するまで、認知機能や血漿 NF-L 濃度の評価結果は得られないため、現状では結果を考察できないものの、今後 1 年程度のうちに試験が終了する見込みである。

5XFAD マウスの検討では、Diosgenin による記憶障害改善作用が器質的修復によって表れている可能性が示された。また、Diosgenin を経口投与で脳に移行させる効果的な溶媒として、脂質の中でも特にオリーブ油が優れていることが示された。また、常法で抽出した山薬エキスには Diosgenin が含有されていないが、Diosgenin が高濃度含有されている山薬エキスをオリーブ油を溶媒として経口投与すれば、Diosgenin の脳移行が確認され記憶能力向上も認められた。実施中の臨床研究では、高濃度 Diosgenin 含有ヤマモエキスをオリーブ油に溶かしてカプセル化しており、この製剤の妥当性を動物実験で証明したことになる。

- 1) Tohda C, Matsui M, Inada Y, Yang X, Kuboyama T, Kimbara Y, Watari H. Combined treatment with two water extracts of *Eleutherococcus senticosus* leaf and rhizome of *Drynaria fortunei* enhances cognitive function: a placebo-controlled, randomized, double-blind study in healthy adults. *Nutrients* (2020) 12, 303.
- 2) Yang X, Nomoto K, Tohda C. Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of Yam extracts. *Journal of Natural Medicines* (2021) 75(1):207-216.
- 3) Tohda C, Yang X, Nomoto K. Transported amount of diosgenin to the brain is differed by a solvent fat. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety* (2020) 27(2), 102-105.