

博士論文

Diosgenin による軸索再伸長を基盤とした
アルツハイマー病の記憶障害回復メカニズムに関する研究
Study on the mechanisms of memory recovery in Alzheimer's disease
based on diosgenin-mediated axonal regeneration

2023 年 3 月

富山大学 学術研究部薬学・和漢系
和漢医薬学総合研究所 病態制御分野 神経機能学領域

楊 熙蒙

目次

序論	2
第1章：Diosgeninの軸索再伸長及び記憶改善に関わる分子の探索	
1.1. 緒言	4
1.2. 実験材料ならびに実験方法	5
1.3. 実験結果	14
1.4. 考察	29
1.5. 小括	32
第2章：DiosgeninのAD脳内における方向特異的な軸索再伸長作用とその分子機序の解明	
2.1. 緒言	33
2.2. 実験材料ならびに実験方法	35
2.3. 実験結果	45
2.4. 考察	98
2.5. 小括	102
第3章：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	
3.1. 緒言	103
3.2. 実験材料ならびに実験方法	104
3.3. 実験結果	108
3.4. 考察	123
3.5. 小括	125
総括および展望	126
参考文献	128
謝辞	141

序論

近年の高齢化社会に伴い、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 (World Alzheimer report 2022)。認知症の過半数を占めるアルツハイマー病 (AD) は、記憶障害や見当識障害、学習障害等の中核症状、及び徘徊や幻覚等の周辺症状を主症状とする神経変性疾患である。AD 発症の主な原因として、無症状期から脳内でアミロイド β ($A\beta$) が蓄積することが考えられている。アミロイド前駆タンパク (amyloid precursor protein; APP) から β -及び γ -セクレターゼによって $A\beta$ が切り出され、それらが凝集した $A\beta$ オリゴマー及び老人斑が神経細胞外に蓄積すると同時に、微小管を構成しているタウタンパク質が過剰にリン酸化され、らせん状線維 (paired helical filament; PHF) として蓄積し、神経原線維変化も引き起こる。これらの結果、進行性に神経突起の変性やシナプスの脱落、及び神経細胞死が誘発され、神経機能の維持に関わる脳神経回路が破綻する (Dickson & Vickers, 2001)。

現在日本では、コリンエステラーゼ阻害薬 (ドネペジル、ガラントミン、リバスチグミン) や NMDA 受容体拮抗薬 (メマンチン) が AD に対する承認薬として用いられている。コリンエステラーゼ阻害薬は、AD 患者の脳で低下しているアセチルコリン活性を高めることを目的としているが、神経伝達物質の機能異常を抑えるのみでは、一度変性してしまった神経回路の機能を賦活化することはできず、記憶障害の進行を遅延させるのみの対症療法に留まっている。また、NMDA 受容体拮抗薬メマンチンは、過剰な興奮性伝達物質 (グルタミン酸) の放出によるシナプスノイズを弱めることで記憶に関わる正常の神経伝達を高めるが、AD 患者に対して記憶障害改善作用を有さないことが多数報告されている (Modrego et al., 2010)。我々のこれまでの基礎研究においても、メマンチンは AD モデル (5XFAD) マウスの記憶障害を改善させず、海馬における変性軸索の割合をむしろ悪化させることを明らかにしている (Tohda et al., 2012)。この現状を踏まえ、フランスでは“医療費は増加するにもかかわらず、それに見合う治療効果が見込めない”として、2018年8月よりこれら4種類のAD治療薬を保険適用の対象外としている。

一方で、近年は原因物質の $A\beta$ 除去に着目した抗 $A\beta$ 抗体として、アデュカヌマブやレカヌマブが大規模の臨床研究を経て、米国で AD 治療薬として承認されてきた (Sevigny et al., 2016; van Dyck et al., 2023)。軽度認知障害 (MCI) または軽度 AD の比較的早期のステージから抗 $A\beta$ 抗体の投与を開始することで、脳内の $A\beta$ 量を大きく減らす効果があることが示されている。しかし、プラセボ群と比べて抗 $A\beta$ 抗体投与群では、認知機能障害の進行を遅らせることには成功したものの、抗 $A\beta$ 抗体の投与前後で比較すると、認知機能はなお悪化し続けることが示されており、AD の進行を完全に止める、または認知機能を改善する効果がないのが現状である。また、アデュカヌマブ投与では全体の約 38%、レカヌマブ投与では全体の約 14%の被験者において、脳出血や脳浮腫、頭痛、めまい、錯乱をはじめとした重篤な副作用が見られており、安全性の懸念も議論されている。

そこで我々は、AD 発症後からでも認知機能を改善しうる根本的治療戦略として、原因物質の蓄積

を減らすことに加えて、“破綻した脳神経回路を再形成することにより神経機能を正常化すること”こそが、最も重要であるとのコンセプトに基づいて研究を行ってきた。脳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向かって伸長し、シナプス結合する必要がある。特に軸索は、遠く離れた部位に向かって長く伸長しなければならない。しかし成熟した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。これに代わる神経回路再形成の戦略として、樹状突起上のスパイン（後シナプス）を増やす研究が盛んに行われてきたが、ADの進行に伴って軸索（前シナプス）変性も進行するため、スパインの増加のみから記憶回復を望めるのは、AD発病後初期に限られることが動物実験により明らかになった (Roy et al., 2016)。一方で、成体脳において軸索が少なくとも近位には自発的に再伸長することが報告されているが (Jin et al., 2016)、軸索が遠く離れたつながらべき投射先に向かって正確に再伸長するかどうか、またその現象に関わる脳内での分子メカニズムは全く不明である。

当研究室ではこれまでに、培養神経細胞において $A\beta$ によって萎縮した軸索を再伸長させ、また家族性 AD モデル (5XFAD) マウスの記憶障害を改善する薬物を和漢薬より探索してきた。その中で、特に優れた活性を示したのものとして、山薬 (*Dioscorea japonica* 又は *Dioscorea batatas* の周皮を除いた根茎) 中の成分 diosgenin を発見した (Tohda et al., 2013; Tohda et al., 2012)。Diosgenin は他にも 5XFAD マウス脳内の $A\beta$ やリン酸化タウを減らす作用も併せ持っている (Tohda et al., 2012)。さらに、diosgenin による軸索再伸長及び記憶改善に関わる受容体タンパク質として 1,25D₃-MARRS (membrane-associated rapid response steroid-binding receptor) を同定した (Tohda et al., 2012)。しかし、神経細胞における diosgenin の記憶改善に関わる分子メカニズムの詳細、及び AD 脳内での軸索再伸長作用については未解明であった。

そこで本研究では、第 1 章において、diosgenin の軸索再伸長及び記憶改善に関わる神経細胞中での分子を探索した。第 2 章では、5XFAD マウス脳内における diosgenin による長距離かつ方向特異的な軸索再伸長作用を評価し、軸索がつながらべき脳部位に正しく再伸長するために機能する分子群を明らかにした。第 3 章では、diosgenin の基礎研究を社会実装するにあたり、diosgenin 高濃度山薬エキスの正常マウス及び健常人の認知機能に対する効果を評価した。以上の研究により、脳内での軸索の再伸長が AD の記憶回復にとって決定的に重要である根拠を示すとともに、これを可能にする薬物 diosgenin の有効性とその基盤となる分子機序を証明し、AD に対する根本的治療法を提示することを目指す。

第1章：Diosgeninの軸索再伸長及び記憶改善に関わる分子の探索

(Yang X, Tohda C. *Scientific Reports*, 8, 11707, 2018)

(Yang X, Tohda C. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 48, 2018)

1.1. 緒言

当研究室の先行研究により、神経細胞における diosgenin の受容体タンパク質として 1,25D₃-MARRS を同定した (Tohda et al., 2012; Tohda et al., 2013)。また、中和抗体によって神経細胞膜上に発現する 1,25D₃-MARRS をブロックすると、diosgenin による軸索再伸長及び記憶改善作用が消失することを示した (Tohda et al., 2013)。さらに、diosgenin による軸索伸長作用には少なくとも、一般的に軸索伸長を促進することで知られているタンパク質である PI3K (phosphoinositide 3-kinase)、ERK (extracellular signal-regulated kinase)、PKA (protein kinase A)、及び PKC (protein kinase C) の活性化が関わることを見出している (Tohda et al., 2012)。しかし、diosgenin による軸索再伸長を説明できるような分子は不明であった。

そこで本章では、diosgenin 刺激によって神経細胞内で引き起こされる分子シグナルの変化を検討し、その分子の軸索再伸長及び記憶改善への寄与を明らかにすることを目的とした。本分子の同定方法として、wild-type マウスまたは 5XFAD マウスに溶媒または diosgenin を経口投与後、それらマウスの大脳皮質から抽出したタンパク質 lysate において、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスで発現変化し、diosgenin 投与でその発現変化が打ち消されるタンパク質を探索した。脳組織 lysate を用いた網羅的解析であるため、神経細胞中で機能する分子を特異的に絞り込むには検出精度が十分ではないが、同定された分子について神経細胞特異的に機能解析をすることで、軸索再伸長及び記憶改善に対する効果を検討した。

1.2. 実験材料ならびに実験方法

倫理宣言

動物の取り扱いには富山大学動物実験指針に従った。また、本動物実験のプロトコールは、富山大学動物実験委員会及び遺伝子組換え実験委員会の承認を得ている（動物実験承認番号：A2017INM-1、遺伝子組換え実験承認番号：G2013INM-1, G2018INM-2）。

Diosgenin

In vitro の実験では、diosgenin（東京化成、東京）を Ethanol（和光純薬、大阪）に溶解させて用いた。*In vivo* の実験では、diosgenin（東京化成）を日本薬局方ゴマ油（カネダ、東京）に溶解させ、0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$ で経口投与した。Diosgenin の構造式を **Fig. 1** に示す。

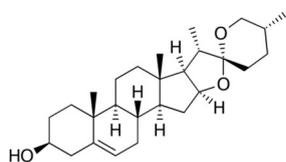


Fig. 1: Diosgenin の構造式

VER-155008（別名：5'-O-[(4-Cyanophenyl)methyl]-8-[[[3,4-dichlorophenyl)methyl] amino]-adenosine)

Heat shock cognate (HSC) 70 の活性阻害剤であり、HSC70 の ATP-binding ポケットに結合することで、HSC70 が活性型（ADP 結合型）になることを阻害する。

In vitro の実験では、VER-155008（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を dimethyl sulfoxide（DMSO、和光純薬）に溶解させて用いた。*In vivo* の実験では、VER-155008（Sigma-Aldrich）を dimethyl sulfoxide（DMSO、和光純薬）に 10 mM となるように溶解させ、それを生理食塩水で 10 倍希釈して 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ で腹腔内投与した。VER-155008 の構造式を **Fig. 2** に示す。

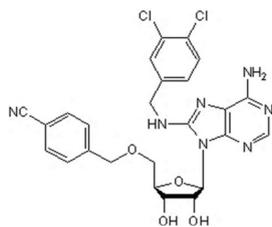


Fig. 2: VER-155008 の構造式

Amyloid beta (A β) ペプチド

A β タンパクの部分配列 A β_{25-35} または A β_{35-25} （Sigma-Aldrich）を滅菌精製水に溶解させて、37°C で 4 日間インキュベートし、凝集させたものを用いた。

AD モデル (5XFAD) マウス

マウスはプラスチックケージ (24×17×12 cm) に入れ、12 時間の明暗周期 (明期 : 7:00–19:00)、恒温恒湿 (22±2°C, 55±10%) の環境で飼育した。水及び固形飼料は自由摂取させた。

AD モデルマウスとして、5XFAD (Tg6799) マウス (雄性及び雌性、5–9 ヶ月齢) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Me, USA) を用いた。5XFAD マウスは、Sweden 型 (K670N, M671L)、Florida 型 (I716V)、London 型 (V717I) の変異をもつ human amyloid precursor protein (APP) 695 遺伝子と、M146L、L286V の変異をもつ human prsenilin 1 (PS1) 遺伝子を神経細胞特異的に過剰発現させた家族性 AD のトランスジェニックマウスであり、10 世代以上 C57BL/6**SJL* F1 にバッククロスさせて確立された line である (Oakley et al., 2006)。雄性 5XFAD (heterozygote (+/-)) マウスと雌性 wild-type (-/-) マウスを交配し、繁殖させ、以下のように genotyping した。

5XFAD マウスの genotyping

生後 4–8 週目に仔マウスの genotyping を行い、群分けした。Heterozygote (+/-) マウスと wild-type (-/-) マウスを実験に用いた。マウスの尾約 5 mm を切断し、溶液 (10 × KAPA Express Extract Buffer 10 µl, 1 U/µl KAPA Express Extract Enzyme 2 µl (GE Healthcare、東京)、滅菌精製水 88 µl) 内に切断した尾を入れた。サーマルサイクラーを用いて 75°C で 10 分間熱変性し DNA を抽出した後、95°C で 5 分間インキュベーションして KAPA Express Extract の protease を不活化させた。

ゲノム DNA を鋳型として、2 種の transgene をそれぞれ検出する primer ペアを用いて、PCR による増幅を行った。2 × KAPA2G Robust HotStart ReadyMix 5 µl、10 µM sense 及び 10 µM anti-sense primer 各 0.5 µl (Table 1)、RT 産物 2 µl、滅菌精製水 2 µl を混合し、94°C で 5 分間の熱変性後、94°C で 30 秒間、各アニーリング温度で 30 秒間、72°C で 30 秒間のサイクル反応を各 25 サイクル行った。

PCR 産物を 1%アガロースゲル上で電気泳動した。アガロースゲルは、1 × Tris-Acetate-EDTA (TAE) Buffer (ナカライテスク、京都) に 1% Agarose S (和光純薬) を加熱溶解し、室温で固めたものを用いた。電気泳動後、アガロースゲルを 0.01% ethidium bromide (和光純薬) -TAE 溶液で 30 分間染色し、UV 照射によりバンドを検出した。596 bp に hAPP、554 bp に hPS1 の両方の DNA 増幅が認められた個体を heterozygote (+/-) の 5XFAD マウスとし、どちらの DNA 増幅も認められない個体を wild-type (-/-) マウスとした。

Table 1: 5XFAD マウスの genotyping に用いるプライマー

	プライマー配列	Product (bp)	アニーリング温度
hAPP	5'-AGAGTACCAACTTGCATGACTACG-3' 5'-ATGCTGGATAACTGCCTTCTTATC-3'	596	60°C
hPS1	5'-GCTTTTTCCAGCTCTCATTACTC-3' 5'-AAAATTGATGGAATGCTAATTGGT-3'	554	55°C

5XFAD マウスに対する diosgenin の投与

Diosgenin は 1 mM となるように溶解し、diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) または溶媒を 1 日 1 回 15 日間経口投与した。

5XFAD マウスの行動試験

・物体認知記憶試験

物体認知記憶試験は黒色 (30 cm \times 40 cm) のケージ内で行った。Training session では、ケージ内の中心点から等距離離れた 2 点に、色と形が同じ物体 A, A' を 1 つずつ置いた。ケージの中央にマウスを静かに放し、マウスの各物体への探索行動の回数を 10 分間測定し、 $\text{preferential index (\%)} = A'/(A+A') \times 100$ を算出した。Training session 開始から 1 時間のインターバルの後、Test session を行った。Test session では、物体 A' を物体 B に交換し、マウスの各物体への探索行動の回数を 10 分間測定し、 $\text{preferential index (\%)} = B/(A+B) \times 100$ を算出した。

・空間記憶試験

空間記憶試験は黒色 (30 cm \times 40 cm) のケージ内で行った。ケージの 40 cm 辺の壁 2 面にそれぞれ異なる目印のイラスト (白色縞模様及び白色水玉模様) を貼った。Training session では、縞模様の壁側の中心点から等距離離れた 2 点に、色と形が同じ物体 C, C' を 1 つずつ置いた。ケージの中央にマウスを静かに放し、マウスの各物体への探索行動の回数を 10 分間測定し、 $\text{preferential index (\%)} = C'/(C+C') \times 100$ を算出した。Training session 開始から 1 時間のインターバルの後、Test session を行った。Test session では、物体 C' を元々置かれた正面の位置の水玉模様の壁側に移動し、マウスの各物体への探索行動の回数を 10 分間測定し、 $\text{preferential index (\%)} = C'/(C+C') \times 100$ を算出した。

・エピソード記憶試験

エピソード記憶試験は黒色 (30 cm \times 40 cm) のケージ内で行った。ケージの 40 cm 辺の壁 2 面にそれぞれ異なる目印のイラスト (白色三角模様及び白色神経細胞のイラスト) を貼った。Training session 1 では、三角模様の壁側の中心点に 1 物体 D1 を、神経細胞の模様の壁側の均等 3 点に、D1 と色と形が同じ 3 物体 D2, D3, D4 を 1 つずつ置いた。ケージの中央にマウスを静かに放し、マウスの各物体への探索行動の回数を 10 分間測定した。Training session 1 終了から 10 分のインターバルの後、Training session 2 を行った。Training session 2 では、三角模様の壁側の中心点から等距離離れた 2 点に 2 物体 E1, E2 を、神経細胞の模様の壁側の中心点から等距離離れた 2 点に 2 物体 E3, E4 を 1 つずつ置いた。つまり、D2 及び E3、D4 及び E4 は同じ場所に置かれていたことになる。ケージの中央にマウスを静かに放し、マウスの各物体への探索行動の回数を 10 分間測定した。Training session 2 終了から

10分のインターバルの後、Test sessionを行った。Test sessionでは、三角模様の壁側の中心点から等距離離れた2点に2物体 E1, D4 を、神経細胞の模様の壁側の中心点から等距離離れた2点に2物体 D2, E4 を1つずつ置いた。ケージの中央にマウスを静かに放し、マウスの各物体への探索行動の回数を10分間測定した。Test sessionにおける preferential index (%) = $(E1 + E4)/(E1 + E4 + D2 + D4) \times 100$ 、 $(D2 + D4)/(E1 + E4 + D2 + D4) \times 100$ 、 $D2/(D2 + D4) \times 100$ 、及び $D4/(D2 + D4) \times 100$ をそれぞれ算出した。

・自発運動試験

自発運動試験は白色 (30 cm × 40 cm) のケージ内で行った。マウスの背中に黒テープを貼り、1匹ずつケージの中央に静かに放し、10分間の自由行動をさせて、デジタルカメラで撮影し、リアルタイムで EthoVision 3.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) に取り込んだ。撮影後、マウスの10分間の総移動距離 (cm)、進行方向に対する方向転換角度 (degree)、不動の時間 (秒) を EthoVision 3.0 で解析した。

二次元電気泳動

薬物投与後、Wil-type または 5XFAD マウス (各群 n = 1 ずつ) に三種混合麻酔薬 [75 µg/ml ドミトール (日本全薬工業、郡山)、400 µg/ml ミタゾラム (サンド、東京)、500 µg/ml ベトルファール (Meiji Seika ファルマ、東京)] をマウス体重 (g) × 10 - 50 (µl) 腹腔内に投与し麻酔した。胸部を切開し、左心室に翼状針 (トップ、東京) を刺入した後、右心房に切れ込みを入れ、左心室より氷冷した saline を 20 ml 灌流し、マウスの全脳を取り出した後、大脳皮質を摘出した。大脳皮質を Mammalian protein extraction reagent (M-PER solution) (Thermo Fisher scientific, MA, USA) 1 ml、100 × protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher scientific) 10 µl の混合液中で homogenate し、氷上で 30 分間静置した。4°C で 10 分間遠心分離を行った後 (14000 g)、可溶性画分を二次元電気泳動に供した。この後の二次元電気泳動は Genomine (Pohang、韓国) に委託し、行われた。

MALDI-TOF/MS

二次元電気泳動により 3 群間で発現量に差のあるスポットを比較した。スポットの輝度値の解析により、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスで発現量に変化し、diosgenin 投与によりその変化が打ち消されたスポットについて MALDI-TOF/MS によりタンパクを同定した (Genomine に委託)。

マウス胎児大脳皮質神経細胞の初代培養

胎生 14 日齢の ddY マウス (Japan SLC, 浜松) から取り出した胎児を phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、初代培養用に調整した培地 [Neurobasal media (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 中に 12% 馬血清 (Life Technologies, MA, USA)、2 mM L-グルタミン、0.6% グルコースを溶解] に入れた。実体

顕微鏡 (SZ61, Olympus, 東京) 下で大脳皮質のみを単離し、クリーンベンチ内でハサミを用いて細かく切断した後、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去し、沈渣に 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA solution (Life Technologies) を 1 ml 加え、懸濁した。37°C で 15 分間、5 分おきに攪拌しながらインキュベーションした後、培地を 2 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去し、沈渣に 600 U/ml DNase I (Life Technologies) -0.03% trypsin inhibitor (Life Technologies) -PBS 溶液を 1 ml 加え、懸濁した。37°C で 15 分間、5 分おきに攪拌しながらインキュベーションした後、培地を 2 ml 加え、700 rpm で 3 分間遠心した。上清を除去し、沈渣に培地を 3 ml 加え、先端を炙りなめしたパスツールピペットで細胞塊が見えなくなるまで穏やかに懸濁した後、70 μ m nylon cell strainer (Becton Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA) で濾過した。Trypan blue 染色で死細胞と弁別しながら生細胞を数えた後、 1.5×10^4 cells/well となるように 8-well チャンバースライド (BD) に播種した。8-well チャンバースライドは、前日に 5 μ g/ml Poly-D-Lysine (Sigma-Aldrich) -PBS 溶液を入れ、37°C で一晩インキュベーションし、培養当日に PBS で 2 回洗浄したものをを用いた。

培養は、10% CO₂、37°C、飽和水蒸気下で行った。播種から 4-5 時間後に、培地を全量、B-27 supplement を含む無血清培地 [Neurobasal media 中に 2% B-27 supplement (Life Technologies)、2 mM L-グルタミン、0.6% グルコースを溶解] に交換した。

神経細胞に対する薬物処置

神経細胞培養開始 3 日後、10 μ M A β ₂₅₋₃₅ または A β ₃₅₋₂₅ を処置し、1 または 3 日間培養した。その後、各濃度の薬物を B-27 supplement を含む無血清培地に溶解し、培地を全量交換した。神経細胞に対する 1,25D₃-MARRS 中和抗体処置に関しては、Rabbit 抗 1,25D₃-MARRS ポリクローナル抗体 (最終濃度 1:1000) (Ab099 clone, Dr. Nemere より供与) または normal rabbit IgG (Santa Cruz) を B-27 supplement を含む無血清培地に溶解し、培地を全量交換した。15 分間インキュベーションした後、追加で diosgenin (最終濃度 1 μ M) を含む B-27 supplement を含む無血清培地を加えた。

神経細胞への siRNA 導入

初代培養神経細胞への siRNA 導入は Lonza 社 (Basel, Switzerland) のプロトコールに従って行った。胎生 14 日齢の ddY マウス由来の大脳皮質初代培養神経細胞 (5.0×10^6 細胞) に 300 nM HSC70 siRNA (Stealth siRNA, Thermo Fisher Scientific) または 300 nM Control siRNA (Select Negative Control siRNA #1, Thermo Fisher Scientific) を 2 μ g GFP vector と混合し、Amaxa Nucleofector (Lonza) でトランスフェクションした。 1.5×10^4 cells/well となるように 8-well チャンバースライドに播種し、播種から 4-5 時間後に、培地を全量、B-27 supplement を含む無血清培地に交換した。

培養細胞の蛍光免疫染色

神経細胞の培養終了後、培地を除去し PBS で洗浄した後、4% Paraformaldehyde-PBS 溶液を加えて 60 分間常温で静置し固定した。溶液を除去し、0.3% TritonX-100 (和光純薬) -PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った。一次抗体溶液 {0.3% TritonX-100-PBS 溶液、normal goat serum (和光純薬)、以下いずれかの一次抗体 [mouse IgM 抗 HSC70 モノクローナル抗体 (1:300, Abcam, Cambridge, UK)、mouse IgG₁ 抗リン酸化型 neurofilament-H (pNF-H) モノクローナル抗体 (1:250, Convance, Princeton, NJ, USA)、mouse IgG₁ 抗 GAPDH モノクローナル抗体 (1:100, Applied Biological Materials Inc., Canada)、rabbit IgG α -tubulin ポリクローナル抗体 (1:200, Abcam)]} を 100 μ l 加え、4°Cで一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除去し、0.3% TritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体液 [0.3% TritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 594 標識 goat anti-mouse IgM 抗体 (1:400, Life Technologies)、Alexa Fluor 488 or 568 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:400, Life Technologies)、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:400, Life Technologies)] を 100 μ l 加え、遮光下、常温で 2 時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 μ g/ml) (Enzo Life Science, Farmingdale, NY, USA) -PBS 溶液を加え、遮光下、常温で 5 分間反応させた。その後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を行った後、Aqua Poly Mount (Polyscience, Warrington, PA, USA) で封入した。

Western blot

マウス大脳皮質サンプルを 1 \times Halt protease & phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) を含む M-PER (Thermo Fisher Scientific) で homogenate した。Lysate を SDS-PAGE し、ゲル上のタンパク質をニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) へ転写した。5%スキムミルク (和光純薬、日本) , 0.1% Tween 20-Tris-buffer saline (T-TBS) 溶液にタンパク質転写後のメンブレンを浸し、30 分間、室温でブロッキングした。0.1% T-TBS で 2 回リンスした後、ラッピーバッグ (東信産業、東京) 内で mouse 抗 HSC70 モノクローナル抗体 (1:4000, Abcam) または rabbit 抗 β -actin 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology, MA, USA) を含んだ Can Get Signal Solution 1 (Toyobo、大阪) と一晩、4°Cで反応させた。メンブレンを 0.1% T-TBS で 15 分間 \times 4 回リンスした後、ラッピーバッグ内で HRP 標識 goat 抗 mouse IgM 抗体 (1:2000, Santa Cruz, CA, USA) または HRP 標識 goat 抗 rabbit IgG (1:2000, Santa Cruz) を含んだ Can Get Signal Solution 2 (Toyobo) と 2 時間、室温で反応させた。メンブレンを 0.1% T-TBS で 15 分間 \times 4 回リンスした後、Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (Sigma-Aldrich) と反応させ、LAS4000 (GE Healthcare) により化学発光を検出し、画像を撮影した。取得した画像について、CS analyzer (ATTO、東京) を用いてバンドの輝度を定量した。

培養細胞の画像解析

蛍光免疫染色後のスライド観察には、蛍光倒立顕微鏡 Cell Observer (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)、Axio Vision 4.8 ソフトウェア (Carl Zeiss) を用い、一枚当たり 432.49 μ m \times 322.81 μ m また

は 864.98 μm \times 645.62 μm の大きさの画像を取得した。神経細胞内の HSC70 の発現量及び pNF-H 陽性軸索長の測定には、画像解析ソフト MetaMorph version 7.8 (Molecular Devices, Tokyo, Japan) を用いて自動計測した。神経細胞体当たりの抗体陽性輝度の積算値により、細胞中の HSC70 の発現量を定量した。また、画像全体の pNF-H 陽性軸索の長さを測定し、Map2 陽性の神経細胞体の数で除することで、神経細胞当たりの軸索の長さを算出した。

siRNA 導入実験の画像解析は、画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health, USA) を用いた。GFP 陽性神経細胞 1 個 1 個を ROI で囲み、各細胞中の HSC70 の発現量を定量した。また、GFP 陽性神経細胞から伸びる pNF-H 陽性軸索長をトレースし、神経細胞当たりの軸索の長さを算出した。

軸索上の α -tubulin の発現量の定量も Image J を用いた。Structure-retained 軸索及び Structure-lost 軸索をなぞり、各軸索上の α -tubulin の輝度値を算出した。

免疫沈降法及び銀染色

胎生 14 日齢の ddY マウス由来の大脳皮質初代培養神経細胞を 3 日間培養後、10 μM A β_{25-35} または溶媒を添加し、30 分間インキュベートした。神経細胞を PBS で洗浄後、1 \times Halt protease & phosphatase inhibitor cocktail を含む M-PER 溶液で溶解させた。Dynabead Protein G (Life Technologies) に非特異的に直接結合するタンパク質を除く目的で、細胞 lysate (50 μg) をあらかじめ 50 μl Dynabeads Protein G と 10 分間、室温でインキュベートした。続いて、その上清を mouse 抗 HSC70 モノクローナル抗体 (4.27 μg , Abcam) と 4 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間インキュベートした。新たな 50 μl Dynabeads Protein G を加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 、20 分間インキュベートし、65 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間熱処理した。免疫沈降後、SDS-PAGE し、銀染色を行った。銀染色には SilverQuest Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、Thermo Fisher Scientific 社のプロトコールに従ってバンドを検出した。

LC-MS/MS による VER-155008 の検出

VER-155008 の血液脳関門 (BBB) の透過性を検討するために、5XFAD マウスに VER-155008 (89.9 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) または溶媒 (10%DMSO in Saline) を腹腔内投与した。投与 5 分後に、マウスをイソフルランで吸入麻酔し、血液 (下大静脈より) を 300–400 μl 採取した。血液採取に用いた 26 G 注射針 (テルモ、東京) 及び 1 ml シリンジ (テルモ) は、あらかじめ 1 U/ml ヘパリン (和光純薬) 溶液で共洗いした。10,000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間遠心分離後、上層の血漿 (120 μl) を回収し、1200 μl のメタノールを加えてタンパク変性させた。また、マウス胸部を切開し、左心室に翼状針 (トップ) を刺入した後、右心房に切れ込みを入れ、左心室より氷冷した saline を 20 ml 灌流後、マウスの全大脳皮質を摘出した。大脳皮質の質量の 10 倍量 (μl) のメタノールを加えて homogenate し、タンパク変性させた。血漿及び大脳皮質サンプルについて、変性タンパクを遠心分離 [10,000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 分間] で取り除き、上清をホットプレート上で乾燥 (65 $^{\circ}\text{C}$ 、1 日間 \sim) 後、100 μl メタノールを加え再溶解し、0.45 μm 径マ

イレクス-LH フィルター (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に通した溶液を LC-MS/MS 解析した。

標品 VER-155008 は、上記と同様に調製した 5XFAD マウス (薬物投与なし) の大脳皮質または血漿サンプルと混合し、測定に用いた。LC-MS/MS 解析には、Thermo Fisher Scientific Accela HPLC システム及び LTQ Orbitrap XL hybrid Fourier Transform Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。液体クロマトグラフィーは、40°Cに保持した Capcell Pak C18 MGIII S-5 (1.5 mm i.d. × 150 mm; Shiseido, 東京) カラムを用いて、200 µl/min の流速で実施した。移動相には、超純水及びメタノール (M) を使用し、0-5 分: 40-70% M、5-10 分: 70-85% M、10-13: 85-100% M、13-14 分: 100-40% M、14-18 分: 40% M の濃度勾配で検出した。スプレー電圧 4.5 kV、キャピラリー電圧 40.0 kV、管レンズ 150 V、キャピラリー温度 330°C、シーズガス流量 50 unit、及び補助ガス流量 10 unit とした。

脳組織切片の作製

薬物投与後、三種混合麻酔薬 [75 µg/ml ドミトール (日本全薬工業)、400 µg/ml ミタゾラム (サンド)、500 µg/ml ベトルファール (Meiji Seika ファルマ)] をマウス体重 (g) × 10 - 50 (µl) 腹腔内に投与し麻酔した。胸部を切開し、左心室に翼状針 (トップ) を刺入した後、右心房に切れ込みを入れ、左心室より氷冷した saline を 20 ml 灌流し、マウスの全脳を摘出した。全脳を 4°C で 4% Paraformaldehyde-PBS 溶液に一晩浸けた後、30% sucrose (和光純薬) -PBS に置換した [4°C、7-10 日間]。置換後、アルミホイルに包んで-30°Cに保存した。クリオスタット (CM3050SL, Leica, Heidelberg, Germany) を用いて、Frontal 領域 (Bregma 1.3-0.4 mm) 及び parietal 領域 (Bregma -1.4-2 mm) におけるそれぞれ 3-4 枚ずつの 20 µm 厚の連続冠状切片を作製した。その際、庫内温度及びステージは-20°Cに設定した。ゼラチン液 (ゼラチン 1 g, 硫酸カリウム(III)・2H₂O 150 mg を精製水 1000 ml に希釈) でコーティングしたスライドガラスに貼り付け、よく乾燥させてから-30°Cに保存した。

脳組織切片の蛍光免疫染色

脳切片を常温に戻した後、透明マニキュアでスライドガラスの周囲を囲み、4% Paraformaldehyde-PBS 溶液を加え、60 分間常温で静置し、固定した。溶液を除去し、0.5% TritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った。一次抗体溶液 {0.5% TritonX-100-PBS 溶液、normal goat serum (和光純薬)、以下いずれかの一次抗体 [rabbit IgG 抗ヒト Aβ_{1-40/42} 抗体ポリクローナル抗体 (1:400, Chemicon, Temecula, USA)、mouse IgG₁ 抗 Phospho-PHF-tau pSer + Thr205 抗体 (AT8) モノクローナル抗体 (1:100, Thermo Fisher scientific)、mouse IgG₁ 抗リン酸化型 neurofilament-H (pNF-H) モノクローナル抗体 (1:500, Convance)]} を加え、4°Cで一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除去し、0.5% TritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体液 [0.5% TritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 568 標識 goat anti-rabbit 抗体 (1:400, Life Technologies)、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-mouse 抗体 (1:400, Life Technologies)] を加え、遮光下、常温で 2 時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗

浄を2回行った後、Aqua Poly Mount (Polyscience, Warrington, PA, USA) で封入した。

脳組織切片の画像解析

脳切片のそれぞれの部位 [PRh (嗅周囲皮質) 及び海馬 CA1] について、正立型蛍光顕微鏡 (BX-61, Olympus) 及び画像撮影装置 (DP70, Olympus) を用いて、一枚当たり $864.98 \mu\text{m} \times 645.62 \mu\text{m}$ の大きさの画像を取得した。取得した画像の解析には、画像解析ソフト Image J を用いた。蛍光画像の抗 $\text{A}\beta_{1-40/42}$ 抗体陽性面積を定量するため、各画像の抗体陽性アミロイドプラークを囲み、その積算値を算出した。また、各アミロイドプラーク陽性面積内での pNF-H 陽性変性軸索及び PHF-タウの割合を算出した。

データ解析

データは平均値 \pm 標準誤差 (SEM) または \pm 標準誤差 (SD) で表した。有意差検定には、Prism 6.07 (Graph Pad software, Sun Diego, CA, USA) を用い、one sample *t*-test、two-tailed unpaired *t*-test、One-way analysis of variance (ANOVA) *post hoc* Bonferroni test または Dunnett's test、repeated measures Two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test を行った。有意水準は 5% とした。

1.3. 実験結果

1.3.1. Diosgenin 投与により 5XFAD マウス脳内で発現変動するタンパク質の同定

本実験ではまず、diosgenin による 5XFAD マウスの記憶改善に関わる神経細胞中でのシグナル分子を探索した。Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雄性、5-6 ヶ月齢）に溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 15 日間連続で経口投与し、物体認知記憶試験を行った。その結果、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群では記憶障害が起こっていたが、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは、物体認知記憶が有意に改善した (Fig. 3)。

続いて、各群 $n = 1$ ずつのマウスについて、大脳皮質からタンパク質を抽出し、3 群間で発現量に変化したタンパク質を二次元電気泳動で比較した。二次元電気泳動より検出された約 900 スポット (Fig. 4A) のうち、wild-type マウスの溶媒投与群と比べて 5XFAD マウスの大脳皮質中で発現量に変化 (増加または減少) し、その変化が diosgenin 投与により打ち消された (減少または増加) スポットは合計 29 個検出された。その中から、diosgenin を投与した 5XFAD マウスの脳内で特に発現量変化が大きかったスポットについて、MALDI-TOF/MS によるタンパク質の同定を行った。その中のタンパク質の一つ (Fig. 4A 中赤矢印) は、Heat shock cognate (HSC) 70 であると示唆された (coverage: 39%, score: 309)。HSC70 は wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスの大脳皮質中で増加し、diosgenin 投与により顕著に減少した (Fig. 4B, C)。

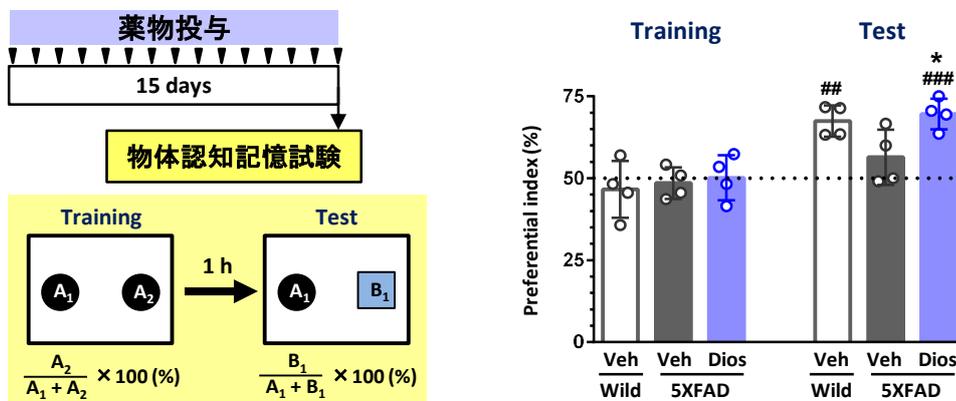


Fig. 3: 5XFAD マウスの記憶障害に対する diosgenin の作用

Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雄性、5-6 ヶ月齢）に溶媒 (Vehicle, Veh) または diosgenin (Dios; 0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 15 日間連続で経口投与した。15 日目に物体認知記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。物体 A' または物体 B' に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。* $p < 0.05$ vs 5XFAD/Veh, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs 50%, One sample *t*-test, mean \pm SD, $n = 4$ mice/group. [Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

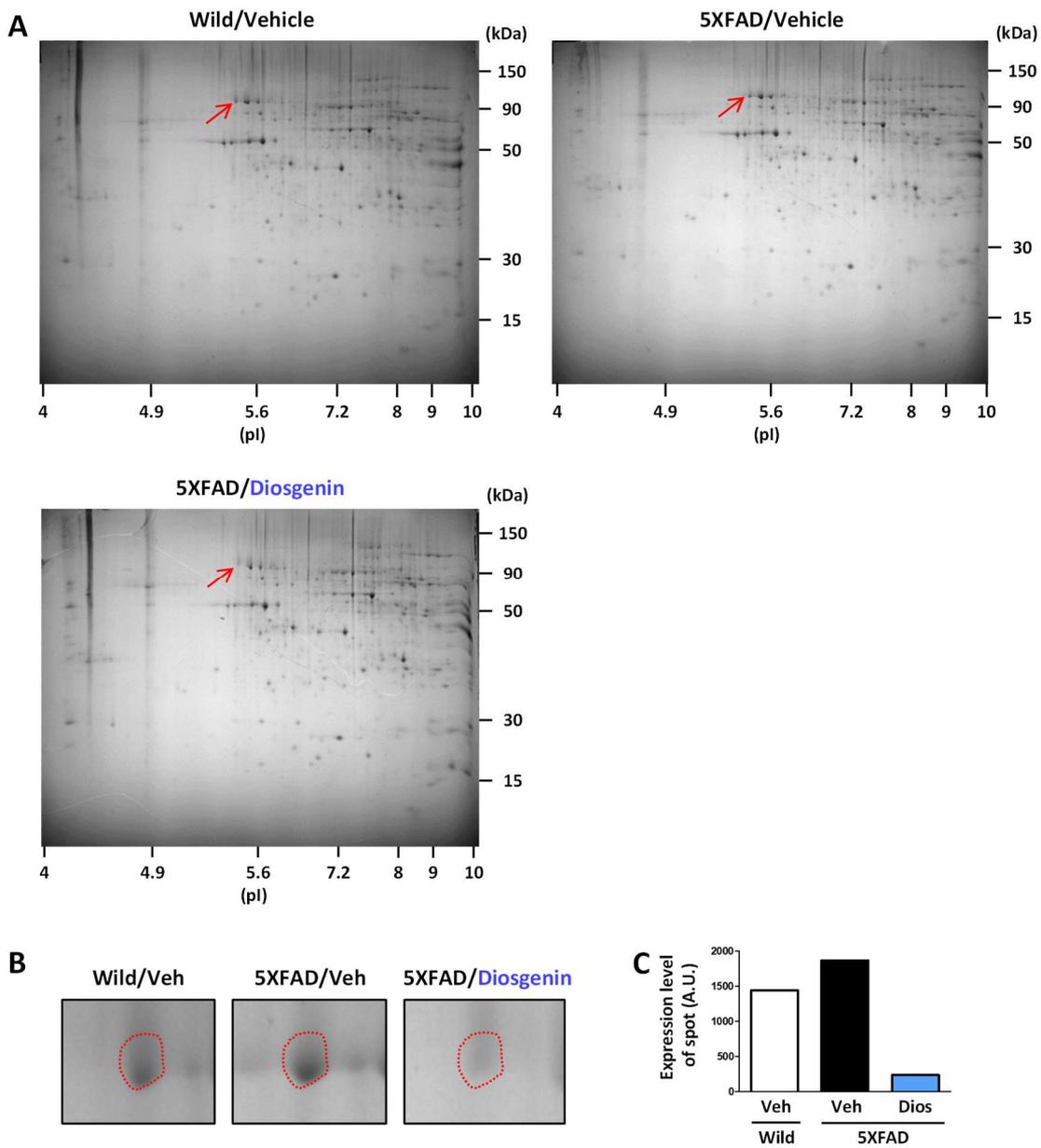


Fig. 4: Diosgenin 投与により大脳皮質中で発現量に変化するタンパク質の同定

A, 溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$)を 15 日間で経口投与した wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雄性、5-6 ヶ月齢) から大脳皮質 lysate を作製し、二次元電気泳動を行った。

B, **A** 中の赤矢印のスポットの拡大画像。

C, **B** 中の赤枠で囲んだスポットの輝度値の定量グラフ。

[Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

1.3.2. Diosgenin による A β ₂₅₋₃₅ 処置神経細胞及び 5XFAD マウスに対する HSC70 の発現量変化の検討

5XFAD マウスへの diosgenin 投与により大脳皮質中で発現量が減少するタンパク質の候補として、HSC70 が挙げられた。そこで、diosgenin による HSC70 の発現量変化の再現性を ddY マウス (E14) の大脳皮質神経細胞及び 5XFAD マウスの大脳皮質 lysate を用いて検討した。

A β ₂₅₋₃₅ (10 μ M) または negative control A β ₃₅₋₂₅ (10 μ M) を 3 日間処置した神経細胞に diosgenin (0.1, 1 μ M) を処置し、その 4 日後に抗 HSC70 抗体及び抗 pNF-H 抗体 (軸索マーカー) による蛍光免疫染色を行った。その結果、神経細胞中の HSC70 の発現量は A β ₂₅₋₃₅ 処置により有意に増加したが、diosgenin の後処置により有意に減少した (Fig. 5A–D) またその際、A β ₂₅₋₃₅ 処置により軸索が有意に萎縮したが、diosgenin の後処置により軸索は有意に再伸長した (Fig. 5E, F)。さらに、wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雄性、7–8 ヶ月齢) に溶媒または diosgenin (0.1 μ mol/kg/day) を 18 日間連続で経口投与し、大脳皮質よりタンパク質を抽出後、Western blot を用いて HSC70 の発現量を比較した。その結果、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスの大脳皮質中では HSC70 が増加傾向を示し、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは HSC70 が減少傾向を示した (Fig. 5G, H)。以上より、diosgenin による HSC70 減少の再現性が確認された。

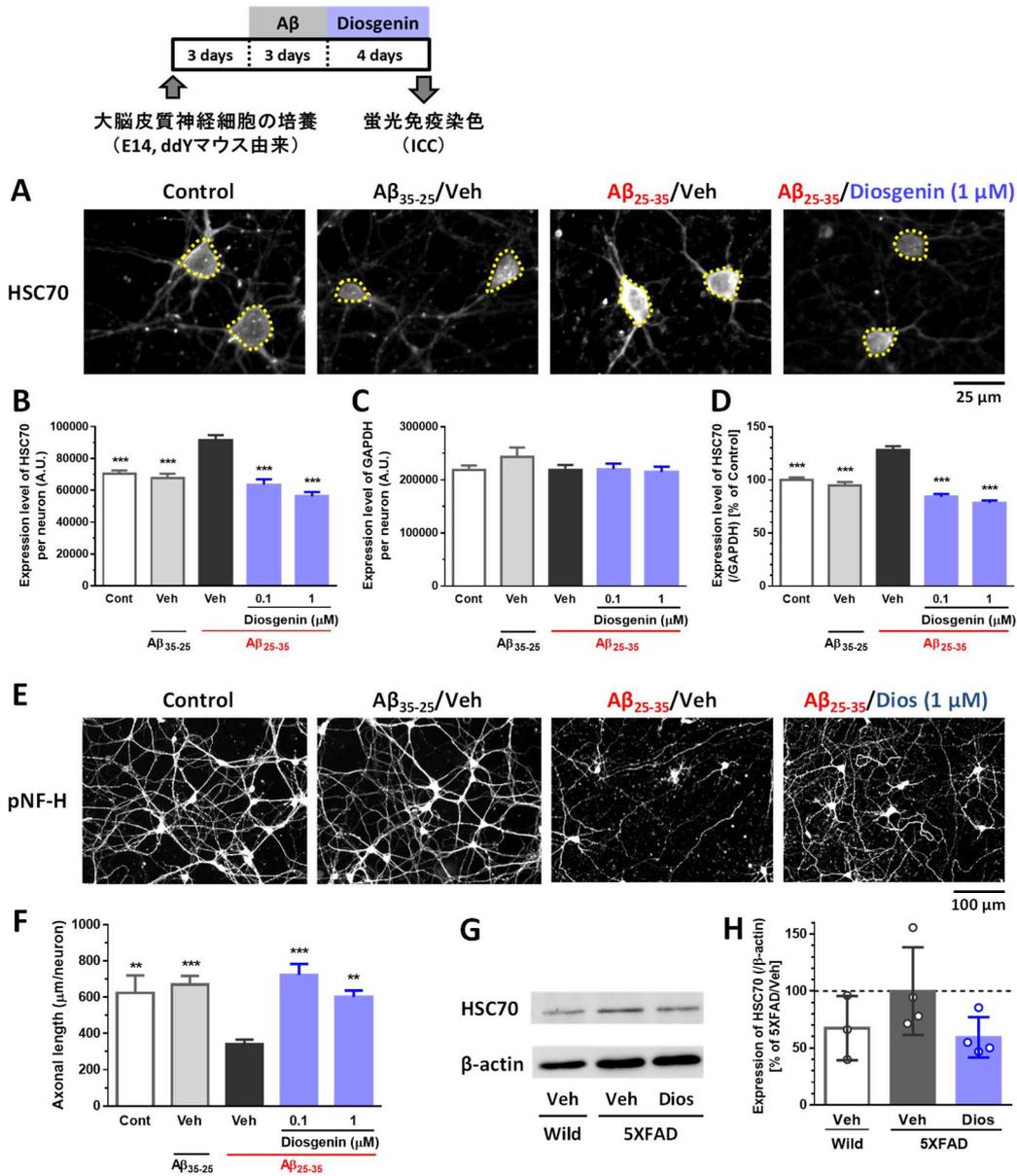


Fig. 5: Diosgenin による神経細胞中及び 5XFAD マウス脳内の HSC70 の発現量への作用

A–F, 3 日間培養した ddY (E14) マウス大脳皮質初代培養神経細胞に $A\beta_{25-35}$ (10 μM) または $A\beta_{35-25}$ (10 μM) を 3 日間処置し、diosgenin (0.1, 1 μM) を 4 日間処置した。抗 HSC70 抗体、抗 GAPDH 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、神経細胞（黄色点線）中の (B) HSC70、(C) GAPDH、(D) HSC70/GAPDH の発現量及び (E, F) pNF-H 陽性軸索密度を測定した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs $A\beta_{25-35}/Veh$, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, mean \pm SEM, (B–D) $n = 115$ –217 neurons, (F) $n = 11$ –15 photos.

G–H, 溶媒または diosgenin (0.1 $\mu mol/kg/day$) を 18 日間で経口投与した wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雄性、7-8 ヶ月齢）から大脳皮質 lysate を作製し、Western blot で HSC70 及び β -actin の発現量を測定した。 $p > 0.05$ vs 5XFAD/Veh, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, mean \pm SD, $n = 3$ –4 mice.

[Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

1.3.3. 1,25D₃-MARRS 中和抗体処置下における diosgenin による HSC70 の発現量への影響

A β_{25-35} を処置した神経細胞に diosgenin を後処置すると、神経細胞中で HSC70 が減少し、軸索が再伸長することが示された。Diosgenin による軸索伸長や記憶改善は、1,25D₃-MARRS 受容体を介することがわかっている (Tohda et al., 2012; Tohda et al., 2013) ことから、HSC70 の発現量変化と 1,25D₃-MARRS シグナルの関与を検討した。

A β_{25-35} (10 μ M) を 3 日間処置した大脳皮質神経細胞に対し、1,25D₃-MARRS 中和抗体または normal rabbit IgG を diosgenin (0.1, 1 μ M) と共に処置し、その 4 日後に抗 HSC70 抗体、抗 GAPDH 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、1,25D₃-MARRS 中和抗体処置により、diosgenin による軸索再伸長作用 (Fig. 6A) 及び神経細胞中の HSC70 の減少 (Fig. 6B) がともに消失した。このことから、diosgenin による HSC70 の減少は、1,25D₃-MARRS シグナルを介して起こることが示唆された。

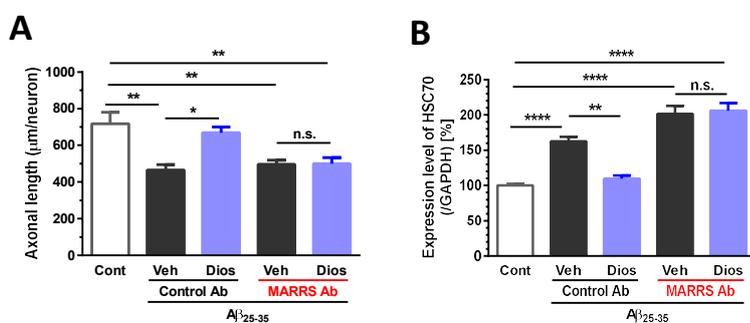


Fig. 6: 神経細胞への 1,25D₃-MARRS 中和抗体処置下での diosgenin の作用

3 日間培養した ddY (E14) マウス大脳皮質初代培養神経細胞に A β_{25-35} (10 μ M) を 3 日間処置した。その後、normal rabbit IgG (Control Ab) または 1,25D₃-MARRS 中和抗体 (MARRS Ab) を処置し、15 分後に diosgenin (1 μ M) を加えた。その 4 日後に、抗 HSC70 抗体、抗 GAPDH 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、(A) 細胞中の HSC70 の発現量及び (B) 軸索密度を測定した。*p < 0.05, **p < 0.01, ****p < 0.0001, One-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, (A) n = 78–243 neurons, (B) n = 9–14 photos. [Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

1.3.4. 神経細胞中の HSC70 ノックダウンによる軸索伸長への影響

ここまでの検討により、diosgenin は 1,25D₃-MARRS シグナルを介して神経細胞中の HSC70 を減少させることが明らかになった。そこで、HSC70 の減少が直接軸索伸長に関わるかを検討するために、神経細胞への siRNA 導入実験を行った。

大脳皮質神経細胞に negative control siRNA または HSC70 siRNA (300 nM) を GFP vector (2 μg) と共にエレクトロポレーション法で導入し、その 4 日後に抗 HSC70 抗体、抗 GAPDH 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。siRNA が導入された神経細胞とそれ以外の細胞を区別して定量するために、GFP 陽性神経細胞においてのみ、HSC70 と GAPDH の発現量、及び軸索長を測定した。その結果、HSC70 siRNA 導入により、神経細胞中の HSC70 の発現量は有意に減少した (Fig. 7A)。また、HSC70 がノックダウンされた神経細胞では、軸索伸長が有意に促進された (Fig. 7B)。以上より、神経細胞中における HSC70 の減少は、直接神経細胞の軸索伸長を促進することが示された。

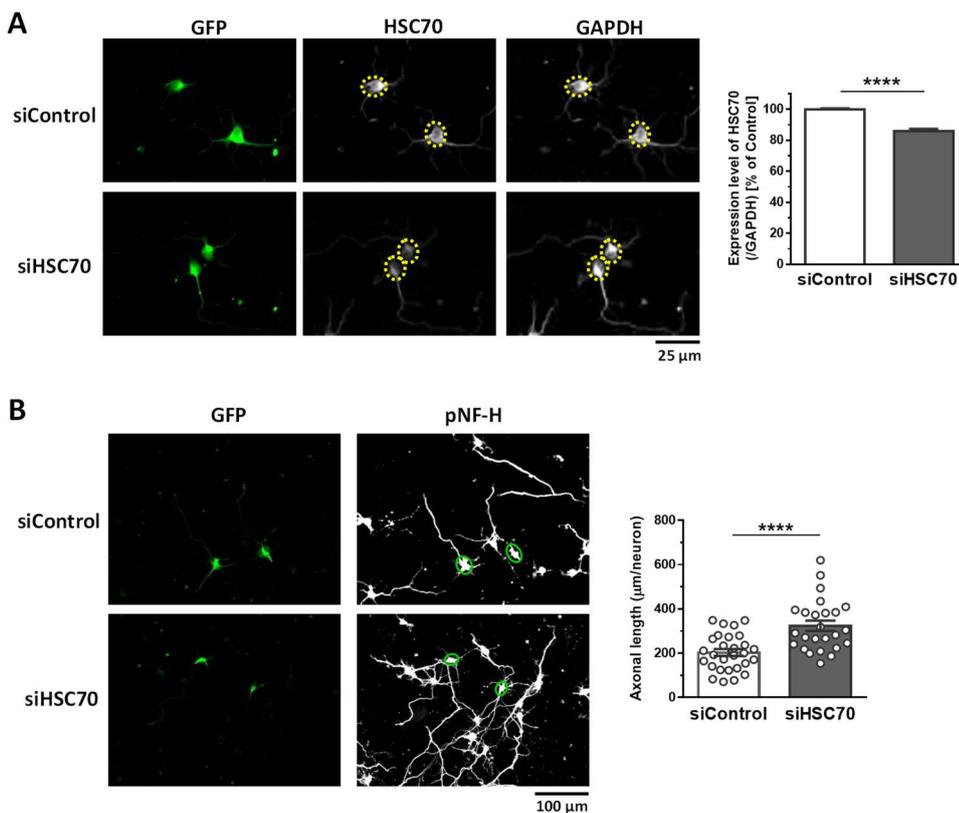


Fig. 7: 神経細胞の HSC70 ノックダウンによる軸索伸長への影響

ddY (E14) マウス大脳皮質初代培養神経細胞に、negative control siRNA または HSC70 siRNA (300 nM) を GFP vector (2 μg) と共にエレクトロポレーション法で導入した。培養より 4 日後に、抗 HSC70 抗体、抗 GAPDH 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。GFP 陽性 (siRNA が導入された) 神経細胞について、(A) 細胞中の HSC70 の発現量及び (B) 軸索長を測定した。**** $p < 0.0001$, unpaired t -test, mean \pm SEM, (A) $n = 87$ – 155 neurons, (B) $n = 25$ – 28 photos. [Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

1.3.5. 神経細胞中における HSC70 の結合タンパク質の同定

HSC70 は様々なタンパク質と結合し、シャペロン活性によりその結合（クライアント）タンパク質の分解やフォールディングを促進することが報告されている。そこで私は、A β 存在下では神経細胞中で HSC70 のシャペロン機能が亢進しており、それによって軸索萎縮が促進される可能性を考えた。そこでまず、A β 処置によって神経細胞中で HSC70 との結合が増加するタンパク質を探索した。

3 日間培養された大脳皮質神経細胞に対し、溶媒または A β_{25-35} (10 μ M) を 30 分処置した。細胞 lysate よりタンパク質を抽出し、抗 HSC70 抗体による共免疫沈降を行った。免疫沈降されたタンパク質について、HSC70 とその結合タンパク質の結合を保持するために、65°C の mild な条件下で 5 分間熱処理を施した。それらタンパク質を SDS-PAGE 及び銀染色を行ったところ、赤矢印で示したバンドが A β_{25-35} 処置によって増加していた（溶媒処置と比べて 122% 増加）（Fig. 8）。nano LC-MS/MS によってタンパク質を同定したところ、本バンドは α -tubulin であると示唆された（coverage: 6%, score: 44）。また、HSC70 が確かに免疫沈降されていることが western blot で確認された。

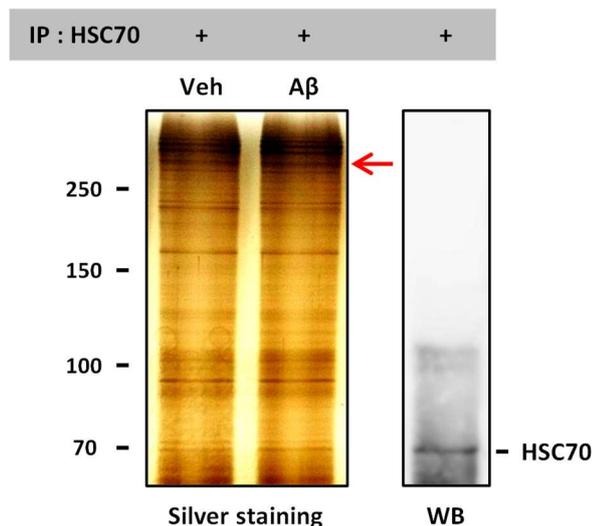


Fig. 8: 神経細胞中における HSC70 の結合タンパク質の同定

大脳皮質初代培養神経細胞を 3 日間培養し、溶媒または A β_{25-35} (10 μ M) を 30 分処置した。細胞 lysate よりタンパク質を抽出し、抗 HSC70 抗体による共免疫沈降を行った。免疫沈降されたタンパク質に対して 65°C、5 分間熱処理を施した後、SDS-PAGE 及び銀染色、または抗 HSC70 抗体を用いた western blot を行った。[Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

1.3.6. A β 及び diosgenin 処置による軸索上の α -tubulin への影響の検討

神経細胞中における HSC70 のクライアントタンパク質の候補として、 α -tubulin が同定された。 α -tubulin は、軸索の骨格タンパク質であり、軸索上における α -tubulin が増加（重合）すると軸索伸長が促進される (Conde & Cáceres, 2009)。そこで、A β 及び diosgenin 処置による軸索上における α -tubulin の発現量を比較した。

2 日間培養された大脳皮質神経細胞に、溶媒または A β_{25-35} (10 μ M) を 1 日間処置した。その後、通常培地で 4 日間培養し、抗 pNF-H 抗体及び抗 α -tubulin 抗体による蛍光免疫染色を行った。微分干渉像 (DIC) 及び蛍光画像で観察を行った結果、軸索の形態が保持された structure-retained 軸索、及び軸索が粒状に変性した structure-lost 軸索の 2 種類に大別された (Fig. 9A)。軸索上における α -tubulin の発現量は、structure-retained と比べて structure-lost 軸索上で有意に低かった (Fig. 9B)。続いて、2 日間培養された大脳皮質神経細胞に、溶媒または A β_{25-35} (10 μ M) を 1 日間処置後、diosgenin (1 μ M) を 4 日間培養し、同様の実験を行った (Fig. 9C)。その結果、全軸索中における structure-lost 軸索、つまり α -tubulin の発現が低い軸索の割合は、A β 処置によって有意に増加し、diosgenin の後処置によって有意に減少した (Fig. 9D)。

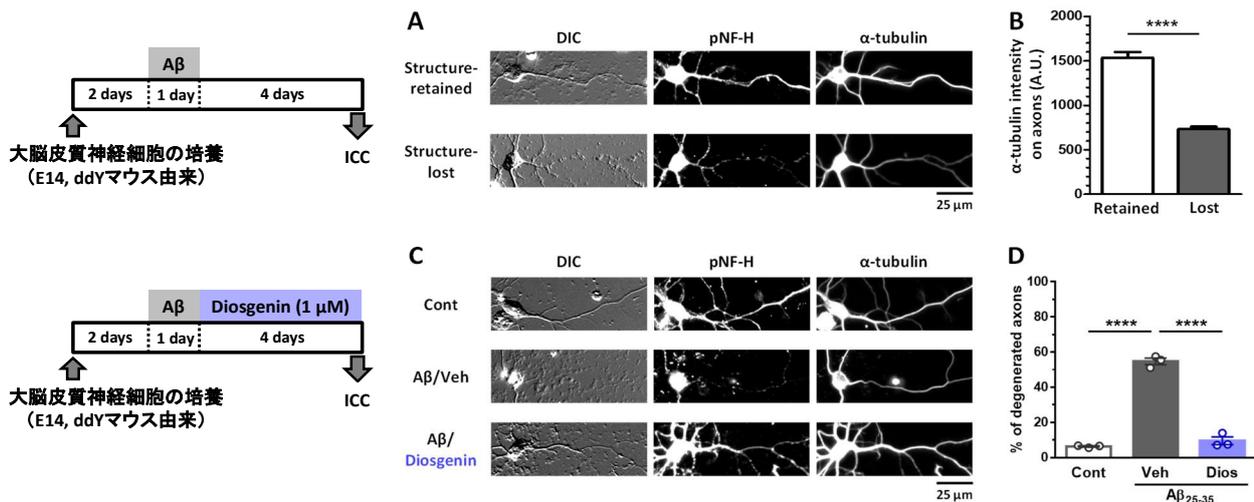


Fig. 9: A β 及び diosgenin 処置による軸索上の α -tubulin への作用

A, 2 日間培養した ddY (E14) マウス大脳皮質初代培養神経細胞に A β_{25-35} (10 μ M) を 1 日間処置した。その後、通常培地で 4 日間培養し、抗 pNF-H 抗体及び抗 α -tubulin 抗体による蛍光免疫染色を行った。微分干渉像 (DIC) 及び蛍光画像での観察から、軸索の形態が保持された structure-retained 軸索、及び軸索が粒状に変性した structure-lost 軸索の 2 種類に大別された。**B**, 各軸索上での α -tubulin の発現量を測定した。**** p < 0.0001, unpaired t -test, mean \pm SEM, n = 84–104 axons. **C**, 2 日間培養した ddY (E14) マウス大脳皮質初代培養神経細胞に A β_{25-35} (10 μ M) を 1 日間処置後、溶媒または diosgenin (1 μ M) を 4 日間処置し、抗 pNF-H 抗体及び抗 α -tubulin 抗体による蛍光免疫染色を行った。**D**, 各群において、全軸索中における structure-lost 軸索の割合を測定した。**** p < 0.0001 vs A β /Veh, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test mean \pm SEM, n = 3 photos. [Yang & Tohda, 2018a より引用、一部改変]

1.3.7. HSC70 の活性阻害剤による軸索再伸長作用の検討

ここまでの研究により、神経細胞中の HSC70 の発現減少が diosgenin による軸索再伸長にとって重要な分子である可能性を示してきた。したがって次に、HSC70 の特異的阻害剤を用いて軸索再伸長に及ぼす影響を検討した。

本実験では、HSC70 の活性阻害剤として VER-155008 (Fig. 2) を用いた。HSC70 は活性型 (ADP 結合型) をとる時のみ、様々なクライアントタンパク質と結合でき、シャペロン活性を発揮する (Liu et al., 2012)。VER-155008 は HSC70 の ATP 結合ポケットに直接結合することで、HSC70 が活性型に変化するのを阻害することが報告されている (Schlecht et al., 2013)。

3日間培養された大脳皮質神経細胞に $A\beta_{25-35}$ (10 μM) を3日間処置し、VER-155008 (0.05, 0.5, 5 μM) を後処置した。その4日後に抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、 $A\beta_{25-35}$ により軸索萎縮が誘発されたが、VER-155008 の後処置により軸索が有意に再伸長することが示された (Fig. 10)。

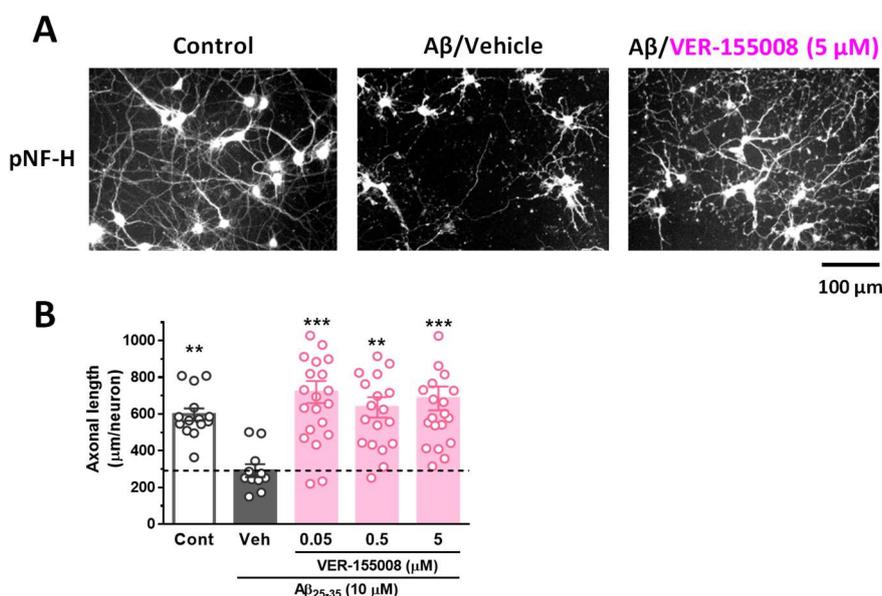


Fig. 10: HSC70 の活性阻害剤 VER-155008 による軸索再伸長への作用

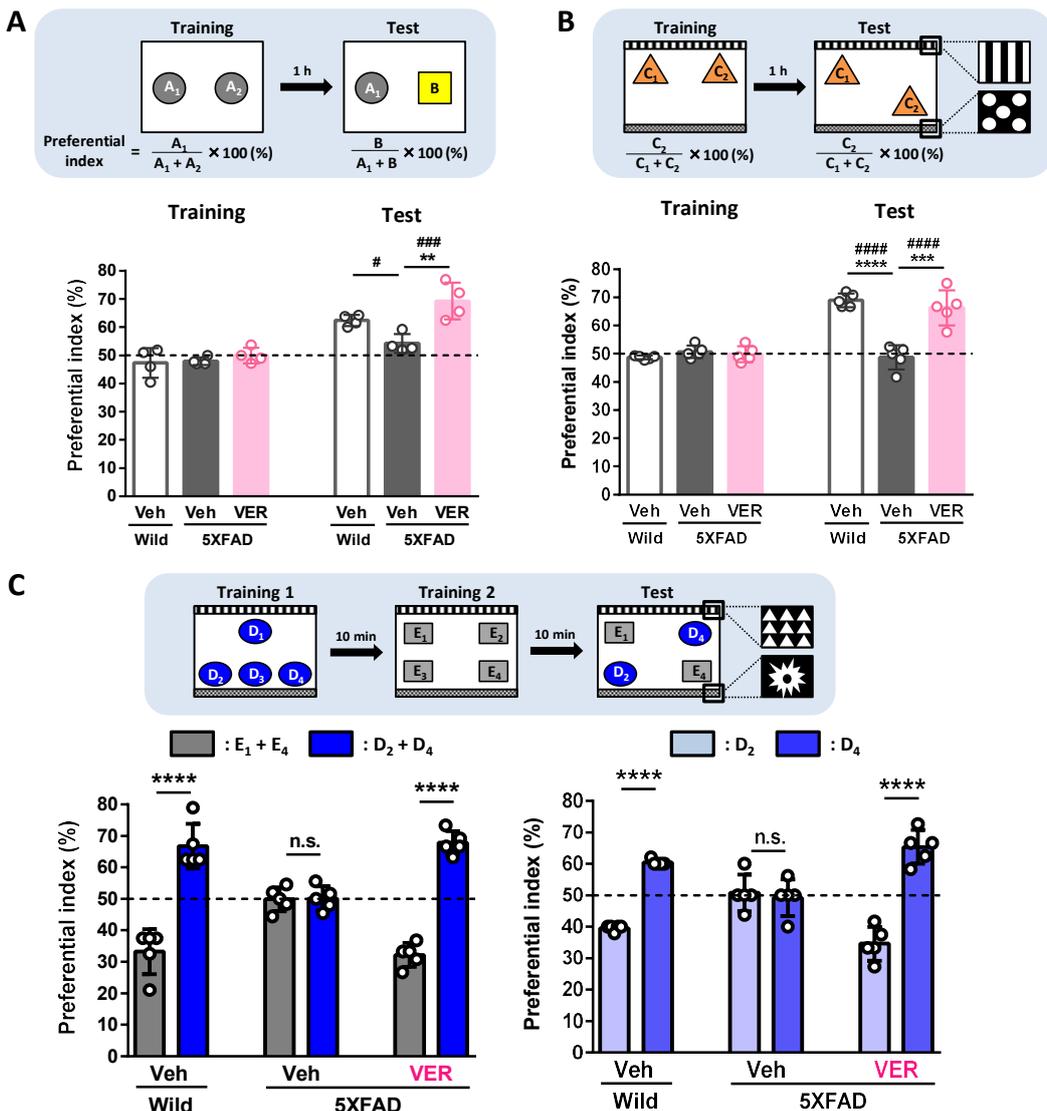
A, 3日間培養した ddY (E14) マウス初代培養神経細胞に $A\beta_{25-35}$ (10 μM) を3日間処置した。VER-155008 (0.05, 0.5, 5 μM) を4日間処置し、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。

B, 各薬物処置群において、pNF-H 陽性の軸索密度を測定した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Aβ/Veh, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, mean \pm SEM, $n = 11-22$ photos. [Yang & Tohda, 2018b より引用、一部改変]

1.3.8. HSC70 の阻害剤が 5XFAD マウスの記憶障害改善に及ぼす作用

HSC70 の特異的阻害 (VER-155008) は、 $A\beta_{25-35}$ 誘発によって萎縮した軸索を再伸長させたことから、HSC70 の特異的阻害が AD モデルマウスの記憶障害改善に及ぼす影響を検討した。

5XFAD マウス及び wild-type マウス (雌性、8-9 ヶ月齢) に溶媒または VER-155008 (10 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 18 日間連続で腹腔内投与し、投与 14 日目に物体認知記憶試験を行った (Fig. 11A)。その結果、VER-155008 投与によって 5XFAD マウスの物体認知記憶は有意に改善した。別に用意した 5XFAD マウス及び wild-type マウス (雌性、6 ヶ月齢) に溶媒または VER-155008 (10 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 15 日間連続で腹腔内投与し、投与 14 日目に空間記憶試験を行い (Fig. 11B)、投与 15 日目にエピソード記憶試験を行った (Fig. 11C)。その結果、VER-155008 投与によって 5XFAD マウスの空間記憶障害及びエピソード記憶障害はどちらも有意に改善した。Fig. 11A に用いたマウスについて、投与 18 日目に自発運動試験を行った (Fig. 11D, E)。その結果、薬物投与によるマウスの自発運動 (総移動距離、不動の時間) に群間差は認められなかった。また、薬物投与によってマウスに顕著な体重変化も見られなかった (Fig. 11F)。



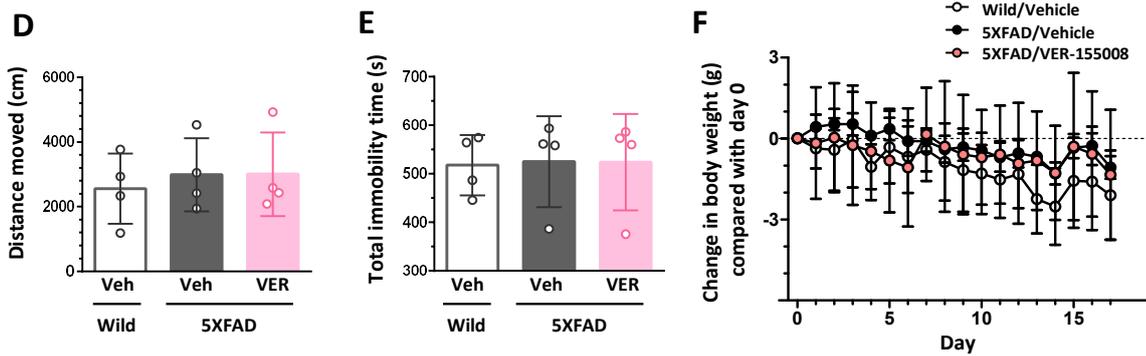


Fig. 11: 5XFAD マウスの記憶障害に対する VER-155008 の作用

A, Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、8-9 ヶ月齢）に溶媒または VER-155008 (10 $\mu\text{mol/kg/day}$)を 18 日間連続で腹腔内投与した。投与 14 日目に物体認知記憶試験を行った。Training session と Test session は各々10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。** $p < 0.01$ vs 5XFAD/Veh, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, repeated measures two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 4$ mice.

B, C, Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、6 ヶ月齢）に溶媒または VER-155008 (10 $\mu\text{mol/kg/day}$)を 15 日間連続で腹腔内投与した。投与 14 日目に空間記憶試験 (**B**) を、投与 15 日目にエピソード記憶試験 (**C**) をそれぞれ行った。**(B)** Training session と Test session は各々10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。位置を移動した物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs 5XFAD/Veh, One-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test; ### $p < 0.001$, repeated measures two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 5$ mice. **(C)** Training session 1 及び 2、Test session は各々10 分間行い、各インターバルは 10 分間に設定した。**** $p < 0.0001$, unpaired *t*-test, mean \pm SD, $n = 5$ mice.

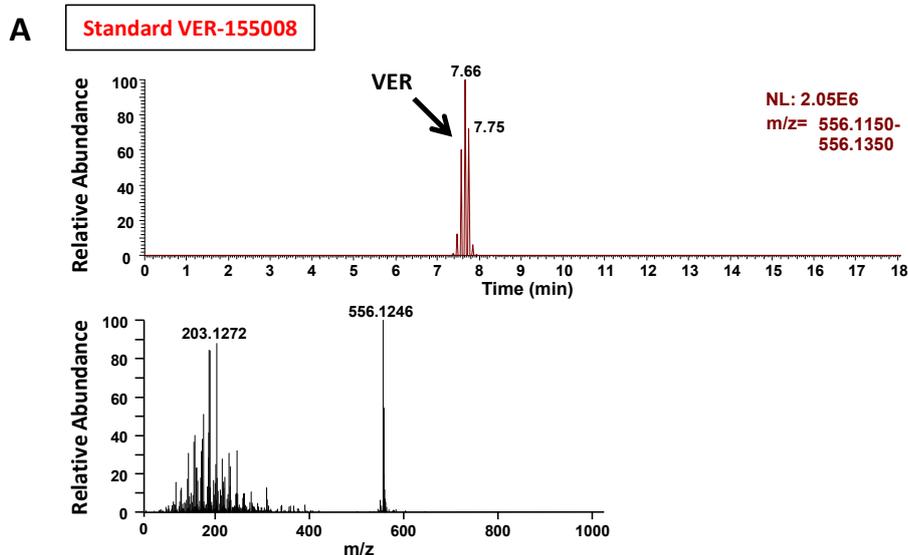
D-F, Fig. 11A のマウスにおいて、薬物投与 18 日目に自発運動試験を行った。10 分間の自由行動をさせ、総移動距離 (**D**) 及び不動時間 (**E**) それぞれを測定した。**(F)** 薬物投与期間中におけるマウスの体重推移 (day 0 と比較した増減量)。 $p > 0.05$, repeated-measures two-way ANOVA, mean \pm SD, $n = 4$ mice.

[Yang & Tohda, 2018b より引用、一部改変]

1.3.9. VER-155008 の脳移行性の検討

VER-155008 投与が 5XFAD マウスの記憶障害を改善することを示したが、VER-155008 が脳移行する薬物かどうかは不明である。そこで、5XFAD マウスに VER-155008 を単回腹腔内投与し、血漿及び大脳皮質への移行性を検討した。

まず、LC-MS/MS おいて標品 VER-155008 のイオン電流クロマトグラム (Fig. 12A、上段) および質量スペクトル (Fig. 12A、下段) を検出した。質量誤差 ± 10 mmu の高精度準分子イオン ($[M+H]^+$) ピークを抽出することにより、VER-155008 の質量スペクトル及びフラグメンテーションパターンが検出された。続いて、5XFAD マウス (雌性、9ヶ月齢) に溶媒または VER-155008 (89.9 $\mu\text{mol/kg}$) を単回腹腔内投与し、投与 5 分後における VER-155008 の血漿及び大脳皮質への移行性を検討した。LC-MS/MS の検出感度の限界から、生体試料中に移行した化合物を検出するためには、実際の薬理的投与量よりもはるかに高い投与量を用いるのが一般的である (Durairajan et al., 2012; Yang et al., 2017)。そこで、記憶試験 (Fig. 11) で用いた投与量よりも約 9 倍の 89.9 $\mu\text{mol/kg}$ VER-155008 を 5XFAD マウスに単回投与した。その結果、溶媒投与群の 5XFAD マウスでは血漿及び大脳皮質中いずれにおいても VER-155008 が検出されなかったが、VER-155008 を投与したマウスでは標品 VER-155008 と同じ retention time において、ピークが検出された (Fig. 12B)。VER-155008 の標準曲線を用いて、血漿中及び大脳皮質中に移行した VER-155008 濃度を定量したところ、それぞれ 13.97 nmol/ml 及び 3.326 nmol/g であることが算出された。以上の結果より、腹腔内投与された VER-155008 は、確かに血液脳関門を透過し、脳に移行することが示唆された。



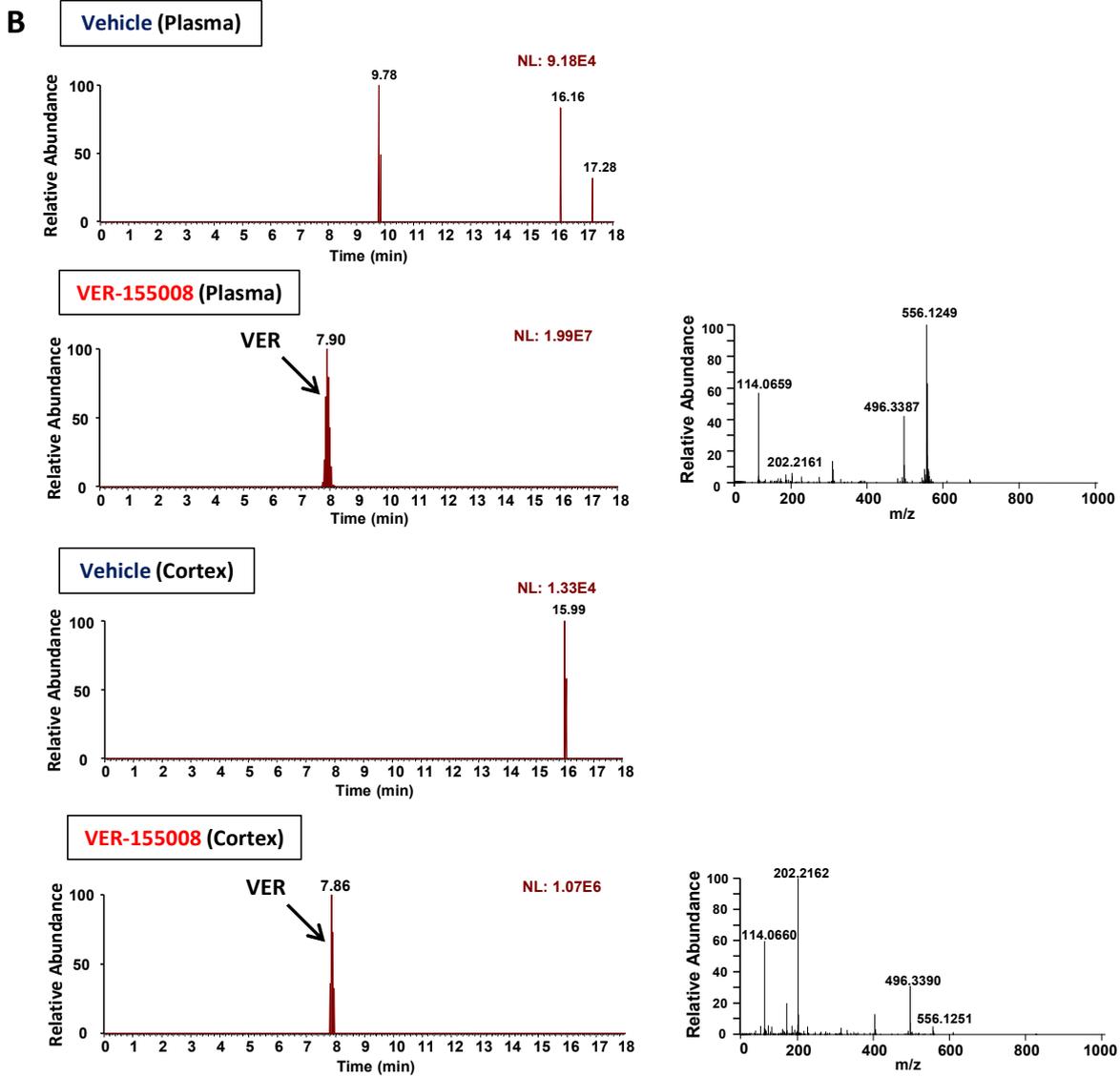


Fig. 12: VER-155008 の脳移行性の検討

A, LC-MS/MS における VER-155008 (1 $\mu\text{g/ml}$) の標準ピーク。VER-155008 ($m/z = 556.1246$) のイオン電流クロマトグラム (上段) 及び質量スペクトル (下段) を示す。

B, 5XFAD マウス (雌性, 9 ヶ月齢) に溶媒または VER-155008 (89.9 $\mu\text{mol/kg}$) を単回腹腔内投与した。薬物投与 5 分後に血漿および大脳皮質を採取した。LC-MS/MS において、イオン電流クロマトグラム及び質量スペクトルより血漿および大脳皮質中の VER-155008 の含量を測定した。

[Yang & Tohda, 2018b より引用、一部改変]

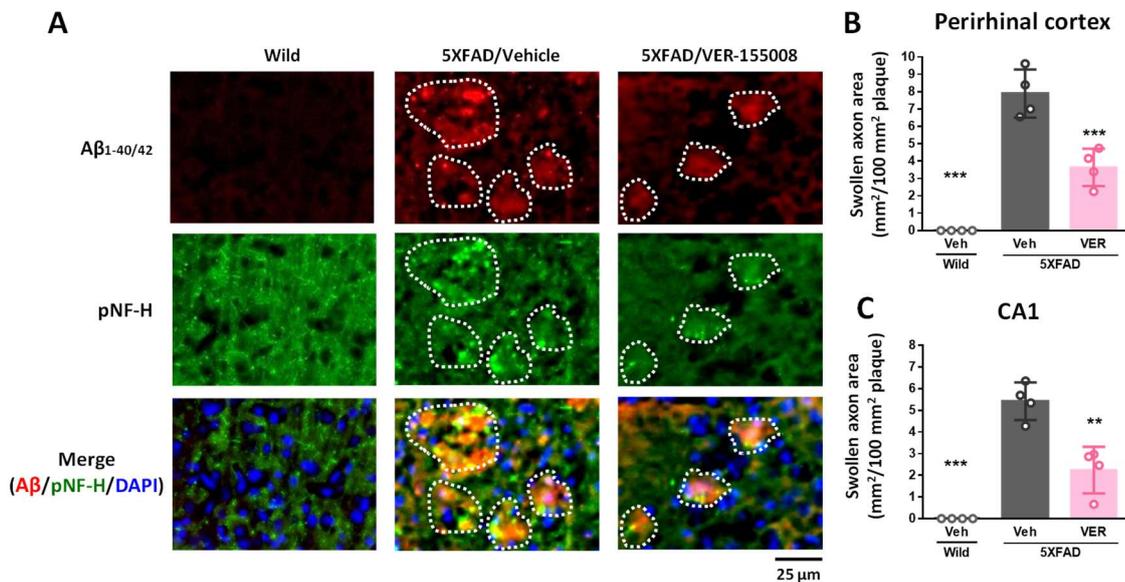
1.3.10. VER-155008 が 5XFAD マウス脳内の変性軸索及び AD 病理に及ぼす作用の検討

VER-155008 を投与した 5XFAD マウスでは、記憶障害が改善することが示された (Fig. 11)。当研究室の先行研究により、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは、脳内の A β やリン酸化タウ、変性軸索の割合が減少することが明らかとなっている (Tohda et al., 2012)。そこで、HSC70 の特異的阻害が 5XFAD マウス脳内の AD 病理及び軸索に及ぼす影響を検討するために、脳切片を用いた組織学的解析を行った。脳切片は、Fig. 11A の投与実験終了後のマウス (5XFAD マウス及び wild-type マウス、雌性、7-8 ヶ月齢) より作製した。抗 A β _{1-40/42} 抗体、抗 PHF-タウ抗体、抗 pNF-H 抗体それぞれで蛍光免疫染色を行い、特に物体認知記憶に関わる嗅周皮質 (Perirhinal cortex) 及び海馬 CA1 を観察した。

Wild-type マウスでは、アミロイドプラーク及び PHF タウの蓄積が見られなかったが、5XFAD マウスでは、アミロイドプラークの蓄積が認められた。また、当研究室の先行研究より、5XFAD マウスの脳内では、アミロイドプラーク部付近に限局して終末部が肥大化した変性軸索が見られることがわかっている。各群のマウスにおいて、アミロイドプラーク中における変性軸索の割合を算出したところ、VER-155008 投与によって嗅周皮質及び CA1 での変性軸索の割合が有意に減少することが示された (Fig. 13A-C)。嗅周皮質の一例を Fig. 13A (白点線はアミロイドプラーク領域) に示す。

次に、VER-155008 投与による AD 病理への作用を検討した。まず、5XFAD マウスの溶媒投与群と比べて VER-155008 投与群では、アミロイドプラーク陽性面積が有意に減少した (Fig. 13D-F)。嗅周皮質のアミロイドプラークの一例を Fig. 13D (白矢頭) に示す。また、アミロイドプラークと重なる場所での PHF-タウの割合を算出した。その結果、5XFAD マウスの溶媒投与群と比べて VER-155008 投与群では、アミロイドプラーク近傍での PHF タウの割合も有意に減少した。嗅周皮質の一例を Fig. 13G (白点線はアミロイドプラーク領域) に示す。

以上より、HSC70 の特異的阻害は、少なくとも物体認知記憶に関わる嗅周皮質及び海馬 CA1 において、異常に変性した軸索終末部の障害を改善し、AD の原因物質である A β 及びリン酸化タウの除去にも関与することが示された。



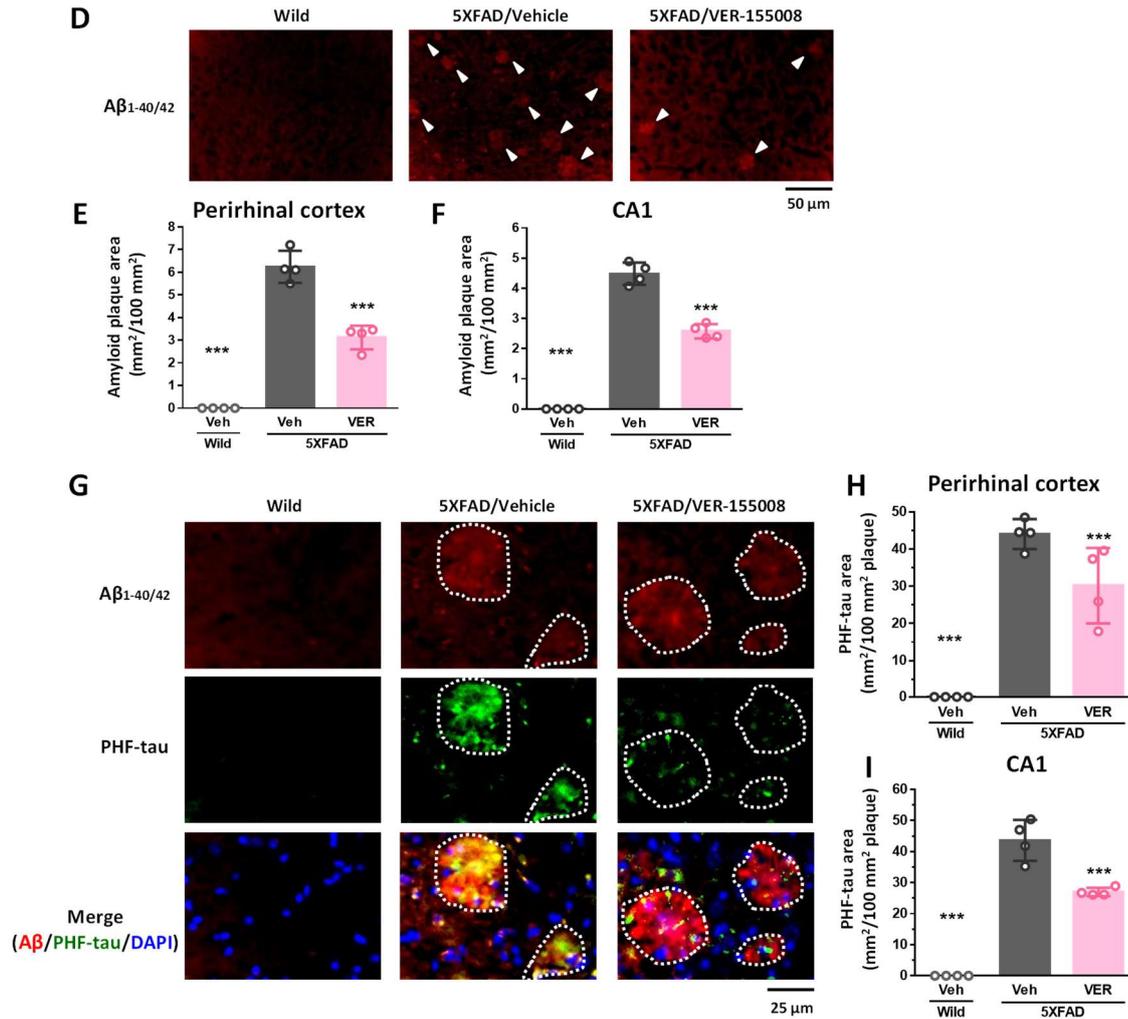


Fig. 13: VER-155008 を投与した 5XFAD マウス脳の組織学的解析

溶媒または VER-155008 (10 μmol/kg/day)を 18 日間連続で腹腔内投与した wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雌性、8-9 ヶ月齢) について、脳切片を作製し蛍光免疫染色を行った。

A-C, アミロイドプラーク (赤) 中の変性軸索 (緑) を示す (白点線はアミロイドプラーク領域)。嗅周皮質 (**B**) 及び海馬 CA1 (**C**) における変性軸索の割合。

D-F, アミロイドプラーク (白矢頭) を示す。嗅周皮質 (**E**) 及び海馬 CA1 (**F**) におけるアミロイドプラーク陽性面積。

G-I, アミロイドプラーク (赤) 中の PHF-タウ (緑) を示す (白点線はプラーク領域)。嗅周皮質 (**H**) 及び海馬 CA1 (**I**) における変性軸索の割合。

p < 0.01, *p < 0.001 vs 5XFAD/Veh, One-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's test, mean ± SD, n = 4 mice.

[Yang & Tohda, 2018b より引用、一部改変]

1.4. 考察

本章では、diosgenin による軸索再伸長及び記憶改善に関わる神経細胞中の分子を明らかにし、AD における新規治療ターゲットを探索することを目指した。その結果、AD では A β の蓄積により神経細胞中で HSC70 が増加することを示した (Fig. 4, 5)。また、神経細胞中で HSC70 と結合するクライアントタンパク質として α -tubulin を同定した (Fig. 8)。培養神経細胞への A β 処置により変性した軸索上では α -tubulin の発現が減少したこと (Fig. 9)、AD 患者の脳内においても HSC70 が増加し (Perez et al., 1991; Piedrahita et al., 2015) α -tubulin が減少すること (Zhang et al., 2015)、HSC70 がクライアントタンパク質の分解を促進する機能があることを併せ考えると、A β が HSC70 を増加させることで HSC70 による α -tubulin の分解が促進され、それが軸索萎縮や記憶障害に関わっている可能性が考えられる。また、diosgenin は HSC70 の発現を減少させることで (Fig. 4, 5)、間接的に α -tubulin の分解を抑制し (Fig. 9)、軸索萎縮の抑制に関わっている可能性を示した。さらに、神経細胞中における HSC70 の減少が軸索伸長に関わること (Fig. 7) と、HSC70 の特異的阻害剤 VER-155008 が軸索再伸長や記憶改善を引き起こすこと (Fig. 10, 11) を示したのは本研究が初めてである。先行研究では diosgenin 投与が 5XFAD マウス脳内の脳内の A β やリン酸化タウを減少させる作用を見出しているが、VER-155008 投与によっても脳内の A β やリン酸化タウが減少したこと (Fig. 13) から、diosgenin が HSC70 の減少を介して AD 病理の改善に関わる可能性が示された。

Fig. 4 の二次元電気泳動において、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスの脳内で発現が変化し、diosgenin 投与によってその変化が打ち消されたタンパク質は計 29 個検出された。その中で diosgenin 投与により顕著に発現変化した 5 タンパク質に着目し、MALDI-TOF/MS を行った結果、それぞれ HSC70、A-X actin、Gamma-actin、V-type proton ATPase catalytic subunit A、Alpha-1-globulin と同定された。それぞれのタンパク質について、AD や神経変性疾患、軸索伸長との関係を文献的に調査したところ、A-X actin や Gamma-actin を含むアクチンファミリーについては、既に AD との関連が多く報告されていたことから (Bamburg & Bernstein, 2016)、本研究での解析候補からは除外した。また、V-type proton ATPase catalytic subunit A については、AD 患者の脳において発現変化の報告がない。Alpha-1-globulin については、血中に多く含まれるタンパク質であることから、非特異的に検出された可能性があるのではないかと考えた。一方で HSC70 は、二次元電気泳動での結果に一致して、AD モデルマウスやヒト患者の脳内で発現が増加することが報告されている (Perez et al., 1991; Piedrahita et al., 2015)。また、HSC70 は正常時ではタウと結合し微小管の安定化に関わるが、AD 病態ではリン酸化タウと結合し、リン酸化タウを安定化させること (Jinwal et al., 2010)、HSC70 はニューロフィラメント (NF) -M と結合し、NF-M をユビキチンプロテアソーム系で分解すること (Wang et al., 2011) が報告されているため、AD において増加した HSC70 が軸索や記憶に対して何かしらの有害な作用をもたらしているのではないかと予想した。しかし、HSC70 の阻害が軸索及び記憶に及ぼす作用は不明であるため、本タンパク質の機能解析を行うこととした。

HSC70 (別名 HSPA8、Hsp70-8、Hsp73) は Heat shock protein (HSP) ファミリーに属する分子シャペロンの一つであり、細胞内では細胞質や核、組織では全身に分布する多機能性タンパク質である (Finka et al., 2015; Stricher et al., 2013)。主な機能として、Bag ファミリーや Hip ファミリー、CHIP 等のコシャペロンと複合体を形成し、数多くのクライアントタンパク質のフォールディングや分解を促進している (Meimaridou et al., 2009)。また、がんや細胞内の熱・酸化ストレス、紫外線、エタノール、感染等により発現誘導されることも報告されている (Liu et al., 2012)。また、HSC70 は ATP 依存的に活性が制御されており、ATP 結合時では不活性型となり、クライアントタンパク質とのアフィニティーの低さのため、結合することができない。しかし、ATPase 活性を獲得し、ADP 結合型 (活性型) に変化することでクライアントと結合できるようになる。HSC70 によるフォールディングの機序として、Hip や Bag ファミリーと共に折りたたまれていないクライアントを正しい立体構造に折りたたみ、クライアントの構造や機能を維持している (Meimaridou et al., 2009)。また、HSC70 によるクライアントの分解には 2 つの機序がある。一つは、ユビキチン化されたクライアントをとらえ、CHIP とともにユビキチンプロテアソーム系に運ぶことで、クライアントの分解を促進する。もう一つは、シャペロン介在性オートファジー (chaperon mediated autophagy; CMA) (Deffit & Blum, 2015) であり、KFERQ モチーフを持つクライアントを認識し、LAMP-2A を介して選択的にリソソームに取り込み、分解する (Cuervo, 2011)。

このように、HSC70 の結合タンパク質 (クライアント) の種類に依存して、下流で引き起こされる細胞内イベントが決定されると考えたため、A β 存在下で HSC70 との結合が増加する神経細胞中のタンパク質を探索し、その結果 α -tubulin を同定した (Fig. 8)。 α -及び β -tubulin が HSC70 と結合することは既に報告されており (Gache et al., 2005)、本研究の結果を支持する。一方で、単量体 α -tubulin の分子量は約 55 k であることから、Fig. 8 において HSC70 と共沈降された約 300 k 以上のバンドに含まれる α -tubulin は、おそらく α -tubulin 同士が重合した状態、或いはその重合体が HSC70 と結合を保った複合体なのではないかと予想している。 α -tubulin は、重合することで軸索伸長を促進する微小管骨格タンパク質である (Conde & Cáceres, 2009)。A β によって α -tubulin 陽性の微小管が破壊し、5XFAD マウスの脳においてアミロイドプラーク周囲の変性した神経突起に α -tubulin が異常に蓄積すること (Sadleir et al., 2016)、AD 患者の脳内において α -tubulin が減少すること (Zhang et al., 2015) からも、 α -tubulin が軸索伸長や記憶改善にとって重要なタンパク質であることは多々議論されている。A β 処置によって変性した軸索上では α -tubulin の発現が減少しており、diosgenin 処置によって変性軸索の割合が減少したこと (Fig. 9) から、diosgenin は HSC70 による α -tubulin の分解を抑制している可能性が考えられた。しかし、HSC70 と α -tubulin の結合後に、HSC70 が本当に α -tubulin の分解に寄与しているかどうかの確認は得られていない。前述の HSC70 によるクライアントタンパク質の分解機序の 2 つのうち、後者の CMA に関しては、HSC70 のクライアントが KFERQ モチーフをもつ必要がある。 α -tubulin には本モチーフが報告されていないため、おそらく前者のユビキチンプロテアソーム系で分解されるので

はないかと予想している。少なくとも、ユビキチン化された α -tubulin がプロテアソーム系で分解されるとの報告があるため (Ren et al., 2003)、本機序を確認することが今後の課題である。

Diosgenin が神経細胞中の HSC70 の発現を減少させたメカニズムとして、少なくとも diosgenin による 1,25D₃-MARRS の刺激を介して起こることが示された (Fig. 6)。HSC70 の転写促進因子の 1 つとして Sp1 が報告されているが、Sp1 と 1,25D₃-MARRS の関係については報告がない。Sp1 は HSC70 のクライアントとしても報告されており、HSC70 が Sp1 をフォールディングし安定化させる (Yang et al., 2014)。つまり、HSC70 の活性化は転写因子 Sp1 を増やし、それによって HSC70 自身の発現を上げるポジティブフィードバック機構が成り立つ。さらに、Sp1 は AD 患者及び AD モデルマウス脳内で発現が増加しており (Citron et al., 2015)、APP や BACE1 の転写因子としての報告もある (Santpere et al., 2006)。これらのことを踏まえると、diosgenin や VER-155008 による HSC70 の減少または活性阻害が、Sp1 の発現を減少させる可能性はあるが、本研究において Sp1 の発現変化は未検討である。また、diosgenin と同様に、VER-155008 を投与した 5XFAD マウスの脳内においても A β が減少したが、このメカニズムについても前述の機構を介して、Sp1 の減少による A β 生成抑制が関与している可能性もある。しかし、本研究では A β の蓄積がほぼプラトーに達した後の 7-8 ヶ月齢の 5XFAD マウスを用いたこと (Oakley et al., 2006)、VER-155008 投与によって脳内の A β は約 50%程度も減少したこと (Fig. 13) を踏まえると、HSC70 の阻害によって新たに生成する A β の蓄積を抑制しただけでなく、既に蓄積している A β を分解し、除去する機序が活性化されたと考える方が妥当である。今後、HSC70 阻害による A β の除去に関わる分子メカニズムを詳細に解明する必要がある。

HSC70 はがん組織での発現が高く、がん細胞の生存に関わっていることから、これまでに VER-155008 を含めた 10 種類以上の HSC70 の阻害剤 (Wan et al., 2016; Wen et al., 2014) が、抗がん剤として開発されてきた (Goloudina et al., 2012)。本研究では、HSC70 の ATP 結合ポケットに結合する VER-155008 (Schlecht et al., 2013) を用いたが、VER-155008 が培養神経細胞の軸索再伸長、5XFAD マウスの記憶障害改善、さらには 5XFAD マウス脳内における変性軸索の減少、A β 及びリン酸化タウの減少に対して有効であることを初めて証明した (Fig. 11)。また、腹腔内投与された VER-155008 が確かに脳に移行することも確認された (Fig. 12)。したがって、VER-155008 を含むこれらの HSC70 阻害剤を AD に対する新規治療薬として応用できる可能性が期待される。以上、本章の結果より、AD において HSC70 を阻害することが新規治療ターゲットになりうることを示された。

しかし、本章の考察から生まれた問いとして、diosgenin が α -tubulin の分解を“抑制する”という分子機序だけでは、diosgenin による“積極的に軸索を伸ばす”作用を説明し切れないことが挙げられる。また、HSC70 の減少または阻害が、直接軸索伸長及び軸索再伸長に寄与することは *in vitro* の初代培養神経細胞において示されたが、本当に AD 脳において軸索が長距離、かつつながるべき投射先に向かって積極的に再伸長しているかは検出できていない。さらに、本章では大脳皮質の組織を用いて機能分子の探索を行ったため、神経細胞特異的な機能分子を見落としている可能性がある。そこで第 2 章

では、トレーサーによって脳の軸索を可視化する手法を用いて、diosgenin が 5XFAD マウス脳内において方向特異的な軸索再伸長を促進するかどうか、またその際「軸索がつながる脳部位まで再伸長した神経細胞」を脳切片より 1 個 1 個単離し、それら神経細胞中で発現変化した因子を網羅的に検出することで、第 1 章よりも検出精度を高めて機能分子の探索を試みた。

1.5. 小括

本章では、diosgenin による神経細胞中での HSC70 の減少が、軸索再伸長及び記憶改善にとって重要な分子であることが示された。また、本現象には HSC70 の結合タンパク質 α -tubulin の分解が間接的に抑制されることが寄与している可能性が考えられた (Yang & Tohda, 2018a)。さらに、HSC70 の特異的阻害が軸索再伸長及び AD モデルマウスの記憶障害の改善に関わることが示され、AD 治療における新規治療ターゲットになりうることが期待される (Yang & Tohda, 2018b)。

第2章 : Diosgenin の AD 脳内における方向特異的な軸索再伸長作用とその分子機序の解明

(Yang X, Tohda C. *Molecular Psychiatry*, in press, 2023)

(Yang X, Tohda C. *Molecular Neurobiology*, 60, 1250–1266, 2023)

2.1. 緒言

第1章において、diosgenin による軸索再伸長に関わる神経細胞中の分子として、HSC70 の減少及び α -tubulin の増加を見出した。しかし、第1章の考察で述べたように、diosgenin が AD の脳内において軸索をつなげるべき投射先に方向特異的に再伸長させているかは不明である。

一般的に、脳の成熟に伴って、神経細胞中の軸索再生に関わるエネルギーが低下すること、脳における軸索誘導シグナルが減弱すること、細胞外での軸索伸長阻害因子の発現が増加すること等が、成体脳での軸索伸長・再生能を低下させる要因であると考えられている (He & Jin, 2016)。一方、成体脳及び AD モデルマウスの脳において、損傷された軸索が少なくとも近位局所には自発的に再伸長、または分枝 (sprouting) できることが報告されている (Blazquez-Llorca et al., 2017; Jin et al., 2016; Li et al., 2010b)。しかし、記憶を始めとした神経機能を回復するには、再伸長する軸索は無秩序ではなく、元々投射していた正しいターゲットに向かってのみ再伸長する必要があるが、薬物投与を含む何らかの刺激によって、脳において損傷した軸索がつなげるべき脳部位に向かって再伸長するかどうかについては検討されたことがない。

一方で、中枢神経系のうち、軸索走行の方向がシンプルである下行性伝導路 (Cheng et al., 2022) や視覚路 (Li et al., 2022; Lim et al., 2016) に関しては、軸索が方向特異的に再伸長することが動物実験で検証されており、その現象に関わる機能分子もいくつか見出されている。また、中枢神経系よりも軸索再生しやすいと考えられている末梢神経系においても、少なくとも運動神経 (Isaacman-Beck et al., 2015)、迷走神経 (Isabella et al., 2021)、坐骨神経 (Sergier et al., 2022)、感覚神経 (Cadiz Diaz et al., 2022)、嗅神経 (Browne et al., 2022) は、損傷前に投射していたターゲット部位に自発的に軸索を再伸長し、その分子機構も明らかになりつつある。したがって、記憶を制御している脳内回路に関しても、軸索再伸長刺激が加わることで、自ずとつなげるべき脳部位に軸索が再投射する機構が備わっている可能性は高いと予想されるが、脳回路は軸索走行が非常に複雑であるため、そのような現象が *in vivo* で評価されるには至っていない。少なくとも、これまでの研究において、diosgenin 投与によってマウスの行動学的所見に変化がなかったことから、diosgenin 投与によって脳で異所性に回路形成が起こっている可能性は低いのではないかと考えた。

そこで本章では、記憶形成や記憶想起に関わる (Kitamura et al., 2017; Wang et al., 2021) 海馬 (Hippocampus; HPC) から前頭前野 (Prefrontal cortex; PFC) の長距離の神経回路に着目し、diosgenin による方向特異的な軸索再伸長作用を評価した。当研究室の先行研究により、diosgenin 投与は 5XFAD マウスの脳内において、HPC 及び PFC の両方において異常に肥大化した変性軸索終末を減ら

すことがわかっている (Tohda et al., 2012) 他、正常マウスへの diosgenin 投与が HPC—PFC 間の協調的な神経発火を増加させる (Tohda et al., 2013) ことを見出していることから、本回路が軸索再伸長作用によって修復されている可能性は高いのではないかと予想した。したがって、マウスの本神経回路を逆行性トレーサーで標識し、“軸索が方向特異的に再伸長した神経細胞”を蛍光で可視化する手法を用いて解析を試みた。また、第 1 章では大脳皮質の組織を用いて機能分子の探索を行ったが、本章では、脳で“軸索が方向特異的に再伸長した神経細胞”を特異的に脳切片からレーザーマイクロダイセクションで単離し、これら神経細胞中で変化した因子を網羅的に検出することにより、検出精度を高めて機能分子を探索した。

2.2. 実験材料ならびに実験方法

倫理宣言

動物の取り扱いには富山大学動物実験指針に従った。また、本動物実験のプロトコールは、富山大学動物実験委員会及び遺伝子組換え実験委員会の承認を得ている（動物実験承認番号：A2017INM-1、遺伝子組換え実験承認番号：G2018INM-2, G2020INM-10）。

Diosgenin

In vitro の実験は第 1 章の同項に同じ。*In vivo* の投与実験では、diosgenin を日本薬局方オリーブオイル（丸石製薬、大阪）に溶解させ、0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$ で経口投与した。

マウスに対する diosgenin の投与

Diosgenin は 1 mM となるように溶解し、diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) または溶媒を 1 日 1 回 14–15 日間経口投与した。

脳軸索切断マウスの作製

ddY マウスは、Japan SLC（浜松）より購入した。ddY マウス（雌性、8 週齢）に三種混合麻酔薬をマウス体重 (g) \times 10 - 50 (μl) 腹腔内投与し、麻酔した。マウスの頭頂部の毛を剃り、頭皮に切れ込みを入れて開き、頭蓋骨を露出した後、頭部をステレオタキシス（ナリシゲ、東京、日本）に固定した。電動ドリルを用いて、頭蓋骨（両側運動野の上）に穴を開けた。ブレード（直径 0.76 mm 刺しゅう針；クローバー、大阪）を両側運動野（Bregma に対して +0.0 mm anterior-posterior; A-P, \pm 1.5 mm medial-lateral; M-L, -1.6 mm dorsal-ventral; D-V）に刺入し、そのまま +1.5 mm A-P まで平行移動させた。頭皮を滅菌済みシルクブレード縫合糸 4 号（直径 0.10–0.149 mm、ハシモト、東京）で縫合した。手術後、マウスに抗麻酔薬である 75 $\mu\text{g/ml}$ アンチセダン（日本全薬工業）を三種混合麻酔薬と同量腹腔内投与した。手術中及び手術後は、体温を維持するためにマウスをホットプレート（37°C）上に置いた。

AD モデル (5XFAD) マウス

5XFAD (Tg6799) またはその wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）を用いた。他は、第 1 章の同項に同じ。

5XFAD マウスの genotyping

第 1 章の同項に同じ。

Dextran (3000 MW) を用いた逆行性標識

マウスに三種混合麻酔薬をマウス体重 (g) × 10 - 50 (μl) 腹腔内投与し、麻酔した。マウスの頭頂部の毛を剃り、頭皮に切れ込みを入れて開き、頭蓋骨を露出した後、頭部をステレオタキシスに固定した。電動ドリルを用いて、頭蓋骨 (右側 PFC の上) に、注入針が通る程の微小の丸穴を空けた。0.5 μl の Dextran 3000 MW Texas Red (50 mg/mL in artificial cerebrospinal fluid [aCSF]; Thermo Fisher Scientific) を右側 PFC (+1.9 mm A-P, +0.3 mm M-L, -2.6 mm D-V; -2.8 mm D-V まで刺入後、-2.6 mm D-V に戻す) に 0.5 μl/min の速度で注入後、頭皮を滅菌済みシルクブレード縫合糸 4 号で縫合した。手術後、マウスに 75 μg/ml アンチセダンを三種混合麻酔薬と同量腹腔内投与した。手術中及び手術後は、体温を維持するためにマウスをホットプレート (37°C) 上に置いた。

Dextran 3000 MW Texas Red の注入より 7 日後に、前項 (マウスに対する diosgenin の投与) の通りマウスに薬物投与、または後項 (5XFAD マウスに対する AAV9 注入) の通りマウスに AAV 注入手術を施し、その後、前述と同様の要領で 0.5 μl の Dextran 3000 MW FITC (50 mg/mL になるように aCSF に溶解; Thermo Fisher Scientific) を同じ右側 PFC に注入した。Dextran 3000 MW FITC を注入する際、Dextran 3000 MW Texas Red を注入時に空けた頭蓋骨の丸穴が観察されるため、1 回目のトレーサー注入時と全く同じ部位に注入されるよう、ステレオタキシスの目盛り及び目視の両方で、注入部位を慎重に決定した。PFC において、Dextran 3000 MW Texas Red 及び FITC の 2 色の注入位置が完全に一致したマウスのみを解析に使用した。

レーザーマイクロダイセクション (LCM) 及び DNA マイクロアレイ

薬物投与後、5XFAD マウス (各群 n=3) に三種混合麻酔薬をマウス体重 (g) × 10 - 50 (μl) 腹腔内に投与し麻酔した。胸部を切開し、左心室に翼状針 (トップ) を刺入した後、右心房に切れ込みを入れ、左心室より氷冷した saline を 20 ml 灌流し、マウスの全脳を摘出した。全脳をドライアイスで 15 分間急速凍結し、アルミホイルに包んで -30°C に保存した。クリオスタット (Leica) を用いて背側 (dorsal) HPC を含む 16 μm の連続冠状切片を作製し、RNase 除去処理 (RNase Quie; ナカライテスク) された MAS-GP typeA コートスライドガラス (松浪ガラス工業、大阪) に貼り付け、LCM まで -80 °C で保存した。

LCM は PALM MicroBeam (Carl Zeiss) を用いて実施した。1 枚のスライドガラスからの神経細胞の採取は、室温で最低 1 時間以内に終わるようにした。溶媒投与群の 5XFAD マウス (n = 3) より計 660 個の naïve 神経細胞、diosgenin 投与群の 5XFAD マウス (n = 3) より計 720 個の軸索が再伸長した神経細胞をそれぞれ採取した。採取した細胞から Total RNA を抽出し (NucleoSpin RNA, MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, Germany)、T7 RNA polymerase による増幅を行った (GeneChip 3' IVT Pico Kit, Thermo Fisher Scientific)。増幅した RNA について、Mouse Clariom S Array にハイブリダイズした (GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit, Thermo Fisher Scientific)。データ解析は Transcriptome Analysis console (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

マウス胎児海馬、前頭皮質、及び小脳神経細胞の初代培養

要領は、第1章のマウス胎児大脳皮質神経細胞の初代培養に基づき、以下の内容のみ変更して行った。胎生14日齢の ddY マウスより海馬、前頭皮質（大脳皮質のうち前脳部）、及び小脳のみをそれぞれ単離し、それぞれ 1.5×10^4 cells/well となるように 8-well チャンバースライド (BD) に播種した。神経細胞の播種から 4-5 時間後に、海馬及び小脳神経細胞は、B-27 supplement を含む無血清培地 [Neurobasal media 中に 2% B-27 supplement (Life Technologies)、2 mM L-グルタミン] に、前頭皮質神経細胞は、B-27 supplement を含む無血清培地 [Neurobasal media 中に 2% B-27 supplement (Life Technologies)、2 mM L-グルタミン、0.6% グルコースを溶解] に培地を全量交換した。なお、本章における神経細胞に対する薬物処置についても、それぞれの神経細胞に対してここに示す各組成の B-27 supplement を含む無血清培地を使用した。

Amyloid beta (A β) ペプチド

第1章の同項に同じ。

AAV9 ベクター

AAV9 ベクターは、ベクタービルダー社 (Chicago, IL, USA) に構築を委託した。AAV-Control (AAV9-Syn1-Cerulean-WPRE)、AAV-SPARC (AAV9-Syn1-mSparc-IRES-Cerulean-WPRE)、AAV-Control-hM4Di (AAV9-Syn1-hM4Di-T2A-Cerulean-WPRE)、AAV-SPARC-hM4Di (AAV9-Syn1-mSparc-P2A-hM4Di-T2A-Cerulean)、AAV-Gal-1 (AAV9-Syn1-mLgals1-IRES-Cerulean-WPRE) の各配列のものを用いた。In vitro 及び in vivo の実験共に、AAV9 ベクターは PBS に溶解して使用した。

神経細胞に対する薬物処置

後述の **2. 3. 実験結果** に記載するそれぞれのタイムコースに従って、培養神経細胞に 2.5 μ M A β ₂₅₋₃₅ または A β ₃₅₋₂₅、0.1 or 1 μ M diosgenin、rabbit 抗 1,25D₃-MARRS ポリクローナル抗体（最終濃度 1:1000）(Ab099 clone) または normal rabbit IgG (Santa Cruz)、AAV-Control (5×10^5 , 10^6 , または 10^7 GC/ μ l)、AAV-SPARC (5×10^5 , 10^6 , または 10^7 GC/ μ l)、または AAV-Gal-1 (5×10^5 , 10^6 , または 10^7 GC/ μ l)、goat 抗 SPARC ポリクローナル抗体 (2 μ g/ml) または normal goat IgG (Santa Cruz; 2 μ g/ml)、recombinant Secernin-1 (rSecernin-1; 1, 10, または 100 ng/ml) (Synonym Symbols, Switzerland) を B-27 supplement を含む無血清培地に混ぜ、加えた。

神経細胞への siRNA 導入

初代培養神経細胞への siRNA 導入は Lonza 社のプロトコールに従って行った。胎生14日齢の ddY

マウス由来の海馬初代培養神経細胞 (2.5×10^5 細胞) に 30 nM SPARC siRNA (#S74217, Thermo Fisher Scientific) または 30 nM Control siRNA (Select Negative Control siRNA #1, Thermo Fisher Scientific) を 0.4 μ g GFP vector と混合し、Amaxa 4D-Nucleofector (Lonza) でトランスフェクションした。 1.5×10^4 cells/well となるように 8-well チャンバースライドに播種し、播種から 4-5 時間後に、培地を全量、B-27 supplement を含む無血清培地に交換した。

Collagen I コーディング

Poly-D-Lysine (PDL; 5 mg/ml; Sigma-Aldrich) で一晩コーディング後の 8-well チャンバースライド (BD) に、30 μ g/ml Cellmatrix I-C (和光純薬) in 10^{-3} M 塩酸 (HCl) 溶液を 1 時間、氷浴上でコーディングした。Calcium-, magnesium-free Hank's balanced salt solution (HBSS) (Life Technologies) で 2 回、Neurobasal 培地 (Thermo Fisher Scientific) で 1 回それぞれ洗浄後、初代培養海馬神経細胞を播種した。**Fig. 32B** における方向特異的な collagen I コーティングは、同様に PDL コーディングした 8-well チャンバースライド (BD) の裏面にグリッドシール (Iwaki, Japan) を貼り、グリッドの目盛を利用してマイクロピペットで Cellmatrix I-C (10^{-3} M HCl 溶液) をスライドの右側のみに部分的にコーティングした。1 時間、氷浴上でコーディングした後、HBSS (Life Technologies) で 2 回、Neurobasal 培地 (Thermo Fisher Scientific) で 1 回それぞれ洗浄し、Culture-Inserts 3 Well (Ibidi, Germany) をスライド上に置いた。初代培養海馬神経細胞を Culture-Inserts 3 Well の中央 well のみに 1.5×10^4 cells で播種し、神経細胞がスライド上に付着した後、Culture-Inserts 3 Well を取り外した。

Triple chamber neuron device での神経細胞培養、及び蛍光イメージング (Fig. 32C)

カバーガラスを dH₂O 中に浸し、30 分間超音波洗浄した後、エタノールで 1 回、dH₂O で 3 回それぞれ洗浄した。PDL (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) にカバーガラスを浸し、一晩コーディングした。その後、カバーガラスを dH₂O で 5 回洗浄し、乾燥させた。Triple chamber neuron device (Xona Microfluidics, Research Triangle Park, NC, USA) をカバーガラス上に置き、初代培養海馬神経細胞を Triple chamber neuron device の細胞体スペースに 1.0×10^5 cells で播種した。 5×10^7 GC/ μ l AAV-Control を 10 日間処置後、倒立蛍光顕微鏡 BZ-X800 (キーエンス、大阪) を用いて、Microgroove 中の Cerulean 陽性軸索をライブセルイメージングで検出した。次に、細胞体及び軸索スペースに A β_{25-35} (2.5 μ M) を 3 日間処置し、再び倒立蛍光顕微鏡 BZ-X800 で同一の軸索をライブセルイメージングした。その後、カバーガラスから Triple chamber neuron device を取り外し、カバーガラスを新たに設けた培養 dish に移した。 5×10^6 GC/ μ l AAV-Control または AAV-SPARC、及び 2 μ g/ml goat IgG 抗 SPARC 抗体 (R&D systems) または normal goat IgG (Santa Cruz) 入りの Neurobasal 培地で 7 日間処置した。

Neuron Device Chamber での神経細胞培養 (Fig. 41, 43)

カバーガラスを dH₂O 中に浸し、30 分間超音波洗浄した後、エタノールで 1 回、dH₂O で 3 回それぞれ洗浄した。PDL (5 mg/ml; Sigma-Aldrich) にカバーガラスを浸し、一晩コーティングした。その後、カバーガラスを dH₂O で 5 回洗浄し、乾燥させた。Neuron device chamber (Xona Microfluidics) をカバーガラス上に置き、初代培養海馬神経細胞を Neuron device chamber の細胞体スペースに 1.0×10^5 cells で播種した。その後、細胞体スペースに 5×10^5 GC/ μ l AAV-Control または AAV-Gal-1 入りの Neurobasal 培地でを処置し、軸索投射スペースに前項 (マウス胎児海馬、前頭皮質、及び小脳神経細胞の初代培養) の通り初代培養した前頭皮質神経細胞の培養上清 (CM) または 1 ng/mL rSecernin-1 を処置した。前頭皮質神経細胞の CM は、前頭皮質神経細胞を B-27 supplement を含む無血清培地で 6 日間培養後、B-27 supplement を含まない無血清培地でさらに 1 日培養したものの培養上清を回収し、0.22 μ m 径の Millex 濾過フィルター (Merck Millipore) を通して細胞の残骸を除いたものを使用した。7 日間培養後、カバーガラスから Neuron device chamber を静かに取り外し、蛍光免疫染色を行った。

培養細胞の蛍光免疫染色

細胞膜透過処理 (染色時に界面活性剤あり) の蛍光免疫染色については、神経細胞の培養終了後、培地を除去し PBS で洗浄した後、4% Paraformaldehyde-PBS 溶液を加えて 60 分間常温で静置し固定した。溶液を除去し、0.3% TritonX-100 (和光純薬) -PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った。一次抗体溶液 {0.3% TritonX-100-PBS 溶液、normal donkey serum (和光純薬) または normal goat serum (和光純薬)、以下いずれかの一次抗体 [goat IgG 抗 SPARC ポリクローナル抗体 (1:1000; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、rabbit IgG 抗 collagen type I ポリクローナル抗体 (1:500; Abcam)、rabbit IgG 抗 Secernin-1 ポリクローナル抗体 (1:2000; Synaptic Systems, Göttingen, Germany)、goat IgG 抗 mouse Gal-1 モノクローナル抗体 (1:100; R&D Systems)、mouse IgG₁ 抗 His-tag モノクローナル抗体 (1:200; LSBio, WA, USA)、mouse IgG₁ 抗 pNF-H モノクローナル抗体 (1:250, Convance, Princeton)、rabbit IgG 抗 microtubule-associated protein (Map) 2 ポリクローナル抗体 (1:500, Abcam)]} を 100 μ l 加え、4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除去し、0.3% TritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体液 [0.3% TritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey または goat anti-mouse IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey または goat anti-rabbit IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)] を 100 μ l 加え、遮光下、常温で 2 時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、DAPI (1 μ g/ml) (Enzo Life Science) -PBS 溶液を加え、遮光下、常温で 5 分間反応させた。その後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を行った後、Aqua Poly Mount (Polyscience) で封入した。

細胞膜非透過処理 (染色時に界面活性剤なし) の蛍光免疫染色については、神経細胞の培養終了後、培地を除去し PBS で洗浄した後、4% Paraformaldehyde-PBS 溶液を加えて 15 分間常温で静置し固定し

た。溶液を除去し、PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った。一次抗体溶液 {PBS 溶液、normal donkey serum (和光純薬) または normal goat serum (和光純薬)、以下いずれかの一次抗体 [goat IgG 抗 SPARC ポリクローナル抗体 (1:1000; R&D systems)、rabbit IgG 抗 collagen type I ポリクローナル抗体 (1:500; Abcam)、rabbit IgG 抗 Secernin-1 ポリクローナル抗体 (1:2000; Synaptic Systems)、goat IgG 抗 mouse Gal-1 モノクローナル抗体 (1:100; R&D Systems)、mouse IgG₁ 抗 His-tag モノクローナル抗体 (1:200; LSBio, WA, USA)、mouse IgG₁ 抗 pNF-H モノクローナル抗体 (1:250, Convance, Princeton)]} を 100 μ l 加え、4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除去し、PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体液 [PBS 溶液、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey または goat anti-mouse IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey または goat anti-rabbit IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)] を 100 μ l 加え、遮光下、常温で 2 時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、DAPI (1 μ g/ml) (Enzo Life Science) -PBS 溶液を加え、遮光下、常温で 5 分間反応させた。その後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を行った後、Aqua Poly Mount (Polyscience) で封入した。

培養細胞の画像解析

蛍光免疫染色後のスライド観察には、倒立蛍光顕微鏡 Cell Observer (Carl Zeiss)、Axio Vision 4.8 ソフトウェア (Carl Zeiss)、及び倒立蛍光顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス、大阪) を用いた。Fig. 41A 及び Fig. 44B の観察は、共焦点顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) を用いた。Cell Observer 及び LSM700 では一枚当たり 432.49 μ m \times 322.81 μ m または 864.98 μ m \times 645.62 μ m の大きさで、BZ-X710 では 40 \times NA 0.95、20 \times NA 0.75、または 10 \times NA 0.45 対物レンズ (CFI Plan Apo- λ , ニコンインステック、東京) を用いて画像を取得した。

神経細胞内の SPARC 及び Gal-1 の発現量及び pNF-H 陽性軸索長の測定には、画像解析ソフト MetaMorph version 7.8 (Molecular Devices) を用いて自動計測した。神経細胞体当たりの抗体陽性輝度の積算値により、細胞中の SPARC 及び Gal-1 の発現量を定量した。また、画像全体の pNF-H 陽性軸索の長さを測定し、Map2 陽性の神経細胞体の数で除することで、神経細胞当たりの軸索の長さを算出した。

siRNA 導入実験及び、軸索上における SPARC 及び Gal-1 の発現量の解析は、画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health) を用いた。siRNA 導入実験では、GFP 陽性神経細胞 1 個 1 個を ROI で囲み、各細胞中の SPARC の発現量を定量した。また、GFP 陽性神経細胞から伸びる pNF-H 陽性軸索長をトレースし、神経細胞当たりの軸索の長さを算出した。軸索上の SPARC 及び Gal-1 の定量は、画像中の全軸索をなぞり、各軸索上の SPARC 及び Gal-1 の輝度値を算出した。

Neuron device chamber 内で培養した神経細胞の pNF-H 陽性軸索長の定量は、画像解析ソフト

Neurocyte Image Analyzer ver. 1.5 (クラボウ、大阪) を用いて自動計測した。

Western blot

要領は、第1章の同項と同様に行ったが、以下の内容のみ変更して行った。

胎生 14 日齢の ddY マウスより単離した初代培養神経細胞を PBS で洗浄後、1 × Halt protease & phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) を含む M-PER (Thermo Fisher Scientific) で homogenate したものをサンプルとして用いた。また、前頭皮質及び小脳神経細胞の CM は、B-27 supplement を含む無血清培地で 6 日間培養後、B-27 supplement を含まない無血清培地でさらに 1 日培養したものの培養上清を回収し、0.22 µm 径の Millex 濾過フィルター (Merck Millipore) を通して細胞の残骸を除いたものを Amicon Ultra 3K (Merck Millipore) で濃縮し、使用した。

一次抗体液は、goat IgG 抗 SPARC ポリクローナル抗体 (1:1000; R&D systems)、mouse IgG₁ 抗 GAPDH モノクローナル抗体 (1:1,000; Applied biological materials)、rabbit IgG 抗 Secernin-1 ポリクローナル抗体 (1:2000; Synaptic Systems)、goat IgG 抗 mouse Gal-1 モノクローナル抗体 (1:100; R&D Systems)、または mouse IgG₁ 抗 β-actin 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) を含んだ Can Get Signal Solution 1 (Toyobo) とし、ラッピーバッグ (東信産業) 内で一晩、4°C で反応させた。メンブレンを 0.1% TBS で 15 分間 × 4 回リンスした後、ラッピーバッグ内で HRP 標識 donkey 抗 goat IgG 抗体 (1:2000, Santa Cruz)、HRP 標識 goat 抗 mouse IgG (1:2000, Santa Cruz)、または HRP 標識 goat 抗 rabbit IgG (1:2000, Santa Cruz) を含んだ Can Get Signal Solution 2 (Toyobo) と 2 時間、室温で反応させた。

免疫沈降法及び SDS-PAGE

Dynabeads Protein G (1.5 mg; Thermo Fisher Scientific) を 0.01% Tween-PBS で 3 回洗浄し、goat IgG 抗 mouse Gal-1 (4 µg, R&D Systems) または normal goat IgG (4 µg) と混合した。200 mM トリエタノールアミン (pH 8.9) で洗浄後、50 mM dimethyl pimelimidate (DMP) を用いて 30 分間、4°C でローテーションした。200 mM トリエタノールアミン (pH 8.9) で洗浄後、ブロッキング buffer (200 mM エタノールアミン、pH 8.9) を加え、15 分間、室温でローテーションした。これを 0.01% Tween-PBS で 3 回洗浄し、抗体と Dynabeads Protein G をクロスリンクさせた。

別に用意した初代培養海馬神経細胞 lysate (5×10^6 GC/µl AAV-Gal-1 を 7 日間処置したもの) 50 µg 分に 1.5 µg rSecernin-1 を加え、60 分間、37°C でインキュベートした。その後、クロスリンクした Dynabeads Protein G と抗体を加え、120 分間、4°C でローテーションした。0.01% Tween-PBS で 2 回洗浄し、溶出バッファー (0.1 M Glycine-HCL, pH 2.8) を加えて免疫沈降されたタンパク質を溶出した。NuPAGE LDS Sample Buffer 及び 2-mercaptoethanol を加え、95°C で 5 分間加熱した後 SDS-PAGE し、SilverQuest Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた銀染色、または上述と同様に western blot を行った。Input サンプルとして、海馬神経細胞 lysate (2 µg 分) または rSecernin-1 (1 ng 分) を同様

にローディングした。

5XFAD マウスに対する AAV9 注入

マウスに三種混合麻酔薬をマウス体重 (g) × 10 - 50 (μl) 腹腔内投与し、麻酔した。マウスの頭頂部の毛を剃り、頭皮に切れ込みを入れて開き、頭蓋骨を露出した後、頭部をステレオタキシスに固定した。電動ドリルを用いて、頭蓋骨（両側 CA1 の上）に穴を開けた。各 1×10^{10} AAV9 (PBS 溶液) を両側 CA1 (-1.9 mm A-P, +1.7 mm M-L, -1.7 mm D-V; -2.0 mm D-V まで刺入後、-1.7 mm D-V に戻す) に 1 μl/site、0.5 μL/min の速度で注入後、頭皮を滅菌済みシルクブレード縫合糸 4 号で縫合した。手術後、マウスに 75 μg/ml アンチセダンを三種混合麻酔薬と同量腹腔内投与した。手術中及び手術後は、体温を維持するためにマウスをホットプレート (37°C) 上に置いた。

DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs) 実験

5XFAD マウスに対する AAV9 注入で述べた両側 CA1 への AAV 注入実験と同時に、小脳上の頭蓋骨に 2 ヶ所の浅い穴を開け、脳実質に貫通しないようにしながら、アンカースクリュー (1.6 mm 深; Bio Research Center, Nagoya, Japan) を静かに留置した。また、電動ドリルを用いて、PFC の上の頭蓋骨を開き、ガイドカニューレ (micro slim A-I, ID: 0.4 mm, OD: 0.5 mm DV: 2.5 mm; Eicom、京都) を両側 PFC の中心 (+2.0 mm A-P, +0.0 mm M-L, -2.5 mm D-V) に留置した。その際、脳内出血を防ぐために、まずは留置部よりもわずかに lateral 部にガイドカニューレを挿入し、ステレオタキシスを用いて +0.0 mm M-L まで水平移動させた後、留置した。デンタルセメント (ユニファスト III; GC、東京) を用いてガイドカニューレ及び頭蓋骨を固定し、行動実験までの間はダミーカニューレ (Eicom) を充填した。

手術より 21 日及び 23 日後の物体認知試験時に、Training session 終了後直ちにマウスをイソフルランで浅く麻酔し、インジェクションカニューレ (Eicom) を用いて 0.3 μl の生理食塩水または 0.3 μl の 1mM clozapine-N-oxide (CNO; Cayman Chemical, MI, USA) を 0.5 μl/min で PFC に注入した。全マウスについて、覚醒することを確認後、物体認知記憶試験の Test session を行った。

5XFAD マウスの行動試験

第 1 章の同項に同じ。

BDA を用いた順行性標識

要領は、第 2 章の **Dextran (3000 MW) を用いた逆行性標識**と同様に行ったが、以下の内容のみ変更して行った。前項 (**マウスに対する diosgenin の投与**) の通りマウスに薬物投与した後、10% BDA (in PBS, Thermo Fisher Scientific) をマウスの右側 CA1 (-1.9 mm A-P, +1.7 mm M-L, -1.7 mm D-V) に 0.5 μl、

0.5 μ l/min の速度で注入した。BDA 注入より 7 日後に、マウスの脳を摘出した。

脳組織切片の作製

薬物投与後、三種混合麻酔薬をマウス体重 (g) \times 10 - 50 (μ l) 腹腔内に投与し麻酔した。胸部を切開し、左心室に翼状針 (トップ) を刺入した後、右心房に切れ込みを入れ、左心室より氷冷した saline を 20 ml 灌流し、マウスの全脳を摘出した。全脳をドライアイスで 15 分間急速凍結し、アルミホルに包んで -30°C に保存した。クリオスタット (Leica) を用いて背側 (dorsal) HPC を含む 20 μ m の連続冠状切片を作製し、MAS-GP typeA コートスライドガラス (松浪ガラス工業) に貼り付け、蛍光免疫染色までは -30°C で保存した。

脳組織切片の蛍光免疫染色

脳切片を常温に戻した後、透明マニキュアでスライドガラスの周囲を囲み、4% Paraformaldehyde-PBS 溶液を加え、60 分間常温で静置し、固定した。溶液を除去し、0.5% TritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った。一次抗体溶液 {0.5% TritonX-100-PBS 溶液、normal donkey serum (和光純薬) または normal goat serum (和光純薬)、以下いずれかの一次抗体 [mouse IgG₁ 抗 GFAP モノクローナル抗体 (1:1000, Sigma-Aldrich), chicken IgY 抗 NF-H ポリクローナル抗体 (1:1000, Merck Millipore)、goat IgG 抗 SPARC ポリクローナル抗体 (1:1000; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、rabbit IgG 抗 collagen type I ポリクローナル抗体 (1:500; Abcam)、rabbit IgG 抗 Secernin-1 ポリクローナル抗体 (1:2000; Synaptic Systems)、goat IgG 抗 mouse Gal-1 モノクローナル抗体 (1:100; R&D Systems)、mouse IgG₁ 抗 pNF-H モノクローナル抗体 (1:250, Convance, Princeton)、rabbit IgG 抗 NeuN ポリクローナル抗体 (1:500, Abcam)、goat IgG 抗 Synaptophysin ポリクローナル抗体 (1:200, Frontier Institute、長野)、rabbit IgG 抗 PSD95 ポリクローナル抗体 (1:200, Frontier Institute)]} を 100 μ l 加え、 4°C で一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除去し、0.3% TritonX-100-PBS 溶液で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体液 [0.3% TritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey または goat anti-mouse IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey または goat anti-rabbit IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)、Alexa Fluor 488, 594, または 647 標識 donkey anti-goat IgG 抗体 Plus (1:800, Life Technologies)] を 100 μ l 加え、遮光下、常温で 2 時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を 2 回行った後、DAPI (1 μ g/ml) (Enzo Life Science) -PBS 溶液を加え、遮光下、常温で 5 分間反応させた。その後、溶液を除去し、PBS で 5 分間の洗浄を行った後、Aqua Poly Mount (Polyscience) で封入した。

脳組織切片の画像解析

脳切片のそれぞれの部位 [PFC、CA1 及び CA3] について、倒立蛍光顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス)

を用いて、40×NA 0.95、20×NA 0.75、または10×NA 0.45対物レンズ（CFI Plan Apo-λ）で画像を取得した。

軸索切断マウスの切断領域中における軸索密度の定量は、画像解析ソフト Image J (Natural Institutes of Health) を用いた。大脳皮質の第 I-IV 層における GFAP 陽性のグリア瘢痕を囲み、グリア瘢痕中における全 NF-H 陽性軸索をなぞった。各画像について、軸索長 (μm) をグリア瘢痕の面積 (μm²) で割り、瘢痕領域内の軸索密度 (μm/μm²) を算出した。マウス 1 匹につき 3–6 枚の脳切片を定量後、その平均値を各マウスの値とし、解析に用いた。本定量は盲検法で行った。

Wild-type 及び 5XFAD マウス脳内における軸索再伸長（2 色の逆行性標識による）を評価するために、Dextran 3000 MW 陽性の神経細胞数を MetaMorph version 7.8 (Molecular Devices) を用いて自動解析した。背側 CA1 及び CA3 (-2.06–1.82 mm A-P) を囲み、それぞれの領域における NeuN 及び DAPI 陽性でかつトレーサーの蛍光が重なっている細胞数を測定した。マウス 1 匹につき 3–8 枚の脳切片を定量後、その平均値を各マウスの値とし、解析に用いた。

NeuN 陽性神経細胞中における SPARC の発現量は、MetaMorph version 7.8 (Molecular Devices) を用いて自動解析した。背側 CA1 を囲み、それぞれの領域における NeuN 陽性神経細胞中の SPARC の輝度値を定量した。マウス 1 匹につき 3 枚の脳切片における全 NeuN 神経細胞中の SPARC の発現量を定量し、1 神経細胞あたりの SPARC の発現量の平均値を各マウスの値とし、解析に用いた。

PFC における NeuN 陽性神経細胞と重なる Cerulean 陽性軸索、Synaptophysin 陽性前シナプス、及び PSD95 陽性後シナプスの 3 色の共局在面積の定量は、Image J (Natural Institutes of Health) を用いた。マウス 1 匹あたり、PFC での NeuN 陽性神経細胞を 30 個囲み（3 枚の脳切片より）、その中のシナプス密度の平均値を各マウスの値とした。

PFC における BDA 陽性軸索密度の定量は、Image J (Natural Institutes of Health) を用いた。マウス 1 匹あたり、3 枚の PFC 切片それぞれにおける全 BDA 陽性軸索の密度を算出し、1 マウスあたりの平均値を求めた。また、全 BDA 陽性軸索のうち、SPARC 及び Gal-1 陽性または陰性の BDA 軸索数 (%) をそれぞれ算出した。

データ解析

データは平均値 ± 標準誤差 (SEM) または ± 標準誤差 (SD) で表した。有意差検定には、Prism 6.07 (Graph Pad software, Sun Diego, CA, USA) を用い、two-tailed unpaired *t*-test、One-way analysis of variance (ANOVA) *post hoc* Bonferroni test または Dunnett's test、repeated measures Two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test を行った。有意水準は 5%とした。

2.3. 実験結果

2.3.1. 脳の切断された軸索に対する diosgenin の軸索再伸長作用の検討

Diosgenin が *in vivo* の成体脳において、軸索を再伸長させるかどうかを検討するために、まず物理的に軸索を切断したマウスを用いて評価した。

ddY マウス（雌性、8 週齢）に対し、大脳皮質運動野の軸索をブレードで切断した。軸索切断 1 時間後には、切断部において neurofilament-H (NF-H) 陽性軸索が脱落していた (Fig. 14A)。このマウスに対し、軸索切断より 7 日後より、溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$) を 15 日間連続で経口投与した。軸索を切断した大脳皮質 I-IV 層において、GFAP (グリア瘢痕) 陽性切断領域中の軸索密度を定量した。その結果、diosgenin 投与により切断部での軸索密度が有意に高まった (Fig. 14B)。一方、GFAP 陽性切断領域には群間に差がなかった (Fig. 14B)。よって、diosgenin は成体脳において、切断された軸索を再伸長させることが示された。

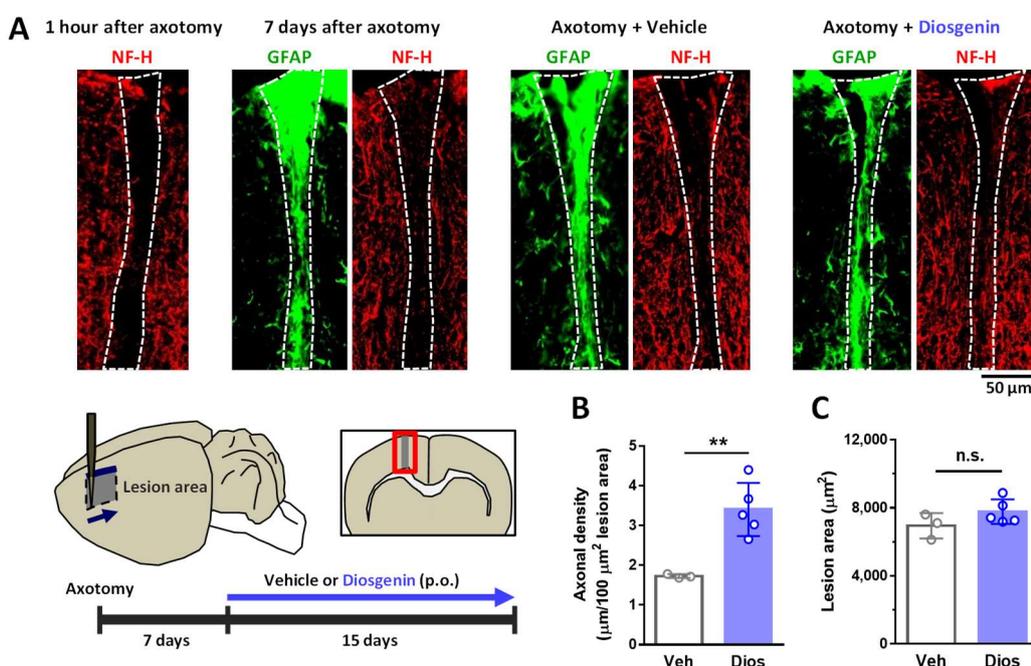


Fig. 14: 軸索切断マウスに対する diosgenin の軸索再伸長作用

大脳皮質軸索切断 ddY マウス（雌性、8 週齢）に対し、溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$) を 15 日間経口投与した。蛍光免疫染色により、NF-H 陽性軸索 (赤) 及び GFAP 陽性グリア瘢痕 (緑) を検出した。軸索切断部における軸索密度 ($\mu\text{m}/100\mu\text{m}^2$ 切断領域) (B) 及び切断面積 (C) を定量した。

** $p < 0.01$, two-tailed unpaired *t*-test, mean \pm SD, vehicle (Veh), $n = 3$; diosgenin (Dios), $n = 5$ mice. [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.2. 逆行性トレーサーを用いた海馬—前頭前野の神経回路標識

Diosgenin が 5XFAD マウス脳内の萎縮した軸索を長距離かつつながるべき脳部位に再伸長させるかを検討するために、まず 2 色の逆行性トレーサーを用いて脳の神経回路を標識する基礎検討を行った。

2.1. 緒言で述べた通り、記憶形成や記憶想起に関わる海馬 (HPC) から前頭前野 (PFC) に軸索投射する神経回路に着目した。腹側 (ventral; v) HPC ではなく、背側 (dorsal; d) HPC から PFC への神経回路がワーキングメモリに関与していることと (Izaki et al., 2008) や、dHPC—PFC の軸索投射数は vHPC—PFC の軸索投射数よりも多いこと (Ährlund-Richter et al., 2019) が報告されていることから、本研究では dHPC—PFC における軸索投射を評価した。

一度萎縮した軸索が薬物投与によって再伸長する現象を明確に検出するために、以下の手法を取った。まず薬物投与前に逆行性トレーサー Dextran (3000 MW) Texas Red (赤) を右側 PFC に注入し、元々 PFC に軸索投射していた右側 HPC 神経細胞を標識する。続く薬物投与後に、先の注入部位と全く同じ右側 PFC に 2 色目の逆行性トレーサー Dextran (3000 MW) FITC (緑) を注入する。つまり、薬物投与期間中に軸索が萎縮した神経細胞は赤のみ、元々萎縮していたにもかかわらず薬物投与によって軸索が再伸長した神経細胞は緑のみ、薬物投与によって軸索が萎縮も伸長もしなかった神経細胞は赤及び緑の 2 色で標識されることになる (**Fig. 15A**)。

まず神経回路が正常な ddY マウス (雌性、8 週齢) に対し、本オペを施したところ (薬物投与なし)、トレーサーを注入した PFC 部位において、2 色のトレーサーが完全に重なった (**Fig. 15B**)。また、これら 2 色の逆行性トレーサーは、ほとんど全ての HPC 神経細胞に等しく広がっていた (**Fig. 15C**)。

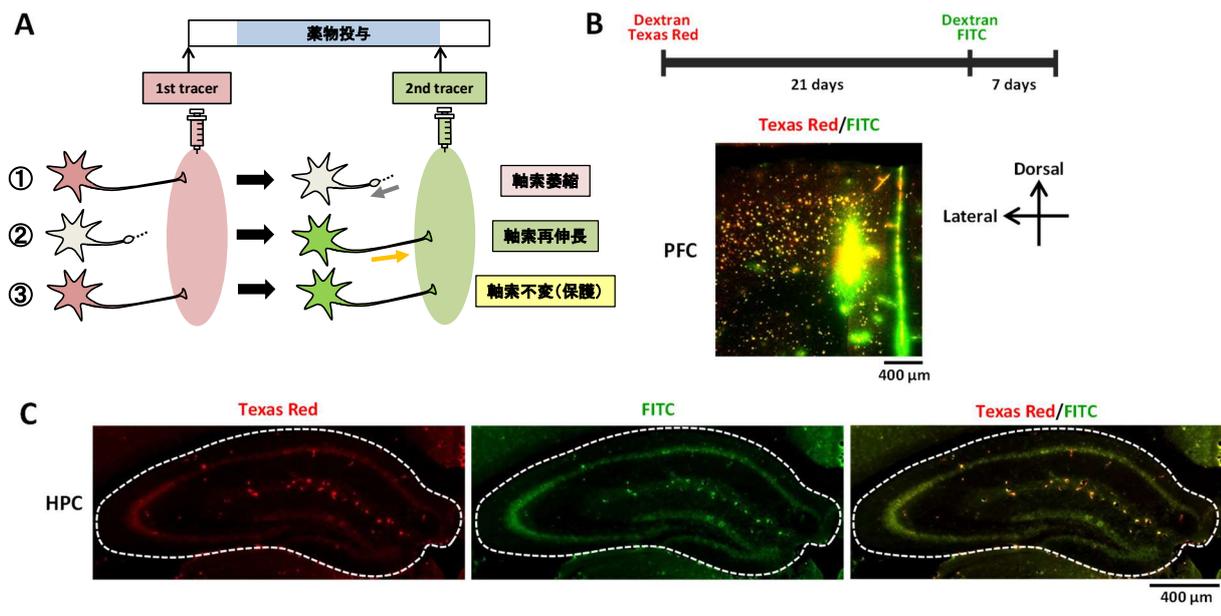


Fig. 15: 2色の逆行性トレーサーを用いた脳神経回路の標識

A, ①軸索萎縮、②軸索再伸長、③軸索不変それぞれの神経細胞を2色（赤、緑）の逆行性トレーサーによって検出するイメージ図。

B, C, 正常 ddY マウス（雌性、8 週齢）の右側 PFC に Dextran Texas Red を注入し、その 21 日後に Dextran FITC を PFC の同部位に注入した。**(B)** PFC（注入部位）における 2 色の逆行性トレーサーの重なりを示す。**(C)** 2 色の逆行性トレーサーで標識される右側 HPC 神経細胞は重なっている。

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

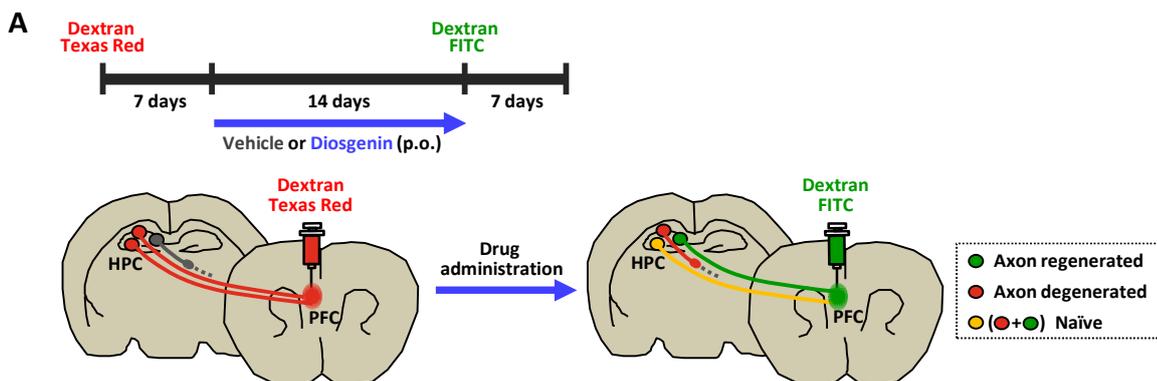
2.3.3. Diosgenin による 5XFAD マウス海馬—前頭前野における軸索再伸長作用の検討

Diosgenin が 5XFAD マウスの HPC—PFC において、萎縮した軸索をつながるべき脳部位に再伸長させるかどうかを検討するための 2 色の逆行性トレーサーを用いた標識実験を行った。

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）に対し、薬物投与前に逆行性トレーサー Dextran (3000 MW) Texas Red（赤）を右側 PFC に注入した。続いて溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 14 日間連続で経口投与し、右側 PFC 部位に 2 色目の逆行性トレーサー Dextran (3000 MW) FITC（緑）を注入した（Fig. 16A）。その 7 日後に脳を摘出し、dHPC を含む脳切片を抗 NeuN 抗体及び DAPI で蛍光免疫染色し、CA1 及び CA3 における NeuN 陽性、かつ DAPI 陽性の逆行性トレーサー陽性神経細胞数をそれぞれ定量した（Fig. 16B, C）。

CA1—PFC において、軸索が再伸長した神経細胞（Texas Red 陰性かつ FITC 陽性）数は、diosgenin 投与により有意に増加することが示された（Fig. 17A）。また、薬物投与期間中に軸索が萎縮した神経細胞（Texas Red 陽性かつ FITC 陰性）数は、wild-type と比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群で有意に増加したが、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは有意に減少し（Fig. 17B）、diosgenin による軸索萎縮の抑制作用が示された。軸索が萎縮も伸長もしなかった naïve 神経細胞（Texas Red 陽性かつ FITC 陽性）数は、5XFAD マウスの溶媒投与群と比べて diosgenin 投与群で増加する傾向を示した（Fig. 17C）。また、5XFAD マウスの溶媒投与群と diosgenin 投与群間では、元々 PFC に軸索投射する神経細胞（全 Texas Red 陽性）数に差がないものの、両群とも wild-type マウスと比べると有意に低かったことから（Fig. 17D）、薬物投与前の段階において、5XFAD マウスの両群では wild-type マウスと比べて同程度の軸索萎縮が起こっていたものと考えられる。薬物投与後に CA1—PFC において軸索投射していた神経細胞（全 FITC 陽性）数は、diosgenin を投与した 5XFAD マウスで wild-type マウスと同程度にまで有意に増加したことから、diosgenin 投与によって 5XFAD マウスでは wild-type マウスに匹敵するほどの軸索投射が起きていることが示唆された（Fig. 17E）。一方、各群における NeuN 陽性神経細胞数及び DAPI 陽性細胞数に差はなかった（Fig. 17F, G）。

CA3—PFC においても、diosgenin 投与によって CA1—PFC の場合と同様の結果が示された（Fig. 18）。以上より、diosgenin 投与によって 5XFAD マウスの HPC—PFC では、一度萎縮した軸索が長距離、かつつながるべき脳部位に向かって再伸長することが示された。



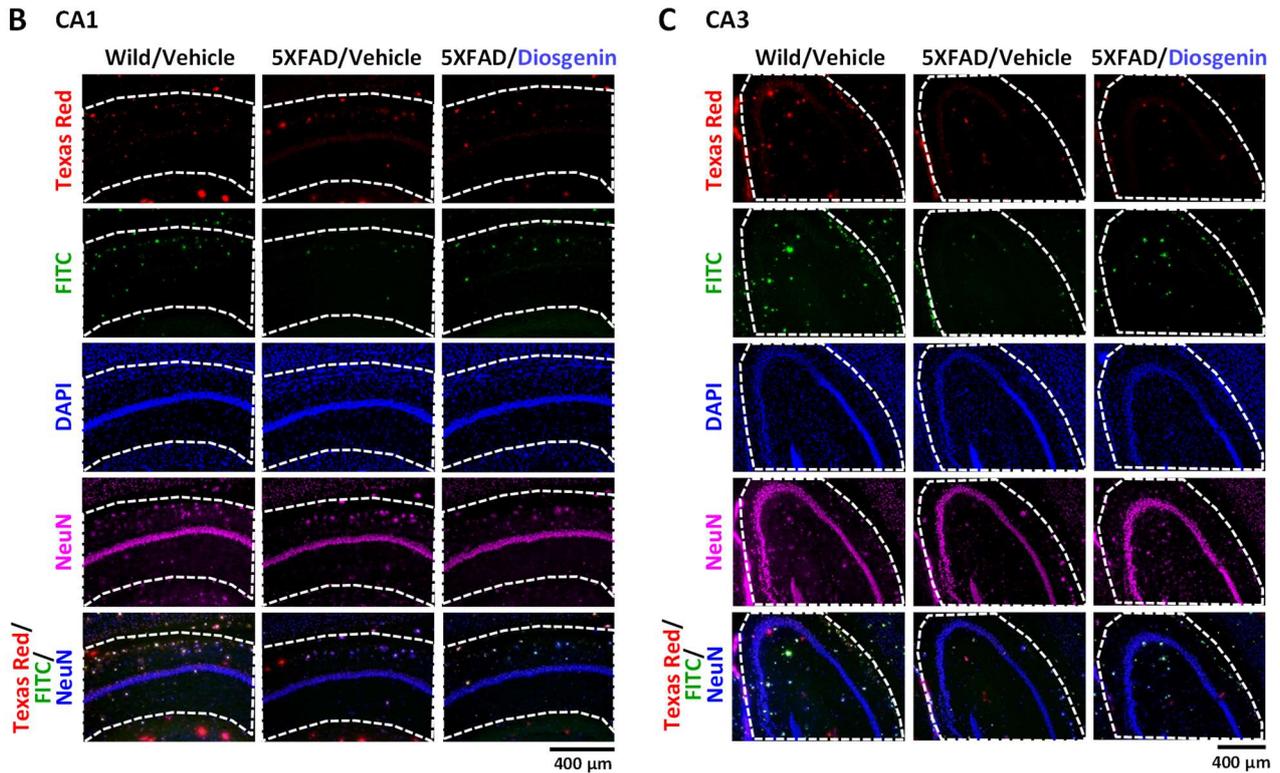


Fig. 16: Diosgenin の 5XFAD マウス HPC—PFC における方向特異的な軸索再伸長作用

A–C, 5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）の右側 PFC に Dextran Texas Red を注入した。その 7 日後より溶媒または diosgenin (0.1 μmol/kg/day) を 14 日間経口投与し、Dextran FITC を PFC の同部位に注入した。その 7 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 NeuN 抗体及び DAPI による蛍光免疫染色を行った。各群の右側 CA1 (B) 及び右側 CA3 (C) における逆行性トレーサー (Texas Red 及び FITC) 及び DAPI、NeuN の染色像を示す。各定量グラフは、**Fig. 17** (CA1) 及び **Fig. 18** (CA3) に示す。[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

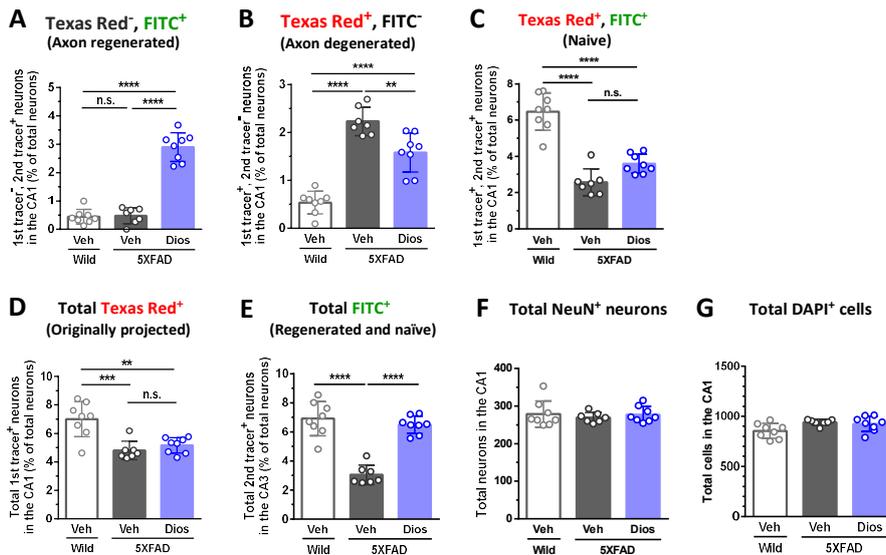


Fig. 17: Diosgenin 投与が 5XFAD マウスの CA1—PFC 神経回路に及ぼす作用

Fig. 16B の定量グラフ。(A) Texas Red 陰性かつ FITC 陽性、(B) Texas Red 陽性かつ FITC 陰性、(C) Texas Red 陽性かつ FITC 陽性、(D) 全 Texas Red 陽性、及び (E) 全 FITC 陽性の神経細胞数、(F) NeuN 陽性の全神経細胞数、(G) DAPI 陽性細胞数。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, wild-type mice (Wild)/vehicle (Veh), $n = 8$; 5XFAD mice (5XFAD)/Veh, $n = 7$; 5XFAD/diosgenin (Dios), $n = 8$ mice. [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

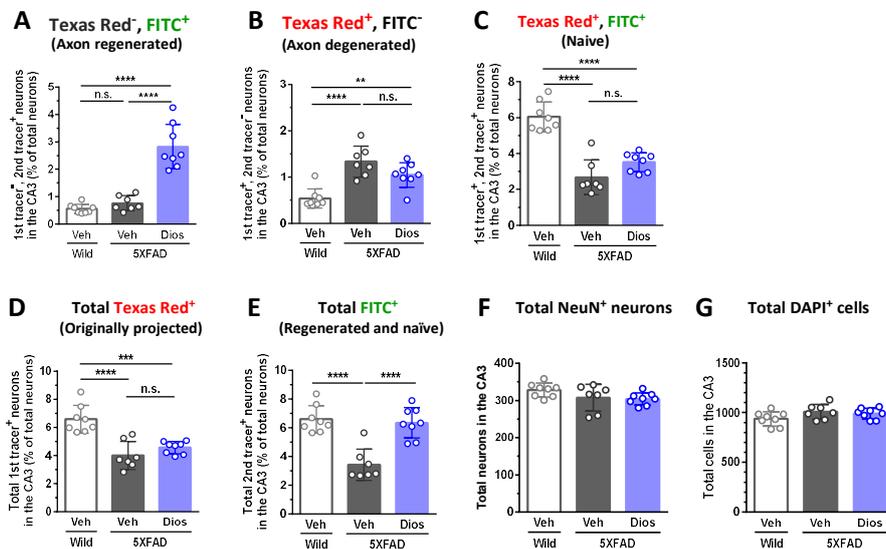


Fig. 18: Diosgenin 投与が 5XFAD マウスの CA3—PFC 神経回路に及ぼす作用

Fig. 16C の定量グラフ。(A) Texas Red 陰性かつ FITC 陽性、(B) Texas Red 陽性かつ FITC 陰性、(C) Texas Red 陽性かつ FITC 陽性、(D) 全 Texas Red 陽性、及び (E) 全 FITC 陽性の神経細胞数、(F) 全 FITC 陽性神経細胞数、(G) NeuN 陽性全神経細胞数、(G) DAPI 陽性細胞数。** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, wild-type mice (Wild)/vehicle (Veh), $n = 8$; 5XFAD mice (5XFAD)/Veh, $n = 7$; 5XFAD/diosgenin (Dios), $n = 8$ mice. [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.4. 海馬一前頭前野において方向特異的な軸索再伸長に関わる候補分子の網羅的探索

Diosgenin 投与によって 5XFAD マウスの脳において軸索がつながるべきターゲットに再伸長したことから、軸索が正しくつながった神経細胞と軸索が変化しなかった神経細胞中で変化した因子を網羅的に比較することで、方向特異的な軸索再伸長に寄与する機能分子を探索した。

5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の右側 PFC に逆行性トレーサー Dextran (3000 MW) Texas Red を注入後、溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 14 日間連続で経口投与した。続いて、右側 PFC に Dextran (3000 MW) FITC を注入し、脳切片を作製した。右側 HPC において、軸索が伸長しなかった naïve 神経細胞 (Texas Red 陽性、FITC 陽性) を溶媒投与群より 660 個 ($n = 3$ mice)、軸索が再伸長した神経細胞 (Texas Red 陰性、FITC 陽性) を diosgenin 投与群より 720 個 ($n = 3$ mice)、レーザーマイクロダイセクション (LCM) 法で脳切片より採取した。それぞれの神経細胞プールより total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を行った (Fig. 19A)。

一定量以上の発現があり ($\text{Avg}(\log_2) > 8$)、かつ群間での発現量変化が 5 倍以上を示した遺伝子について、*in vivo* トランスクリプトーム解析を行った。Transcriptome analysis console (TAC) 解析より、階層クラスタリング (Fig. 19B) と散布図 (Fig. 19C) を作成した。その結果、これら 2 種類の神経細胞における遺伝子発現パターンは、顕著に異なっていることが示された。また、軸索が伸長しなかった神経細胞と比べて軸索が再伸長した神経細胞では、計 67 の遺伝子が 5 倍以上に発現増加または減少していた (Table 3)。この中で、軸索が再伸長した神経細胞中で発現量が顕著に増加した因子として、SPARC (Secreted protein acidic rich in cysteine) 及び Galectin-1 (lectin, galactose binding soluble 1、遺伝子名: *Lgals1*) に着目した (Fig. 19C)。

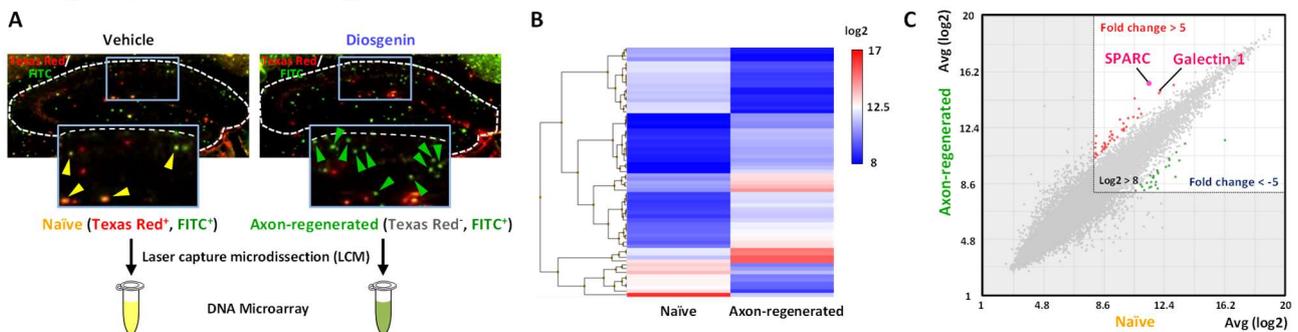


Fig. 19: 軸索が再伸長した神経細胞を用いた *in vivo* トランスクリプトーム解析

A, 軸索が伸長しなかった naïve 神経細胞 (Texas Red 陽性、FITC 陽性) 及び diosgenin 投与によって軸索が再伸長した神経細胞 (Texas Red 陰性、FITC 陽性) をレーザーマイクロダイセクション (LCM) により 1 個 1 個単離した。神経細胞の各プールから total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイを行った。B, C, Transcriptome analysis console (TAC) を用いて、naïve 神経細胞と軸索が再伸長した神経細胞間の遺伝子発現プロファイルを階層クラスタリング (B) および散布図 (C) で比較した ($\text{Avg}(\log_2) > 8$, fold change > 5)。軸索が再伸長した神経細胞では、SPARC 及び Galectin-1 の発現量が顕著に高かった。

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

Table 3: 軸索が再伸長した神経細胞中で発現量が5倍以上変化した（かつ Avg (log2) > 8）遺伝子一覧

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

NO.	Axon-regenerated Avg (log2)	Naïve Avg (log2)	Fold Change	Gene Symbol	Description
1	15.44	11.44	15.95	Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein
2	14.4	10.54	14.53	Klk6	kallikrein related-peptidase 6
3	11.85	8.08	13.64	Mia	melanoma inhibitory activity
4	12.98	9.6	10.38	Ermard	ER membrane associated RNA degradation
5	11.34	8.06	9.73	Psm10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10
6	12.13	9.01	8.71	Tgm1	transglutaminase 1, K polypeptide
7	11.05	8.03	8.12	Spp1	secreted phosphoprotein 1
8	13.05	10.12	7.6	Arpc1b	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B
9	12.71	9.8	7.49	Gm3435	predicted gene 3435
10	13.7	10.8	7.47	Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
11	11.95	9.08	7.32	Sv2a	synaptic vesicle glycoprotein 2 a
12	11.78	8.93	7.23	Fam183b	family with sequence similarity 183, member B
13	14.9	12.14	6.79	Lgals1	lectin, galactose binding, soluble 1
14	11.37	8.61	6.77	Bst2	bone marrow stromal cell antigen 2
15	11.9	9.14	6.77	Stxbp6	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
16	14.77	12.05	6.59	9030025P20Rik	RIKEN cDNA 9030025P20 gene
17	13.15	10.45	6.52	Pmp22	peripheral myelin protein 22
18	11.1	8.46	6.23	Mrp127	mitochondrial ribosomal protein L27
19	10.67	8.05	6.14	Mlh1	mutL homolog 1 (E. coli)
20	11.26	8.66	6.08	Med7	mediator complex subunit 7
21	11.68	9.11	5.91	Sdhb	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)
22	11.53	8.97	5.9	Ntng1	netrin G1
23	10.6	8.08	5.76	Sycp1	synaptonemal complex protein 1
24	12.36	9.84	5.73	Polr2e	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E
25	12.26	9.74	5.71	Ccnc	cyclin C
26	11.13	8.65	5.57	Plekha1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
27	12.46	10.02	5.42	Susd4	sushi domain containing 4
28	11.28	8.86	5.37	Zfand2a	zinc finger, AN1-type domain 2A
29	13.36	10.94	5.36	0610009B22Rik	RIKEN cDNA 0610009B22 gene
30	10.94	8.54	5.28	Rab33b	RAB33B, member RAS oncogene family
31	12.21	9.83	5.21	Psm1	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1
32	11.09	8.72	5.17	Pbk	PDZ binding kinase
33	13.08	10.72	5.14	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III
34	10.8	8.44	5.12	Nipsnap3b	nipsnap homolog 3B (C. elegans)
35	10.96	8.61	5.11	Gng8	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8
36	10.39	8.03	5.11	Nudt22	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 22
37	11.77	9.42	5.09	Pycard	PYD and CARD domain containing
38	10.52	8.18	5.05	Stk19	serine/threonine kinase 19
39	15.33	13	5.04	Cd9	CD9 antigen
40	11.57	9.24	5.01	D11Wsu47e	DNA segment, Chr 11, Wayne State University 47, expressed
41	11.32	13.69	-5.18	Ppp1r9b	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B
42	9.14	11.52	-5.2	Zhx1	zinc fingers and homeoboxes 1
43	10.32	12.7	-5.22	Ccdc88c	coiled-coil domain containing 88C
44	8.52	10.91	-5.24	Fmo1	flavin containing monooxygenase 1
45	10.74	13.16	-5.35	Bag5	BCL2-associated athanogene 5
46	8.13	10.57	-5.43	Zdhc2	zinc finger, DHHC domain containing 2
47	9.49	11.95	-5.53	Crip1	cysteine-rich protein 1 (intestinal)
48	10.19	12.71	-5.71	Wfs1	Wolfram syndrome 1 homolog (human)
49	9.13	11.7	-5.92	Gmcl1	germ cell-less homolog 1 (Drosophila)
50	9.39	11.99	-6.06	Mpp6	membrane protein, palmitoylated 6 (MAGUK p55 subfamily)

					member 6)
51	8.38	10.99	-6.09	Uhmk1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1
52	8.65	11.3	-6.28	Flna	filamin, alpha
53	9.01	11.67	-6.31	Sgms1	sphingomyelin synthase 1
54	9.29	12	-6.58	Zfp609	zinc finger protein 609
55	8.99	11.71	-6.62	Alkbh8	alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli)
56	9.74	12.5	-6.74	Mpped1	metallophosphoesterase domain containing 1
57	8.72	11.56	-7.17	Fam60a	family with sequence similarity 60, member A
58	9.81	12.68	-7.32	Pwwp2a	PWWP domain containing 2A
59	8.15	11.13	-7.88	B630005N14R ik	RIKEN cDNA B630005N14 gene
60	8.34	11.45	-8.65	Nbr1	neighbor of Brca1 gene 1
61	8.72	11.87	-8.87	Actr3b	ARP3 actin-related protein 3B
62	8.38	11.57	-9.09	Neurod6	neurogenic differentiation 6
63	10.17	13.36	-9.1	Ndnf	neuron-derived neurotrophic factor
64	8.5	11.85	-10.21	Pcmt1; BC020402	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase 1; cDNA sequence BC020402
65	8.28	11.98	-13.06	Mapk10	mitogen-activated protein kinase 10
66	9.06	13.1	-16.43	Sfxn5	sideroflexin 5
67	11.56	16.22	-25.26	Gm11096	predicted gene 11096 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3779332]

2.3.5. Diosgenin 処置が海馬神経細胞及び 5XFAD マウスの SPARC の発現量に及ぼす影響の検討

Diosgenin による脳での方向特異的な軸索再伸長に関わる候補遺伝子の 1 つに、*Sparc* が同定された。そこでまず、diosgenin 処置による SPARC の発現量変化の再現性がタンパク質レベルで観察されるかどうかについて、ddY マウス (E14) の海馬神経細胞及び 5XFAD マウスの脳切片を用いて検討した。

3 日間初代培養した海馬神経細胞に溶媒または diosgenin (1 μ M) を処置し、その 4 日後にタンパク質を抽出後、western blot によって SPARC の発現量を比較した。その結果、溶媒処置群と比べて diosgenin を処置した海馬神経細胞では、SPARC の発現量が有意に増加した (Fig. 20A)。また、wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) に溶媒または diosgenin (0.1 μ mol/kg/day) を 14 日間連続で経口投与し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 20B)。その結果、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスの CA1 領域では、NeuN 陽性神経細胞中において SPARC が有意に減少し、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは神経細胞中の SPARC が有意に増加した (Fig. 20C)。以上より、diosgenin によって神経細胞中の SPARC がタンパク質レベルでも増加することが確認された。

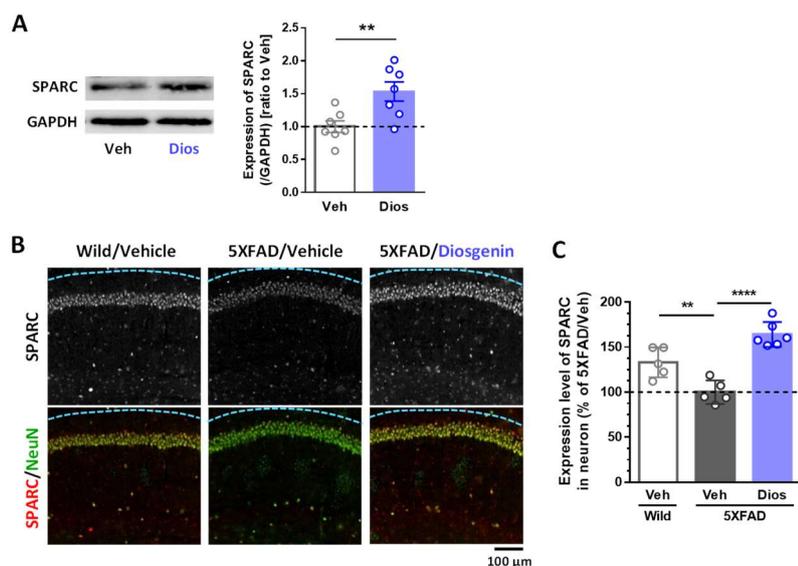


Fig. 20: Diosgenin 処置による SPARC のタンパク質レベルの再現性確認

A, 3 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に溶媒または diosgenin (1 μ M) を 4 日間処置した。細胞 lysate を作成し、western blot で SPARC 及び GAPDH の発現量を測定し、SPARC/GAPDH の発現量を算出した。** $p < 0.01$, two-tailed unpaired *t*-test, mean \pm SEM, vehicle (Veh), $n = 7$; diosgenin (Veh), $n = 7$ lysates. B, C, 溶媒または diosgenin (0.1 μ mol/kg/day) を 14 日間経口投与した wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) の脳切片について、抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行い、CA1 領域における NeuN 陽性神経細胞中の SPARC の発現量を測定した。** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, wild-type mice (Wild)/Veh, $n = 5$; 5XFAD mice (5XFAD)/Veh, $n = 5$; 5XFAD/Dios, $n = 6$ mice. [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.6. 神経細胞中の SPARC ノックダウンが diosgenin による軸索伸長作用に及ぼす影響の検討

ここまでの検討より、diosgenin が神経細胞中の SPARC を増加させることが明らかになった。そこで、diosgenin による SPARC の増加が軸索伸長に関わるかどうかを検討するために、神経細胞の SPARC をノックダウンした状態 (siRNA 導入による) で diosgenin による軸索伸長作用を検討した。

海馬神経細胞に negative control siRNA または SPARC siRNA (30 nM) を GFP vector (0.4 μ g) と共にエレクトロポレーション法で導入し、その3日後に抗 SPARC 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。siRNA が導入された神経細胞とそれ以外の細胞を区別して定量するために、GFP で可視化された神経細胞においてのみ、SPARC の発現量及び軸索長を測定した (Fig. 21A)。その結果、SPARC siRNA 導入により、神経細胞中の SPARC の発現量は有意に減少したが (Fig. 21B)、軸索長に影響は見られなかった (Fig. 21C)。続いて、同様に海馬神経細胞に negative control siRNA または SPARC siRNA (30 nM) を GFP vector (2 μ g) と共にエレクトロポレーション法で導入し3日後培養した (SPARC がノックダウンされた) 後、溶媒または diosgenin (1 μ M) を4日間処置し、蛍光免疫染色を行った (Fig. 21D)。その結果、SPARC siRNA 導入により、diosgenin による神経細胞中における SPARC の増加 (Fig. 21E)、及び軸索伸長作用 (Fig. 21F) はどちらも消失した。以上より、diosgenin による軸索伸長作用には、神経細胞中での SPARC の増加が必須であることが示された。

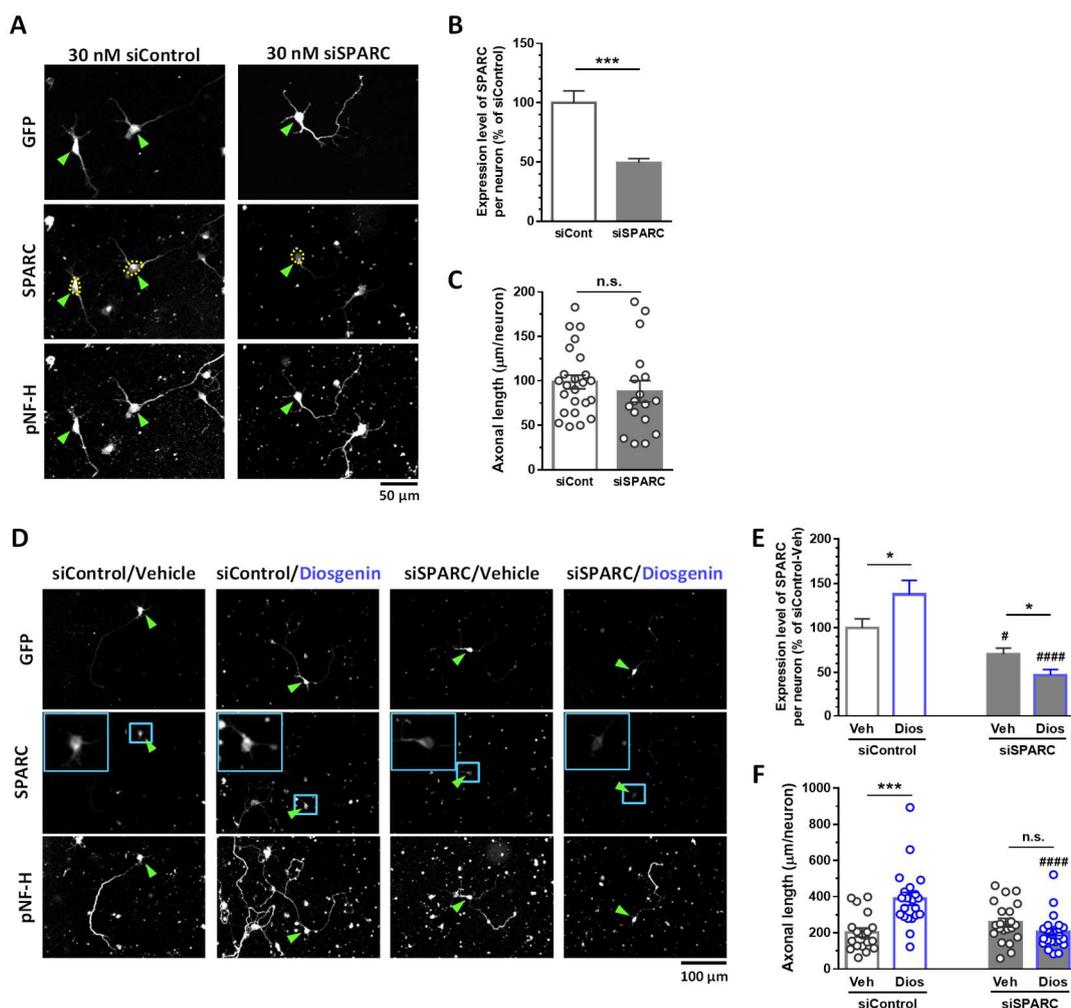


Fig. 21: 神経細胞の SPARC ノックダウンによる diosgenin の軸索伸長作用への影響

A, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に、negative control siRNA または HSC70 siRNA (30 nM) を GFP vector (0.4 μ g) と共にエレクトロポレーション法で導入した。培養より 3 日後に、抗 SPARC 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。GFP 陽性 (siRNA が導入された; 緑矢頭) 神経細胞について、**(B)** 細胞中の SPARC の発現量及び **(C)** 軸索長を測定した。*** $p < 0.001$, unpaired *t*-test, mean \pm SEM, **(B)** $n = 40\text{--}59$ neurons, **(C)** $n = 17\text{--}24$ photos.

D, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に、negative control siRNA または HSC70 siRNA (30 nM) を GFP vector (0.4 μ g) と共にエレクトロポレーション法で導入した。培養 3 日後に、溶媒または diosgenin (1 μ M) を処置し、その 4 日後に蛍光免疫染色を行った。GFP 陽性 (siRNA が導入された; 緑矢頭) 神経細胞について、**(E)** 細胞中の SPARC の発現量及び **(F)** 軸索長を測定した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ vs siControl/Veh or siControl/Dios, unpaired *t*-test, mean \pm SEM, **(E)** $n = 30\text{--}51$ neurons, **(F)** $n = 18\text{--}24$ photos.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.7. 海馬培養神経細胞での SPARC 過剰発現による軸索伸長作用の検討

ここまでの検討より、diosgenin による神経細胞中での SPARC の増加が、軸索伸長に重要な分子であることが示された。そこで、SPARC の増加が軸索伸長に直接寄与するかどうかを検討するために、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いて、SPARC を神経細胞特異的に過剰発現した。

神経細胞特異的なプロモーター *Synapsin 1 (Syn1)* 下で、mouse SPARC 及び Cerulean (青色蛍光) を発現する AAV9 ベクター (AAV-SPARC)、または *Syn1* 下で Cerulean のみを発現するコントロール AAV9 ベクター (AAV-Control) をベクタービルダー社より購入した。海馬神経細胞に、溶媒または 5×10^5 、 5×10^6 、 5×10^7 GC (genome copies)/ μL の AAV-Control または AAV-SPARC を処置し、その 7 日後に抗 SPARC 抗体、抗 Map2 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、Map2 陽性神経細胞中における SPARC の発現量は、AAV-Control と比べて AAV-SPARC 処置により、 5×10^6 GC/ μL 以上の AAV 濃度において有意に増加し (Fig. 22A, B)、SPARC の過剰発現が誘発された。また、SPARC の過剰発現 (5×10^6 GC/ μL AAV-SPARC 処置) により、pNF-H 陽性の軸索長が有意に増加した (Fig. 22C, D)。以上より、海馬培養神経細胞における SPARC の過剰発現が、直接軸索伸長に関わることが示された。

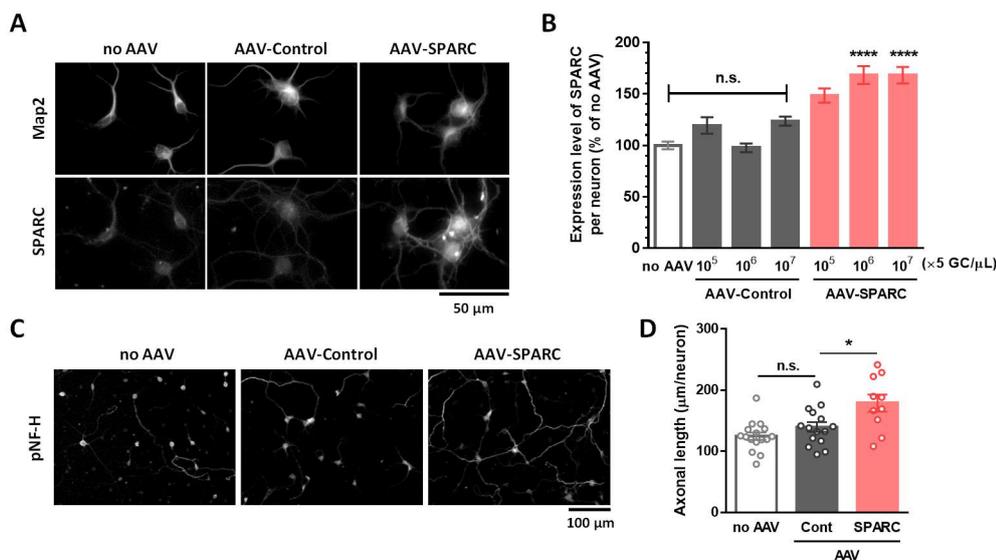


Fig. 22: 海馬培養神経細胞での SPARC 過剰発現による軸索伸長作用

ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に、 5×10^5 、 5×10^6 、 5×10^7 GC/ μL (A, B) または 5×10^6 GC/ μL (C, D) の AAV-Control (AAV9-Syn1-Cerulean-WPRE) または AAV-SPARC (AAV9-Syn1-mSparc-IRES-Cerulean-WPRE) を 7 日間処置し、抗 SPARC 抗体及び抗 Map2 抗体 (A, B)、または抗 pNF-H 抗体 (C, D) による蛍光免疫染色を行った。A, B, Map2 陽性神経細胞中での SPARC の発現量を定量した。*** $p < 0.0001$ vs same concentration of AAV-Control, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 337$ –558 neurons. C, D, pNF-H 陽性軸索長を定量した。* $p < 0.05$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 10$ –16 photos. [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.8. 海馬神経細胞での SPARC 過剰発現による 5XFAD マウスの記憶改善作用の検討

海馬培養神経細胞における SPARC の過剰発現が、軸索伸長に直接寄与することが示された。そこで次に、海馬神経細胞における SPARC の過剰発現が 5XFAD マウスの記憶障害を改善するかどうかについて、AAV ベクターを海馬に注入することによって評価した。

まず、前述の AAV-SPARC ベクターが、マウスの海馬神経細胞において SPARC の過剰発現を誘発するかどうかの基礎検討を行った。Wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側海馬 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-SPARC を注入した。その 14、21、または 28 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った (**Fig. 23**)。その結果、全てのマウスにおいて、CA1 領域では AAV 由来の Cerulean 蛍光が検出された。またこの際、少なくとも AAV 注入より 14 (**Fig. 23A**)、21 (**Fig. 23B**)、及び 28 (**Fig. 23C**) 日後の全てのタイムポイントにおいて、AAV-SPARC 注入によって NeuN 陽性神経細胞中における SPARC の発現量は有意に増加した。以上より、 1×10^{10} GC/site の AAV-SPARC を注入すると、マウスの CA1 において神経細胞の SPARC が過剰発現されることが確認された。

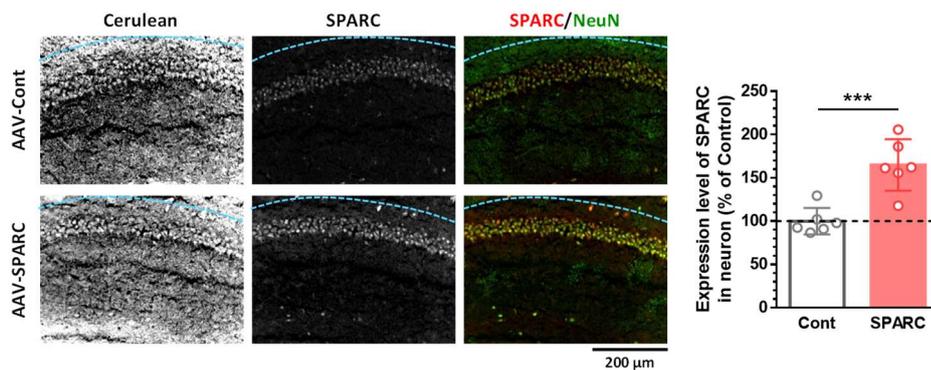
続いて、wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-SPARC を注入し、AAV 注入より 21 日後に物体認知記憶試験を行った (**Fig. 24A**)。その結果、AAV-SPARC の注入によって 5XFAD マウスの物体認知記憶は有意に改善した。続いて、これらマウスについて、AAV 注入より 23 日後に空間記憶試験を行った (**Fig. 24B**)。その結果、AAV-SPARC の注入によって 5XFAD マウスの物体認知記憶も有意に改善した。さらに、AAV 注入より 24 日後に自発運動試験を行った (**Fig. 24C-E**)。その結果、AAV 注入によるマウスの自発運動（総移動距離、進行方向に対する方向転換角度、不動時間）に群間差は認められなかった。また、AAV 注入によってマウスに顕著な体重変化も見られなかった (**Fig. 24F**)。以上の結果より、海馬神経細胞における SPARC の過剰発現によって、5XFAD マウスの記憶障害が改善することが明らかとなった。

これらマウスについて、AAV 注入より 25 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った (**Fig. 24G, H**)。その結果、全てのマウスにおいて、CA1 領域では AAV 由来の Cerulean 蛍光が検出され、AAV が注入されていることが確認された。また、**Fig. 20C** の結果と一致して、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスの CA1 では NeuN 陽性神経細胞中において SPARC が有意に減少することが確認された (**Fig. 24H**)。一方、AAV-SPARC を注入した 5XFAD マウスでは、神経細胞中の SPARC が有意に増加しており (**Fig. 24H**)、一連の行動試験中で CA1 神経細胞において SPARC の過剰発現が維持されていたことが確認された。

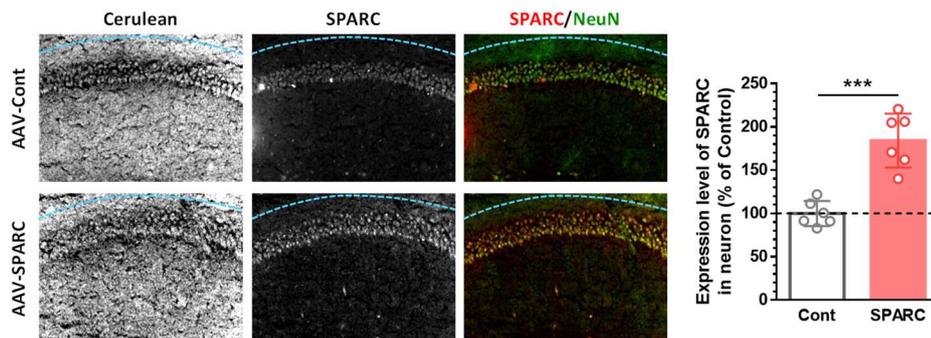
さらに、これらマウスについて、CA1-PFC の神経回路におけるシナプス形成作用を蛍光免疫染色で評価した (**Fig. 24I**)。PFC 領域に投射している CA1 神経細胞の軸索終末部は、AAV 由来の Cerulean によって可視化されるため、PFC 中の NeuN 陽性神経細胞（青色点線）上における Cerulean、

Synaptophysin 陽性前シナプス、及び PSD95 陽性後シナプスの 3 色の共局在面積を定量した。その結果、wild-type マウスと比べて 5XFAD マウスでは、CA1—PFC 間のシナプス形成が有意に減少していたが、SPARC の過剰発現によってシナプス形成が有意に促進することが示された (Fig. 24J)。以上の結果より、CA1 神経細胞での SPARC の過剰発現によって記憶障害が改善した 5XFAD マウスでは、PFC 領域でのシナプス形成も促進されていることが明らかになった。

A 14 days after AAV injections



B 21 days after AAV injections



C 28 days after AAV injections

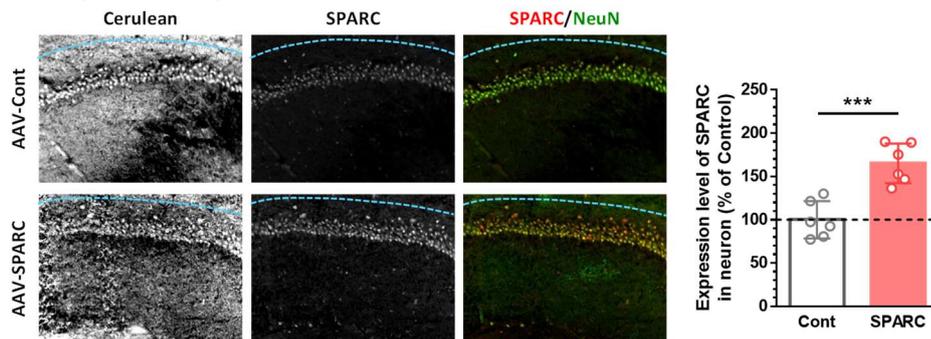


Fig. 23: AAV-SPARC 注入によるマウス脳内での SPARC 過剰発現の確認

Wild-type マウス (雌性、7-9ヶ月齢) の両側 CA1 に、 1×10^{10} GC/site AAV-Control または AAV-SPARC を注入した。AAV 注入より 14 (A)、21 (B)、または 28 (C) 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。海馬 CA1 領域における NeuN 陽性神経細胞中の SPARC の発現量を定量した。*** $p < 0.001$, unpaired t -test, mean \pm SD, $n = 6$ photos (2 mice; 3 photos/mouse). [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

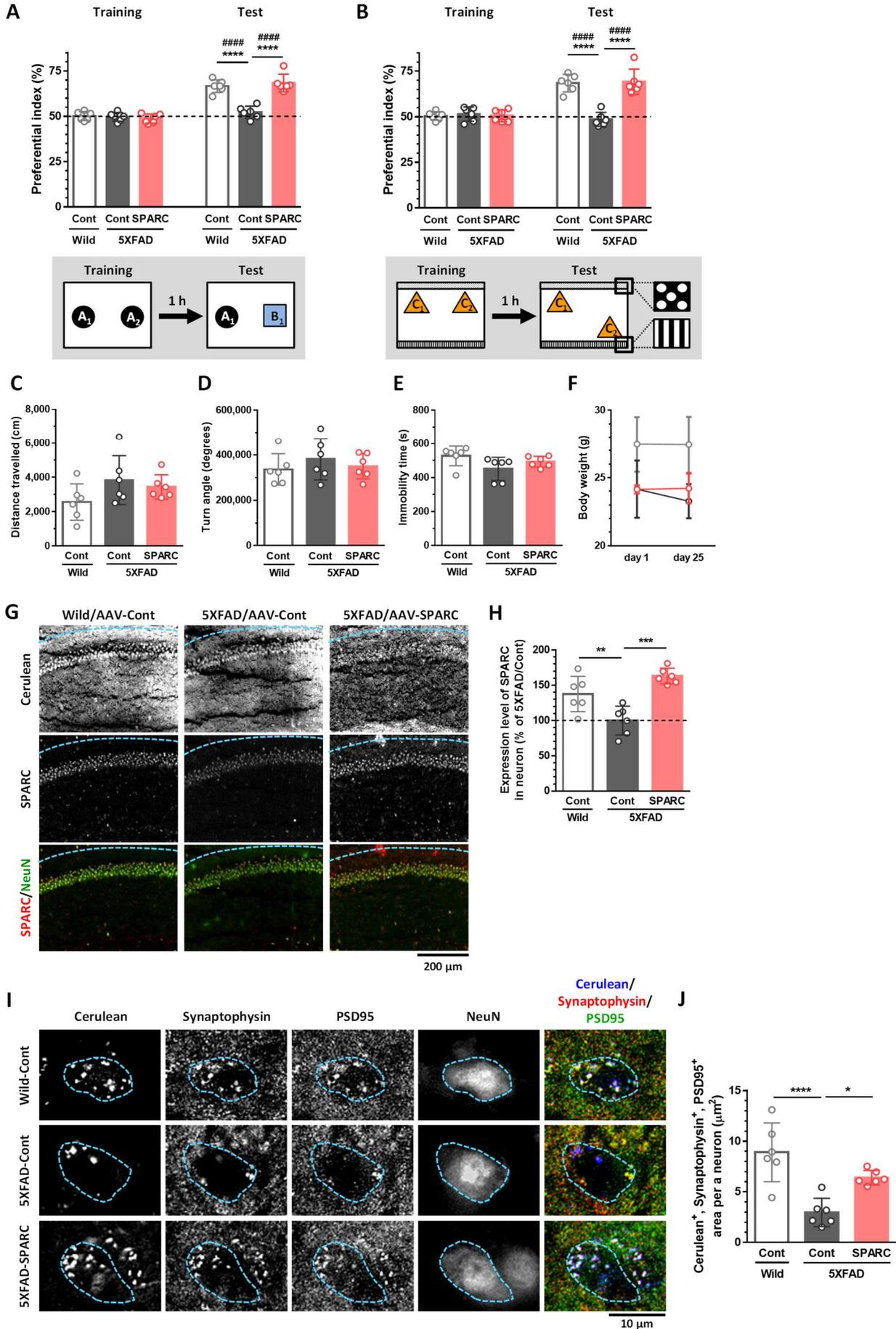


Fig. 24: 海馬神経細胞での SPARC の過剰発現による 5XFAD マウスの記憶障害改善作用

Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-SPARC を注入した。

A, B, AAV 注入より 21 日後に物体認知記憶試験 (**A**)、23 日後に空間記憶試験 (**B**) をそれぞれ行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。新奇物体に対する、または位置を移動した物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。**** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test. A significant drug \times test interaction was found using repeated-measures two-way ANOVA [F(2, 15) = 24.30, $p < 0.0001$ (**A**), [F(2, 15) = 35.74, $p < 0.0001$ (**B**), ##### $p < 0.0001$, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

C-F, AAV 注入より 24 日後に自発運動試験を行った。10 分間の自由行動をさせ、総移動距離 (**C**)、進行方向に対する方向転換角度 (**D**) 及び不動時間 (**E**) それぞれを測定した。 $p > 0.05$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice. (**F**) AAV 注入によるマウスの体重推移。 $p > 0.05$, repeated-measures two-way ANOVA, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

G, H, AAV 注入より 25 日後に、脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。海馬 CA1 領域における NeuN 陽性神経細胞中の SPARC の発現量を定量した。 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

I, J, AAV 注入より 25 日後に、脳を摘出し、脳切片を用いて抗 Synaptophysin 抗体、抗 PSD95 抗体、及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。NeuN 陽性神経細胞（青色点線）上における Cerulean、Synaptophysin、及び PSD95 の共局在面積を算出した。 * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.9. SPARC 過剰発現による 5XFAD マウス海馬—前頭前野における軸索再伸長作用の検討

HPC 神経細胞における SPARC の過剰発現が、5XFAD マウスの記憶障害を改善することが明らかになったことから、続いて、SPARC 過剰発現による 5XFAD マウス HPC—PFC における軸索再伸長作用について、前述の 2 色の逆行性トレーサーを用いた標識実験で検討した。

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）に対し、逆行性トレーサー-Dextran (3000 MW) Texas Red (赤) を右側 PFC に注入した。続いて右側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-SPARC を注入し、その 21 日後に右側 PFC に 2 色目の逆行性トレーサー-Dextran (3000 MW) FITC (緑) を注入した (Fig. 25A)。dHPC を含む脳切片を抗 NeuN 抗体で蛍光免疫染色し、CA1 及び CA3 における NeuN 陽性かつ逆行性トレーサー陽性の神経細胞数をそれぞれ定量した (Fig. 25B)。

その結果、CA1—PFC において、軸索が再伸長した神経細胞 (Texas Red 陰性かつ FITC 陽性) 数は、SPARC 過剰発現により有意に増加することが示された (Fig. 25C)。また、AAV が注入された期間中に軸索が萎縮した神経細胞 (Texas Red 陽性かつ FITC 陰性) 数は、wild-type と比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群で有意に増加したが、SPARC を過剰発現した 5XFAD マウスでは有意に減少した (Fig. 25D)。また、軸索が萎縮も伸長もしなかった naïve 神経細胞 (Texas Red 陽性かつ FITC 陽性) 数は、5XFAD マウスの AAV-Control 群と比べて AAV-SPARC 群で有意に増加し (Fig. 25E)、Fig. 25D と同様に SPARC 過剰発現による軸索保護作用が示唆された。また、5XFAD マウスの AAV-Control 群と AAV-SPARC 群間では、元々 PFC に軸索投射する神経細胞 (全 Texas Red 陽性) 数に差がなく、また両群とも wild-type マウスと比べて有意に低かったことから (Fig. 25F)、AAV 注入前の段階において、5XFAD マウスの両群では wild-type マウスと比べて同程度の軸索萎縮が起こっていたものと考えられる。また、AAV 注入後に CA1—PFC において軸索投射していた神経細胞 (全 FITC 陽性) 数は、SPARC を過剰発現した 5XFAD マウスで wild-type マウスと同程度、またはそれ以上にまで有意に増加したことから、SPARC 過剰発現によって 5XFAD マウスでは wild-type マウスに匹敵するほどの軸索投射が起きていることが示唆された (Fig. 25G)。一方、各群における NeuN 陽性神経細胞数に差はなかった (Fig. 25H)。

CA3 領域においても AAV 由来の Cerulean 蛍光が検出されたことから、CA3—PFC においても定量を行った。その結果、SPARC の過剰発現によって CA1—PFC と同様の結果が示された (Fig. 26)。以上より、HPC 神経細胞において SPARC を過剰発現するだけで、5XFAD マウスの HPC—PFC において一度萎縮した軸索が長距離、かつつながるべき脳部位に向かって再伸長することが示された。

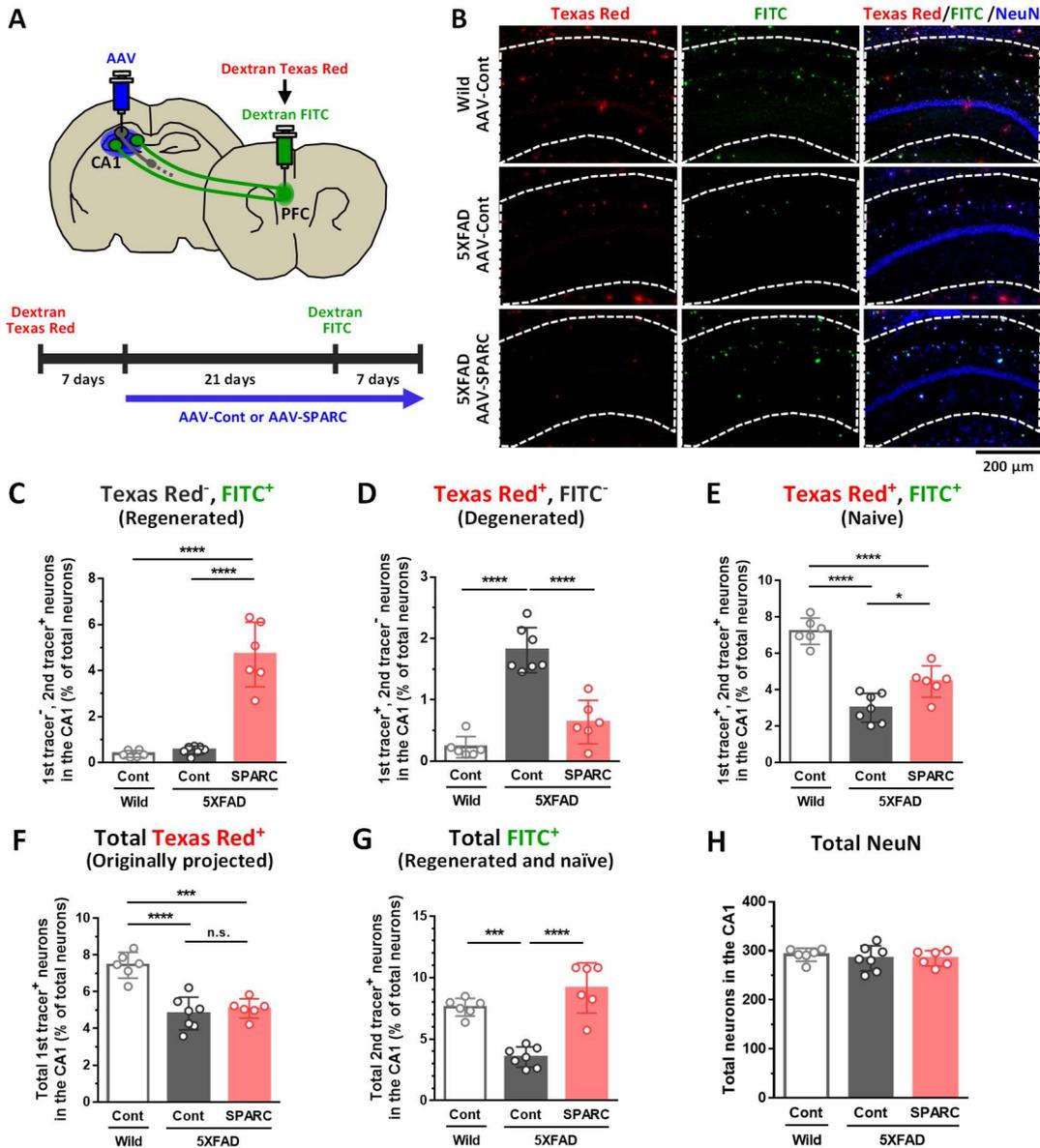


Fig. 25: SPARC 過剰発現による 5XFAD マウスの CA1—PFC における軸索再伸長作用

A, B, 5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）の右側 PFC に Dextran Texas Red を注入した。その 7 日後に、右側 CA1 領域に 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-SPARC を注入し、AAV 注入より 21 日後に Dextran FITC を PFC の同部位に注入した。その 7 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。**(B)** 各群の右側 CA1 における逆行性トレーサー（Texas Red 及び FITC）及び NeuN の染色像を示す。

C–H, 右側 CA1 における **(C)** Texas Red 陰性かつ FITC 陽性の神経細胞数、**(D)** Texas Red 陽性かつ FITC 陰性の神経細胞数、**(E)** Texas Red 陽性かつ FITC 陽性の神経細胞数、**(F)** 全 Texas Red 陽性神経細胞数、**(G)** 全 FITC 陽性神経細胞数、**(H)** NeuN 陽性全神経細胞数。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 7–8$ mice.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

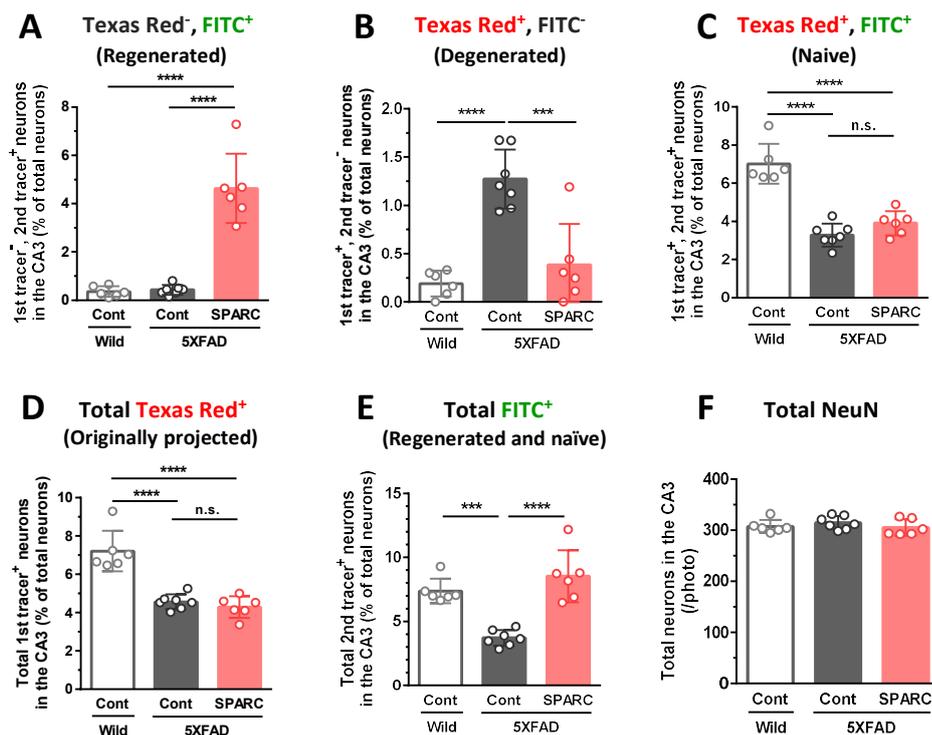


Fig. 26: SPARC 過剰発現による 5XFAD マウスの CA3—PFC における軸索再伸長作用

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）の右側 PFC に Dextran Texas Red を注入した。その 7 日後に、右側 CA1 領域に 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-SPARC を注入し、AAV 注入より 21 日後に Dextran FITC を PFC の同部位に注入した。その 7 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。AAV 由来の Cerulean 蛍光が CA3 にも一部広がっている様子を確認した（データ未提示）。右側 CA3 における (A) Texas Red 陰性かつ FITC 陽性の神経細胞数、(B) Texas Red 陽性かつ FITC 陰性の神経細胞数、(C) Texas Red 陽性かつ FITC 陽性の神経細胞数、(D) 全 Texas Red 陽性神経細胞数、(E) 全 FITC 陽性神経細胞数、(F) NeuN 陽性全神経細胞数。*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 7-8$ mice. [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.10. 海馬—前頭前野における軸索再伸長と記憶改善作用の直接的な関係の検証

ここまでの検討より、HPC 神経細胞における SPARC の過剰発現が、5XFAD マウスの記憶障害を改善し、HPC—PFC における軸索再伸長に寄与することが明らかとなった。そこで、「脳での軸索再伸長が、直接的に記憶障害の改善に寄与する」かを検証するために、DREADDs システム (Zhu & Roth, 2014) を用いた機能学的証明実験を行った。

DREADD は遺伝子変異 G タンパク質共役受容体 (GPCR) を指すが、内在性リガンドとは反応せず、人工的に合成されたデザイナーリガンドによってのみ活性化される受容体である。本研究では、Gi 型 GPCR である hM4Di 及びそのリガンドであるクロザピン-*N*-オキシド (CNO) (Mahler & Aston-Jones, 2018) を利用し、hM4Di 発現神経細胞の神経活動を CNO によって一時的に抑制する手法を用いた。hM4Di とともに SPARC を HPC 神経細胞特異的に過剰発現し、それら神経細胞の軸索が投射する PFC より CNO を局所注入することによって、SPARC が過剰発現された HPC から PFC に投射する軸索を介した神経活動のみを抑制することを試みた。

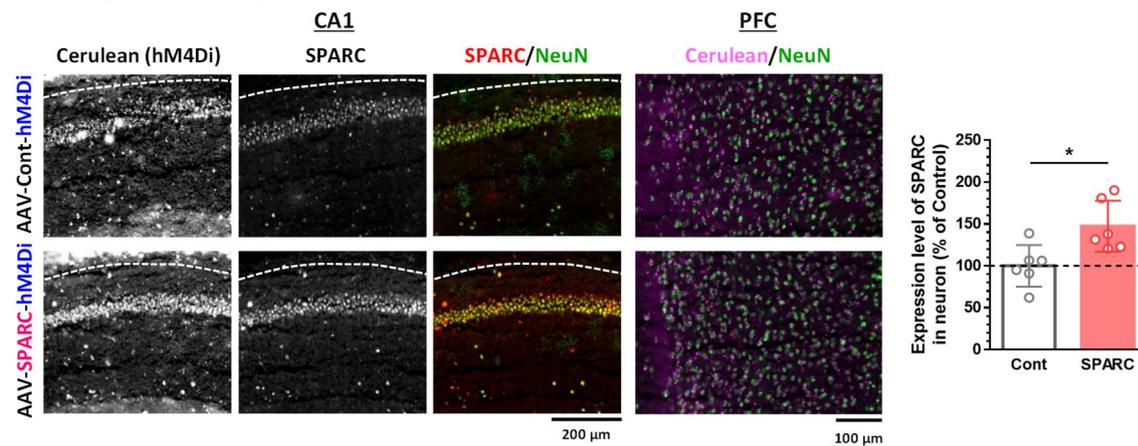
SPARC とともに hM4Di を神経細胞に過剰発現する AAV9 (AAV-SPARC-hM4Di) 及びそのコントロール AAV9 (AAV-Control-hM4Di) をベクタービルダー社より購入した。まず、AAV-hM4Di-SPARC によっても、マウスの海馬神経細胞において SPARC の過剰発現が誘発されるかどうかの基礎検討を行った。Wild-type マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) の両側海馬 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control-hM4Di または AAV-SPARC-hM4Di を注入した。その 21 または 28 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 27)。その結果、全てのマウスにおいて、CA1 領域では AAV 由来の Cerulean (= hM4Di) が検出された。また、AAV 注入より 21 (Fig. 27A) 及び 28 (Fig. 27B) 日後において、AAV-SPARC-hM4Di を注入によって NeuN 陽性神経細胞中における SPARC の発現量は有意に増加した。さらに、それぞれのタイムポイントにおいて、Cerulean 陽性 HPC 神経細胞の軸索終末が、確かに PFC 領域に発現しており、PFC から CNO を注入することによって Cerulean (hM4Di) 発現神経細胞の神経活動を抑制しようと思われた。

続いて、wild-type マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control-hM4Di または AAV-SPARC-hM4Di を注入した。また、Fig. 22-26 において用いた AAV-Control (本実験では AAV-Control-empty と記す) を、hM4Di を発現しない negative control ベクターとして同様に用いた。さらに、CNO を投与する埋込カニューレを AAV 注入オペと同時に、両側 PFC をまたがるようにして留置した (Fig. 28A)。AAV 注入より 21 日後に、PFC より生理食塩水 (CNO の negative control) を投与する場合 (神経活動抑制なし) の物体認知記憶試験を行った (Fig. 28B)。生理食塩水は、記憶試験の training session 終了後直ちに、埋込カニューレを介して PFC に注入した。その結果、AAV-Control-empty 及び AAV-Control-hM4Di を注入した wild-type マウスでは、記憶力が正常であったため、カニューレの埋込や hM4Di の発現そのものがマウスの記憶力に影響を及ぼさないことが確認された。一方、5XFAD マウスの AAV-Control-hM4Di 群では記憶障害が生じていた

が、AAV-SPARC-hM4Di 群では記憶が有意に改善し、SPARC 過剰発現による記憶改善作用の再現性が確認された。続いて、その 2 日後に、同じマウスを用いて PFC より 1 mM CNO を 0.3 μ l 注入し、hM4Di 発現神経細胞の神経活動を抑制する場合の物体認知記憶試験を行った (Fig. 28B)。その結果、まず興味深いこととして、AAV-Control-hM4Di を注入した wild-type マウスでは記憶障害が引き起こされた。つまり、HPC—PFC の神経回路の活動が遮断されると記憶保持できず、この回路が記憶保持に重要であることが示された。さらに、最も重要な知見として、AAV-hM4Di-SPARC を注入した 5XFAD マウスでは、生理食塩水注入時には改善していた物体認知記憶が障害された (Fig. 28B)。つまり、SPARC が過剰発現され、かつ軸索が PFC に再伸長した HPC 神経細胞が、直接的に記憶障害の改善に寄与していることが機能学的に証明された。

これらのマウスについて、AAV 注入より 28 日後に自発運動試験を行ったところ、マウスの自発運動 (総移動距離、進行方向に対する方向転換角度、不動時間) に群間差は認められなかった (Fig. 28C–E)。また、AAV 注入より 28 日後に脳を摘出し、PFC 脳切片を明視野画像で観察したところ、全マウスにおいて埋込カニューレが両側 PFC の中心部に留置されていた痕 (矢印) が確認された (Fig. 28F)。また、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行ったところ、全てのマウスにおいて、CA1 領域では AAV 由来の Cerulean (= hM4Di) が検出された (Fig. 28G)。また、AAV-SPARC-hM4Di を注入によって NeuN 陽性神経細胞中における SPARC の発現量は有意に増加した (Fig. 28H)。さらに、Cerulean 陽性 HPC 神経細胞の軸索終末が PFC 領域に発現していることから、PFC から投与された CNO が確かに PFC の hM4Di に作用できていたと考えられた (Fig. 28G)。

A 21 days after AAV injections



B 28 days after AAV injections

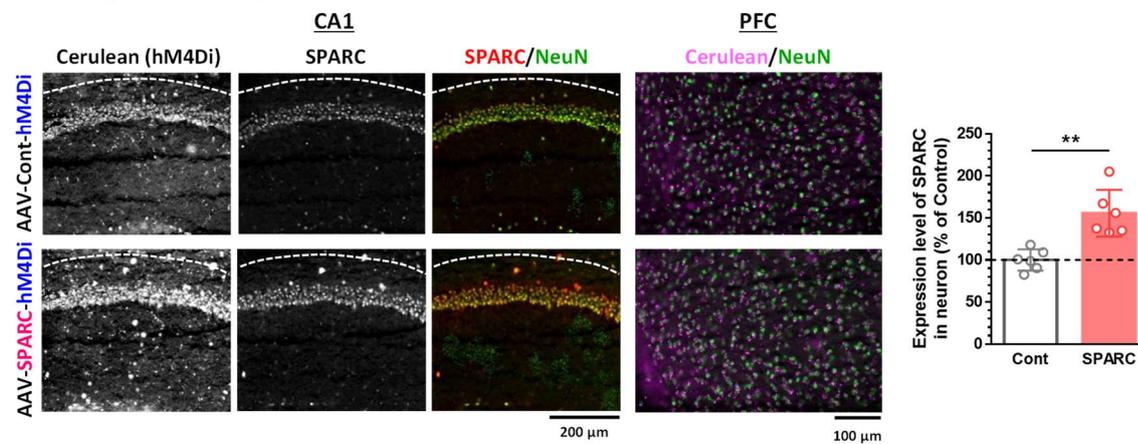


Fig. 27: AAV-hM4Di-SPARC 注入によるマウス脳内での SPARC 過剰発現の確認

Wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 に、 1×10^{10} GC/site AAV-Control-hM4Di または AAV-SPARC-hM4Di を注入した。AAV 注入より 21 (A) または 28 (B) 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。海馬 CA1 領域における NeuN 陽性神経細胞中の SPARC の発現量を定量した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, unpaired *t*-test, mean \pm SD, $n = 6$ photos (2 mice; 3 photos/mouse). [Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

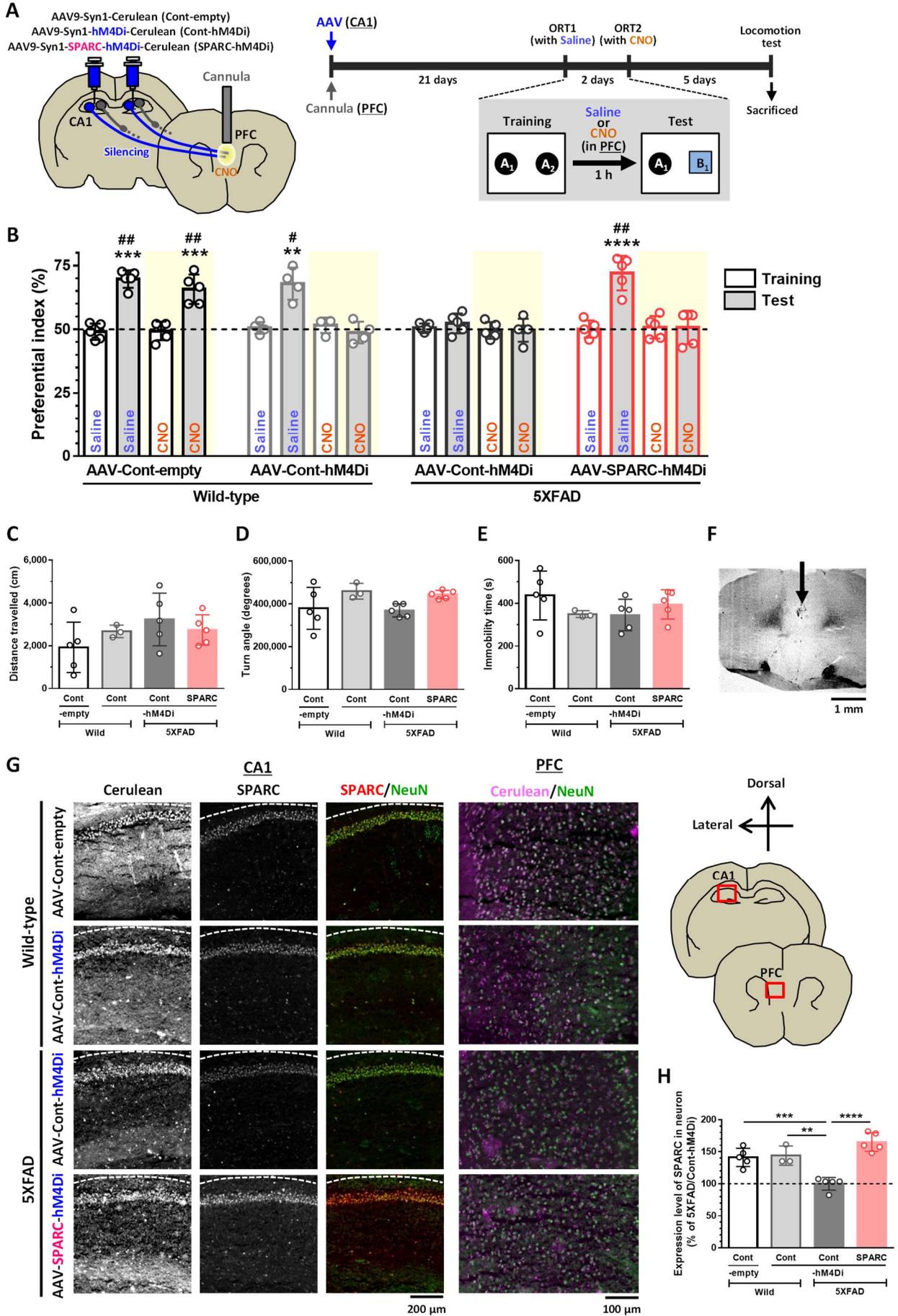


Fig. 28: DREADD システムによる SPARC 過剰発現海馬神経細胞の神経活動抑制が 5XFAD マウスの記憶障害改善作用に及ぼす作用の検証

Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control- empty (AAV9-Syn1-Cerulean-WPRE)、AAV-Control-hM4Di (AAV9-Syn1-hM4Di-Cerulean-WPRE)、または AAV-SPARC-hM4Di (AAV9-Syn1-mSparc-hM4Di-Cerulean) を注入した。同日に、PFC の両側中心部に埋込カニューレを留置した。

A, B, AAV 注入より 21 日後に PFC から 0.3 μ l の生理食塩水を投与する場合の物体認知記憶試験 (**A**)、23 日後に PFC から 0.3 μ l の 1 mM CNO を投与する場合の物体認知記憶試験 (**B**) をそれぞれ行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。Training session 終了後直ちに、生理食塩水または CNO を投与した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test. A significant drug \times test interaction was found using repeated-measures two-way ANOVA [$F(3, 15) = 19.02$, $p < 0.0001$ (**Saline**), [$F(3, 15) = 10.30$, $p = 0.0006$ (**CNO**). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 4-5$ mic.

C-E, AAV 注入より 28 日後に自発運動試験を行った。10 分間の自由行動をさせ、総移動距離 (**C**)、進行方向に対する方向転換角度 (**D**) 及び不動時間 (**E**) それぞれを測定した。 $p > 0.05$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 4-5$ mice.

F, AAV 注入より 28 日後に脳を摘出し、脳切片にて埋込カニューレが PFC に正しく留置されたことを明視野観察にて確認した。

G, H, AAV 注入より 28 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 SPARC 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。海馬 CA1 領域における NeuN 陽性神経細胞中の SPARC の発現量を定量した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 3-5$ mice.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.11. 軸索再伸長時の海馬神経細胞における SPARC の局在検討

神経細胞での SPARC の増加が、なぜ方向特異的な軸索再伸長に関わるのかを検討するために、まずは diosgenin 処置によって SPARC が海馬神経細胞のどこで増加するのかについて、その局在を検討した。

3日間培養した海馬神経細胞に A β ₂₅₋₃₅ (2.5 μ M) を3日間処置し、溶媒または diosgenin (0.1, 1 μ M) を処置した。その4日後に抗 SPARC 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 29A)。その結果、control 群では、神経細胞体および軸索上で SPARC の発現が見られたが、A β ₂₅₋₃₅ 処置によって特に軸索上において SPARC 発現が有意に減少した (Fig. 29B)。一方、diosgenin を後処置すると、軸索上の SPARC の発現が有意に増加することが示された (Fig. 29A: 黄色矢頭、Fig. 29B)。

また、diosgenin による軸索上の SPARC の増加が、1.3.3.でも前述した、diosgenin による軸索再伸長に関わる直接結合タンパク質 1,25D₃-MARRS を介して起こるかどうかを検討した。3日間培養した海馬神経細胞に A β ₂₅₋₃₅ (2.5 μ M) を3日間処置し、1,25D₃-MARRS 中和抗体または normal rabbit IgG を diosgenin (1 μ M) と共に処置した。その4日後に抗 SPARC 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、1,25D₃-MARRS 中和抗体処置により、diosgenin による軸索再伸長作用 (Fig. 29C) 及び軸索上での SPARC の増加 (Fig. 29D) がともに消失した。このことから、diosgenin による軸索上での SPARC の増加は、1,25D₃-MARRS シグナルを介して起こることが示唆された。

続いて、diosgenin 投与が 5XFAD マウス脳内の HPC—PFC において、軸索上の SPARC を増加させるかどうかを検討するために、HPC から PFC に投射する軸索を順行性トレーサーであるビオチン化デキストランアミン (BDA) により標識し、BDA 陽性軸索上における SPARC の発現を検出した。Wild-type 及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) に溶媒または diosgenin (0.1 μ mol/kg/day) を21日間連続で経口投与した。薬物投与14日目に BDA を右側 CA1 に注入し、HPC—PFC の神経回路を標識した。まず、海馬 CA1 に注入された BDA (Fig. 30A) が、PFC において pNF-H 陽性軸索と共局在することが確認された (Fig. 30B: 白矢頭)。また、抗 SPARC 抗体及び DAPI による蛍光免疫染色を行ったところ (Fig. 30C)、PFC における BDA 陽性軸索の面積は、wild-type マウスに比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群で有意に減少しており (Fig. 30D)、HPC—PFC の神経回路において軸索投射が減少することが確認された。一方、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは、HPC から PFC に投射する軸索が有意に増加することが示され (Fig. 30D)、diosgenin の軸索再伸長作用を支持する結果となった。この際、wild-type マウスの PFC では、BDA 陽性軸索において SPARC が高発現している様子が観察された (Fig. 30C)。しかし、溶媒を投与した 5XFAD マウスでは、SPARC を発現する軸索数が有意に減少していた (Fig. 30C: 白矢頭、Fig. 30E)。一方、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは、SPARC を発現する BDA 陽性軸索数は wild-type マウスとほとんど同レベルにまで有意に増加した (Fig. 30E)。以上の結果より、diosgenin によって再伸長している軸索上では、SPARC の発現が高いことが示唆された。

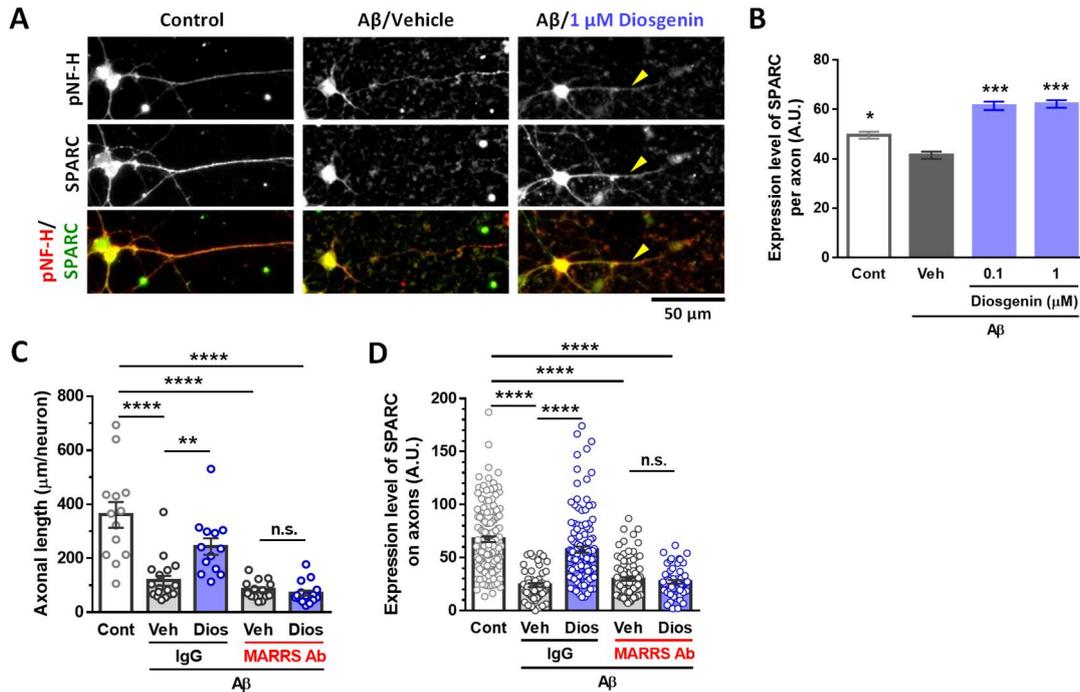


Fig. 29: Diosgenin 処置された海馬培養神経細胞における SPARC の局在及びその発現変化

A, B, 3 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に $A\beta_{25-35}$ ($2.5 \mu\text{M}$) を 3 日間処置し、diosgenin ($0.1, 1 \mu\text{M}$) を 4 日間処置した。抗 SPARC 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、軸索上での SPARC の発現量を測定した。Diosgenin を処置した神経細胞では、SPARC の発現量は特に軸索上で高かった (黄矢頭)。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs $A\beta_{25-35}$ ($A\beta$)/Vehicle (Veh), one-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, mean \pm SEM, $n = 92-427$ axons.

C, D, 3 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に $A\beta_{25-35}$ ($2.5 \mu\text{M}$) を 3 日間処置した。その後、normal rabbit IgG (Control Ab) または $1,25D_3$ -MARRS 中和抗体 (MARRS Ab) を処置し、15 分後に diosgenin ($1 \mu\text{M}$) を処置した。その 4 日後に、抗 SPARC 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、(C) 軸索密度及び (D) 軸索上の SPARC の発現量を測定した。** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, (C) $n = 13-18$ photos, (D) $n = 57-136$ axons.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

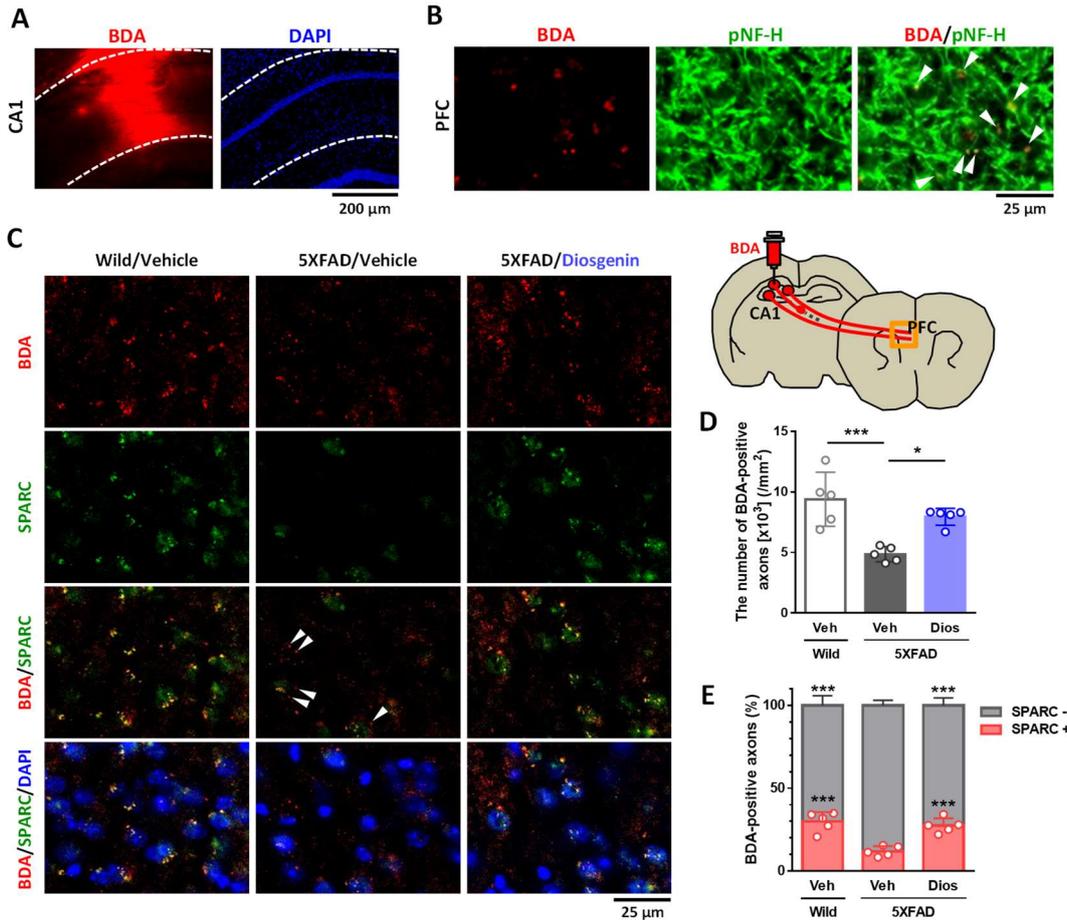


Fig. 30: HPC—PFC における diosgenin による SPARC の局在及びその発現変化

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）に溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 21 日間経口投与し、薬物投与 14 日目に右側 CA1 に BDA を注入した。脳を摘出後、脳切片を用いて抗 pNF-H 抗体及び抗 SPARC 抗体による蛍光免疫染色を行った。

A, BDA 注入部位 (CA1) を示す。

B, CA1 神経細胞由来の軸索 (PFC) において、BDA が pNF-H 染色と共局在する様子が観察された (白矢頭)。

C, 各群の PFC における BDA 及び SPARC、DAPI の染色像。白矢頭は、SPARC が発現していない BDA 陽性軸索を示す。

D, **E**, PFC における BDA 陽性軸索数 (**D**) 及び全 BDA 陽性軸索のうち SPARC 陽性または SPARC 陰性軸索数の割合 (**E**) を定量的に評価した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs 5XFAD/Veh, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 5$ mice.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.12. 軸索上の SPARC が方向特異的な軸索再伸長に関わる分子機序の仮説立案

再伸長中の軸索上において SPARC が高発現しているという事実に基づき、私は軸索上で増加した SPARC は、道しるべとなる何らかの細胞外タンパク質と相互作用しながら、つながるべき投射先まで再伸長しているのではないかとの仮説を立てた。つまり、それら細胞外タンパク質は、軸索が萎縮後においても、萎縮前に伸びていた軌跡にレール様に残存している可能性を考えた。

SPARC は酸性ドメイン、フォリスタチン様ドメイン、細胞外ドメインの 3 つのドメインから構成されており (Kos & Wilding, 2010)、細胞質 (Fenouille et al., 2010)、細胞外マトリックス (Everitt & Sage, 1992; Sage et al., 1989a)、細胞膜 (Tang & Tai, 2007) において広く発現が報告されている。もし、軸索膜に局在する SPARC が細胞外タンパク質と相互作用しているのであれば、その相互作用タンパク質は、SPARC の細胞外ドメインを介して結合する分子である可能性が高い。そこで、SPARC の細胞外ドメインの主なリガンドとして報告されている collagen ファミリー (I, III, IV 型 collagen) に着目した (Mayer et al., 1991)。Collagen ファミリーは、発達期の脳において軸索伸長や軸索誘導、シナプス形成に重要であることが知られているものの (Hubert et al., 2009)、SPARC と collagen の相互作用が軸索伸長や軸索再伸長に影響を及ぼすかについては不明であった。脳では、特に I 型 collagen (collagen I) の発現が高いことから、SPARC と collagen I の相互作用が方向特異的な軸索再伸長に関わるかどうかを検討することとした。

まず、前述の仮説が正しいかを検証する実験として、培養神経細胞における collagen I の局在を検討した。これまでの基礎検討により、短期培養 (~7 日) した海馬神経細胞では collagen I の発現が低い、比較的長期間 (10 日~) 培養すると、collagen I の発現が増加することを確認している (データ未提示)。そこで、海馬神経細胞を 14 日間培養後、 $A\beta_{25-35}$ (2.5 μ M) を 3 日間処置し、diosgenin (1 μ M) を処置した。その 4 日後に抗 collagen I 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 31A)。その結果、control 群では、ほとんどの collagen I が線維状に軸索と共局在することが確認された (Fig. 31A, B)。一方、興味深いことに、 $A\beta_{25-35}$ を処置した細胞では、pNF-H 陽性の軸索自体は萎縮しているものの、軸索が元々伸びていたと思われる場所に、collagen I が残存している像が多く観察された (Fig. 31A: 水色矢頭、Fig. 31B)。一方、diosgenin を後処置すると、ほとんどの軸索が再び細胞外 collagen I と共局在することが示された (Fig. 31A, B)。

また、軸索上の SPARC が細胞外 collagen I と直接相互作用できるかの可能性を検討するために、軸索膜上に本当に SPARC が局在するかどうかについて、細胞膜非透過処理 (染色時に界面活性剤なし) の蛍光免疫染色で確認した。海馬神経細胞を 14 日間培養後、 $A\beta_{25-35}$ (2.5 μ M) を 3 日間処置し、diosgenin (1 μ M) を処置した。その 4 日後に抗 SPARC 抗体及び抗 collagen I 抗体による細胞膜非透過処理の蛍光免疫染色を行った (Fig. 31C)。この条件で可視化されたタンパク質は、細胞膜または細胞外に局在するものと考えられる。その結果、control 細胞では、SPARC のシグナルが軸索膜上で検出され (黄色矢頭)、それらが細胞外 collagen I と共局在していた。一方、 $A\beta_{25-35}$ を処置した神経細胞では、

軸索膜上の SPARC の発現が劇的に減少し、細胞外 collagen I のみが残存していた（青色矢頭）。一方、diosgenin 処置によって、軸索膜上の SPARC の発現は増加し、collagen I との共局在も観察された（黄色矢頭）。

また、この軸索が元あった場所における collagen I の残存がマウス脳でも見られるかどうかを検討するために、wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の PFC（HPC 神経細胞の軸索投射部）における collagen I 及び軸索の局在を蛍光免疫染色で検討した（Fig. 31D）。その結果、wild-type マウスの PFC では、pNF-H 陽性軸索と collagen I がほとんど共局在していたのに対し、5XFAD マウスでは collagen I 陽性かつ pNF-H 陰性の粒状の染色像が増加することが検出された（白矢印）。

以上の結果より、軸索伸長時では神経細胞から産生（分泌）された collagen I が軸索に沿うように局在すること、軸索が萎縮しても collagen I は細胞外に残存すること、軸索再伸長時では軸索膜上で局在する SPARC が、元々軸索が伸びていた場所に残存する collagen I と相互作用し、方向特異的な軸索再伸長に関わる可能性があることが考えられたため、以降の 2.3.13.の実験に進んだ。

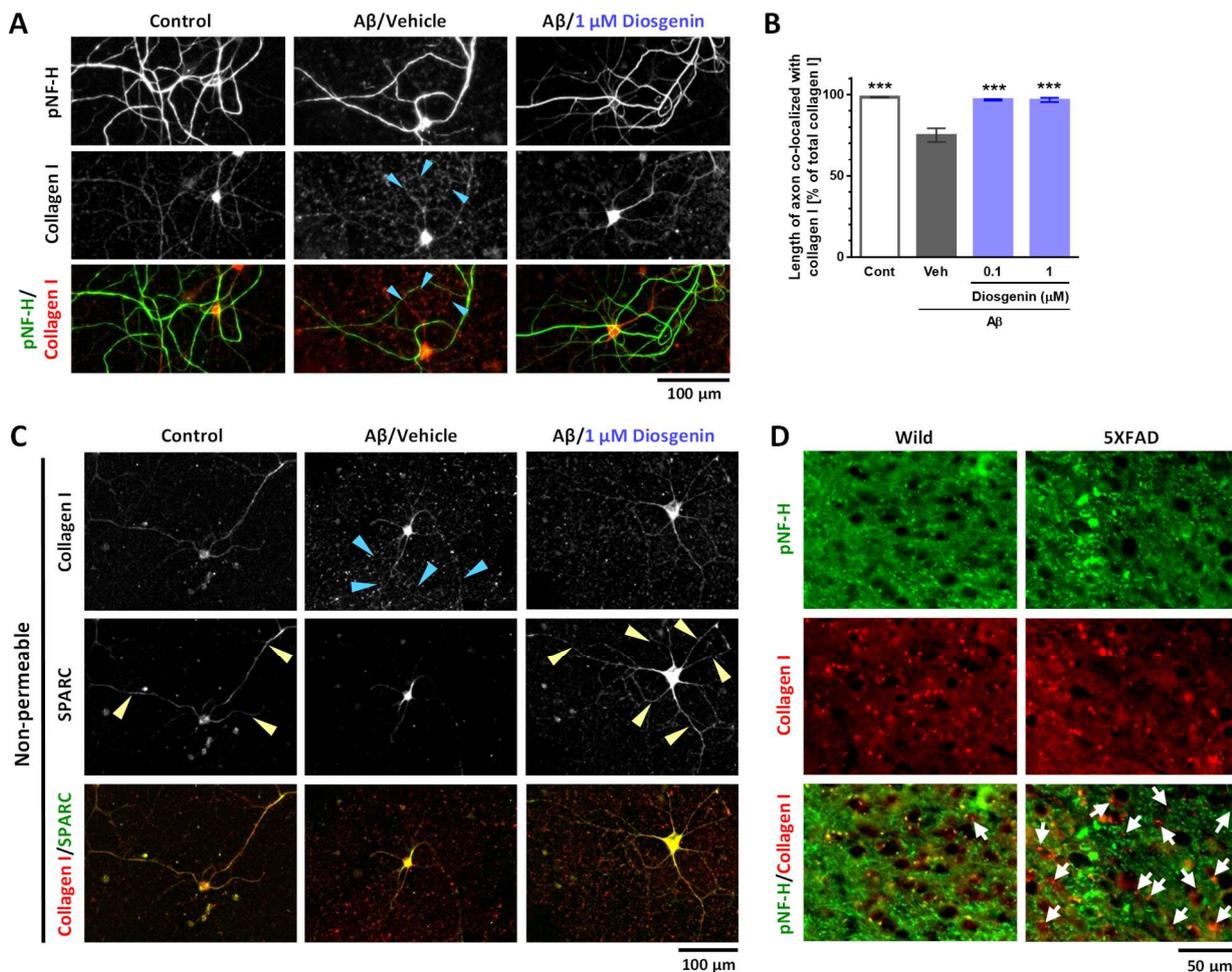


Fig. 31: 海馬神経細胞の軸索上における SPARC 及び collagen I の局在性

A–C, 14 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に $A\beta_{25-35}$ (2.5 μ M) を 3 日間処置し、diosgenin (1 μ M) を 4 日間処置した。抗 pNF-H 抗体及び抗 collagen I 抗体による細胞膜透過（染色時に界面活性剤あり）（**A, B**）、または抗 SPARC 抗体及び抗 collagen I 抗体による細胞膜非透過（染色時に界面活性剤なし）（**C**）の蛍光免疫染色を行った。（**A**）軸索萎縮部には collagen I が残存していた（水色矢頭）。（**B**）全軸索長のうち collagen I と共局在する割合を定量した。*** $p < 0.001$ vs $A\beta$ /Veh, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 12$ images.（**C**）SPARC は軸索膜上で局在し（黄色矢頭）、軸索萎縮部の細胞外では collagen I が残存していた（水色矢頭）。

D, 5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）の脳切片を用いて抗 pNF-H 抗体及び抗 collagen I 抗体による蛍光免疫染色を行った。Collagen I 陽性かつ pNF-H 陰性の染色像が見られた（白矢印）。

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.13. 軸索上の SPARC—細胞外 collagen I による方向特異的な軸索再伸長作用の検討

軸索膜上での SPARC と細胞外に残存する collagen I が方向特異的な軸索再伸長に直接関わるかどうかを検討するために、以下の一連の実験を行った。

神経細胞を播種する前日より、通常の PDL コーティング上に、collagen I をさらに重ねてコーティングした。その後、播種した海馬神経細胞に AAV-Control または AAV-SPARC (5×10^6 GC/ μ l) を 7 日間処置し、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 32A)。その結果、Fig. 22C, D の結果に一致して、PDL コーティング上において AAV-SPARC 処置は軸索伸長を有意に促進した。一方、興味深いことに、SPARC 過剰発現による軸索伸長作用は細胞外に collagen I がコーティングされた場合、より促進されることが示された (Fig. 32A)。

続いて Fig. 32B では、右側に collagen I をコーティングした dish を作製し、中央部に SPARC 過剰発現神経細胞を播種し、その軸索が PDL と collagen I 上のどちらに向かってより伸長するかを比較した。神経細胞を播種する前日より、well の右側にのみ PDL コーティング上に collagen I を重ねてコーティングした。その後、Neuron device チャンバーを用いて、collagen I がコーティングされていない中央のスペース内に海馬神経細胞を播種した。チャンバーを取り外した後、神経細胞に AAV-Control または AAV-SPARC (5×10^6 GC/ μ l) を 14 日間処置し、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 32B)。PDL (左) および collagen I (右) でコーティングされた領域に伸長した軸索長をそれぞれ定量したところ、SPARC を過剰発現した神経細胞の軸索は、より collagen I 上に向かって伸びることが示された (Fig. 32B)。以上より、神経細胞中で SPARC の発現が増加すると、その軸索は細胞外 collagen I の方向により伸びることが示された。

さらに、軸索膜上の SPARC と“元々軸索が伸びていた場所に残存する”細胞外 collagen I の相互作用が、方向特異的な軸索再伸長に寄与するかどうかを検証した (Fig. 32C)。海馬神経細胞を Triple neuron device チャンバーの細胞体スペース内 (灰色) に播種し、 5×10^7 GC/ μ l AAV-Control を処置することで、AAV 由来の Cerulean 蛍光で神経細胞及び軸索の形態を可視化し、全てのタイムポイントにおいて同一の軸索をイメージングした。軸索のみがチャンバーの細い microgroove 内に伸長することができるため、軸索が伸長した microgroove 内には、神経細胞由来の collagen I が軸索に沿って蓄積した (Fig. 32C、collagen I の列)。蛍光顕微鏡でのライブイメージングにより、Cerulean 陽性軸索が microgroove 内に伸長し切ったことが確認された培養 10 日目まで通常培養後、 $A\beta_{25-35}$ (2.5 μ M) をチャンバーの細胞体スペース (灰色) 及び軸索スペース (ピンク) に 3 日間処置した (11-13 DIV [days *in vitro*])。13 DIV におけるライブイメージングにより、元々 microgroove に伸びていた Cerulean 陽性軸索が、 $A\beta_{25-35}$ 処置によって萎縮したことを確認した。その後、チャンバーを培養 dish より取り外し (microgroove 以外のどこにでも、軸索が自由に伸長できる状態にする)、 5×10^6 GC/ μ l AAV-Control または AAV-SPARC を、2 μ g/mL SPARC 中和抗体 (SPARC-Ab、軸索膜上の SPARC をマスクする) または normal IgG (IgG) と共に処置した。培養開始より 20 日後 (20 DIV) に、抗 pNF-H 抗体及び抗

collagen I 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。元々 microgroove があつた場所（細胞外 collagen I を辿つた軸索の長さ）及び microgroove がない場所（細胞外 collagen I を辿らなかつた軸索の長さ）それぞれを定量した。その結果、IgG 処置下では、SPARC の過剰発現により、軸索は microgroove 部があつた場所に向かって有意に再伸長することが示された（Fig. 32D）。一方、SPARC-Ab 処置群では、SPARC を過剰発現しても軸索が元々伸びていた microgroove 部に伸長せず（Fig. 32D）、collagen I がいない場所に向かって無秩序に伸長する様子が検出され（Fig. 32D: 灰色矢頭、Fig. 32E）、方向特異的な軸索再伸長が見られなかつた。なお、全群において、細胞外 collagen I が microgroove 部に残存していることが確認された（Fig. 32C）。以上の結果より、軸索膜上の SPARC が、道しるべタンパク質である細胞外 collagen I と相互作用することが、軸索の方向特異的な再伸長に直接寄与することが証明された。

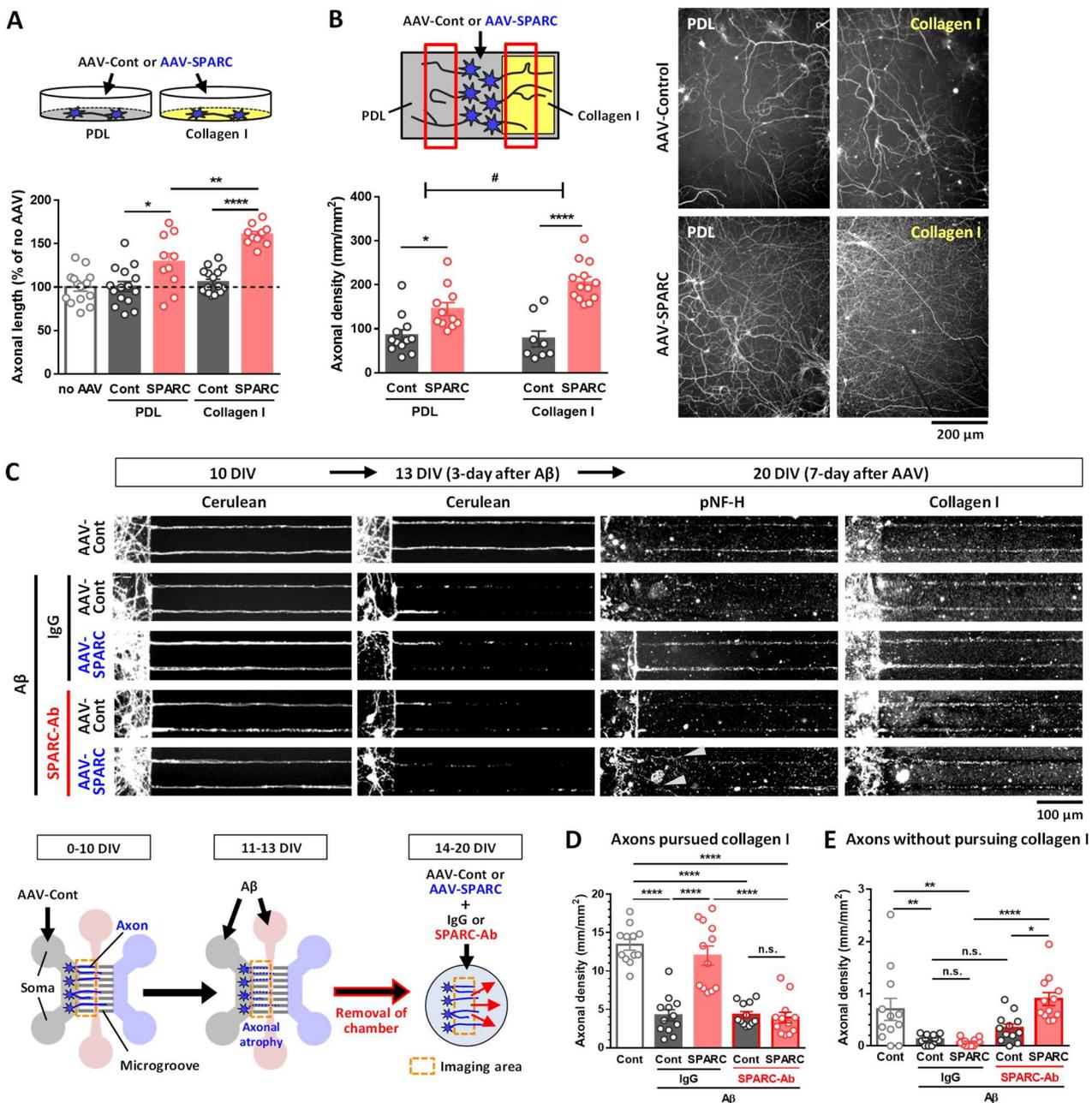


Fig. 32: SPARC-collagen Iによる方向特異的な軸索再伸長作用

A, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞を PDL または collagen I コーティングされた dish 上に播種し、AAV-Control または AAV-SPARC (5×10^6 GC/ μ l) を 7 日間処置した。抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色で pNF-H 陽性軸索長を定量した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 10-17$ photos.

B, PDL 及びコラーゲン I を培養 dish の左及び右側にコーティングし、中央部分に ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞を播種後、AAV-Control または AAV-SPARC (5×10^6 GC/ μ l) を処置した。その 14 日後に、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色で pNF-H 陽性軸索長を定量した。* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA; # $p < 0.05$, two-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, 8-13 images. A significant SPARC \times collagen I interaction was found using repeated-measures two-way ANOVA [$F(1, 40) = 5.81$, $p = 0.0206$].

C-E, Triple neuron device チャンバーの細胞体スペース (灰色) に ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞を播種し、 5×10^7 GC/ μ l AAV-Control を 10 日間処置した。10 DIV (days in vitro) に蛍光イメージングを用いて、microgroove 内の Cerulean 陽性軸索を観察した。その後、 $A\beta_{25-35}$ (2.5 μ M) を細胞体スペース (灰色) 及び軸索スペース (ピンク) に 3 日間処置した。13 DIV の蛍光イメージングより、元々 microgroove 内に伸びていた Cerulean 陽性軸索が $A\beta_{25-35}$ によって萎縮されたことを確認した。その後、チャンバーを培養 dish から取り外し、 5×10^6 GC/ μ l AAV-Control または AAV-SPARC を 2 μ g/ml SPARC 中和抗体 (SPARC-Ab) または normal IgG (IgG) と共に処置した。20DIV において、抗 pNF-H 抗体及び抗 collagen I 抗体による蛍光免疫染色を行い、細胞外 collagen I を辿った軸索長 (**D**) 及び細胞外 collagen I を辿らなかった軸索長 (**E**) をそれぞれ定量した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, 12 photos.

[Yang & Tohda, 2023a より引用、一部改変]

2.3.14. Diosgenin 処置が海馬神経細胞の Galectin-1 の発現量に及ぼす影響の検討

ここまでの実験により、diosgenin による方向特異的な軸索再伸長に関わる重要な機能分子の 1 つとして、SPARC の役割を明らかにした。一方で、diosgenin による脳での方向特異的な軸索再伸長に関わる 2 つ目の候補遺伝子として、*Lgals1* が同定されていた (2.3.4. 参照)。*Lgals1* 遺伝子は、Galectin-1 (以下略: Gal-1) タンパク質をコードしている。細胞外 Gal-1 が末梢神経の軸索再生を促進すること (Horie et al., 1999; McGraw et al., 2004)、Gal-1 ノックアウトマウスでは記憶障害が生じること (Sakaguchi et al., 2011) が報告されているが、神経細胞中における Gal-1 の増加が脳での軸索再伸長や記憶障害の改善に寄与するかどうかは不明だったため、興味深い本タンパク質についても SPARC と同様に機能解析することとした。

まず、diosgenin 処置による Gal-1 の発現量変化の再現性がタンパク質レベルで観察されるかどうかについて、ddY マウス (E14) の海馬神経細胞を用いて検討した。3 日間初代培養した海馬神経細胞に溶媒または diosgenin (1 μ M) を処置し、その 4 日後にタンパク質を抽出後、western blot を用いて Gal-1 の発現量を比較した。その結果、溶媒処置群と比べて diosgenin を処置した海馬神経細胞では、Gal-1 の発現量が有意に増加した (Fig. 33)。したがって、diosgenin によって神経細胞中の Gal-1 がタンパク質レベルでも増加することが確認された。

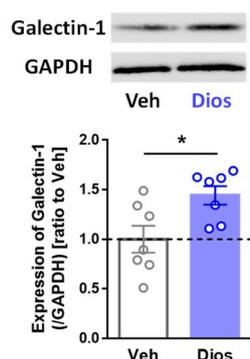


Fig. 33: 海馬培養神経細胞への diosgenin 処置による Gal-1 の発現量変化

3 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に溶媒または diosgenin (1 μ M) を 4 日間処置した。細胞 lysate を作成し、western blot で Gal-1 及び GAPDH の発現量を測定し、Gal-1/GAPDH の発現量を算出した。* $p < 0.05$, two-tailed unpaired *t*-test, mean \pm SEM, vehicle (Veh), $n = 7$; diosgenin (Veh), $n = 7$ lysates.

2.3.15. 海馬培養神経細胞での Gal-1 過剰発現による軸索伸長作用の検討

Diosgenin による神経細胞中の Gal-1 の発現量を増加させることが示された。そこで、Gal-1 の増加が軸索伸長に直接寄与するかどうかを検討するために、SPARC と同様に AAV9 ベクターを用いて、Gal-1 を神経細胞特異的に過剰発現する実験を行った。

神経細胞特異的なプロモーター *Syn1* 下で、mouse *Lgals1* 及び Cerulean を発現する AAV9 ベクター (AAV-Gal-1)、または *Syn1* 下で Cerulean のみを発現するコントロール AAV9 ベクター (AAV-Control) をベクタービルダー社より購入した。海馬神経細胞に、溶媒または 5×10^5 または 5×10^6 GC/ μ L AAV-Control または AAV-Gal-1 を処置し、その7日後に抗 Gal-1 抗体、抗 Map2 抗体、及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、Map2 陽性神経細胞中における Gal-1 の発現量は、AAV-Control と比べて AAV-Gal-1 処置により、有意に増加し (Fig. 34A, B)、Gal-1 の過剰発現が誘発された。またこの際、Gal-1 の過剰発現により、pNF-H 陽性の軸索長が有意に増加した (Fig. 34C, D)。以上より、海馬培養神経細胞における Gal-1 の過剰発現が、直接軸索伸長に関わることが示された。

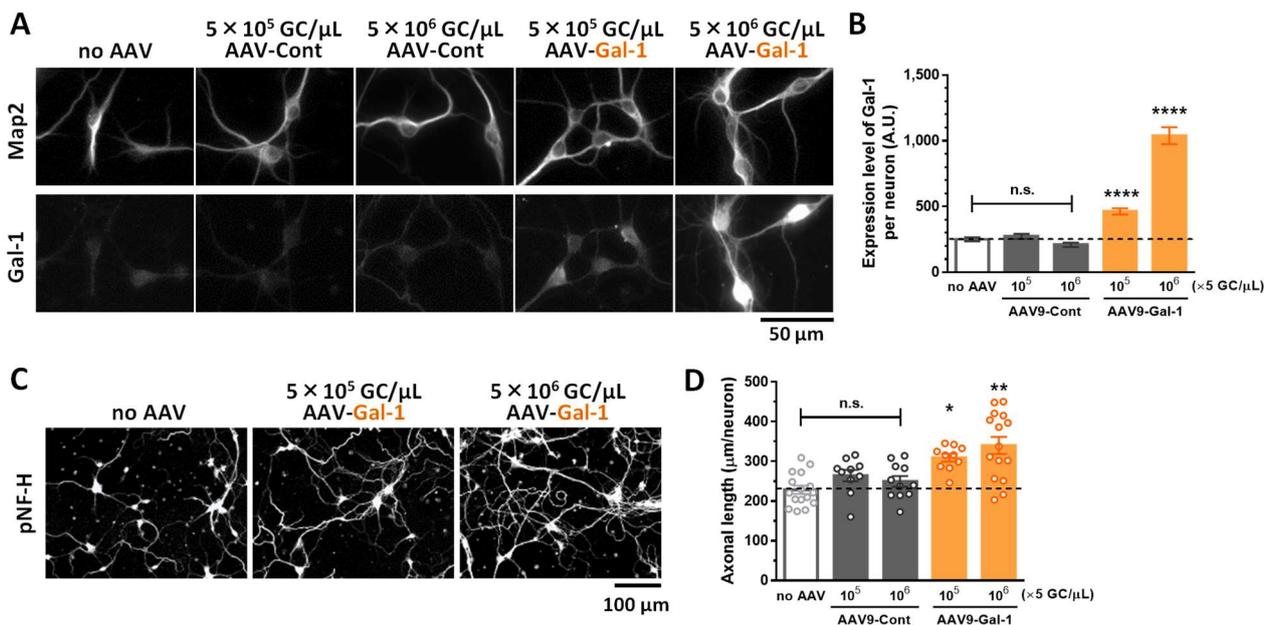


Fig. 34: 海馬培養神経細胞での Gal-1 過剰発現による軸索伸長作用

ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に、 5×10^5 または 5×10^6 GC/ μ L の AAV-Control (AAV9-Syn1-Cerulean-WPRE) または AAV-Gal-1 (AAV9-Syn1-mLgals1-IRES-Cerulean-WPRE) を7日間処置し、抗 Gal-1 抗体及び抗 Map2 抗体 (A, B)、または抗 pNF-H 抗体 (C, D)による蛍光免疫染色を行った。

A, B, Map2 陽性神経細胞中での Gal-1 の発現量を定量した。**** $p < 0.0001$ vs same concentration of AAV-Control, one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 248$ –511 neurons.

C, D, pNF-H 陽性軸索長を定量した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs same concentration of AAV-Control, one-way ANOVA with *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 10$ –16 photos.

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.16. 海馬神経細胞での Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウスの記憶改善作用の検討

海馬培養神経細胞における Gal-1 の過剰発現が、軸索伸長に寄与することが示された。そこで次に、海馬神経細胞における Gal-1 の過剰発現が 5XFAD マウスの記憶障害を改善するかどうかを評価した。

まず、前述の AAV-Gal-1 ベクターが、マウスの海馬神経細胞において Gal-1 の過剰発現を誘発するかどうかの基礎検討を行った。Wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側海馬 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入した。その 21 または 28 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 Gal-1 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った（Fig. 35）。その結果、全てのマウスにおいて、CA1 領域では AAV 由来の Cerulean 蛍光が検出された。またこの際、少なくとも AAV 注入より 21（Fig. 35A）及び 28（Fig. 35B）日後において、AAV-Gal-1 注入によって Gal-1 の発現量が CA1 において顕著に増加することが確認された。Gal-1 が NeuN 陽性神経細胞とその周囲領域の両方で増加したことから、Gal-1 はまず AAV の *Syn1* プロモーターによって神経細胞特異的に過剰発現され、その後神経細胞で合成された Gal-1 が周囲に分泌される可能性を考えている。また、Gal-1 と NeuN の染色反応のプロセスで二次抗体のみを用いた蛍光免疫染色では、Gal-1 及び NeuN のどちらのシグナルも検出されず、Gal-1 及び NeuN の染色は一次抗体の抗原への結合を反映していることを確認した（Fig. 35）。

続いて、wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、AAV 注入より 21 日後に物体認知記憶試験を行った（Fig. 36A）。その結果、AAV-Gal-1 の注入によって 5XFAD マウスの物体認知記憶は有意に改善した。続いて、これらマウスについて、AAV 注入より 26 日後に空間記憶試験を行った（Fig. 36B）。その結果、AAV-Gal-1 の注入によって 5XFAD マウスの物体認知記憶も有意に改善した。さらに、AAV 注入より 28 日後に自発運動試験を行った（Fig. 36C-E）。その結果、AAV 注入によるマウスの自発運動（総移動距離、進行方向に対する方向転換角度、不動時間）に群間差は認められなかった。また、AAV 注入によってマウスに顕著な体重変化も見られなかった（Fig. 36F）。以上の結果より、海馬神経細胞における Gal-1 の過剰発現によって、5XFAD マウスの記憶障害が改善することが明らかとなった。

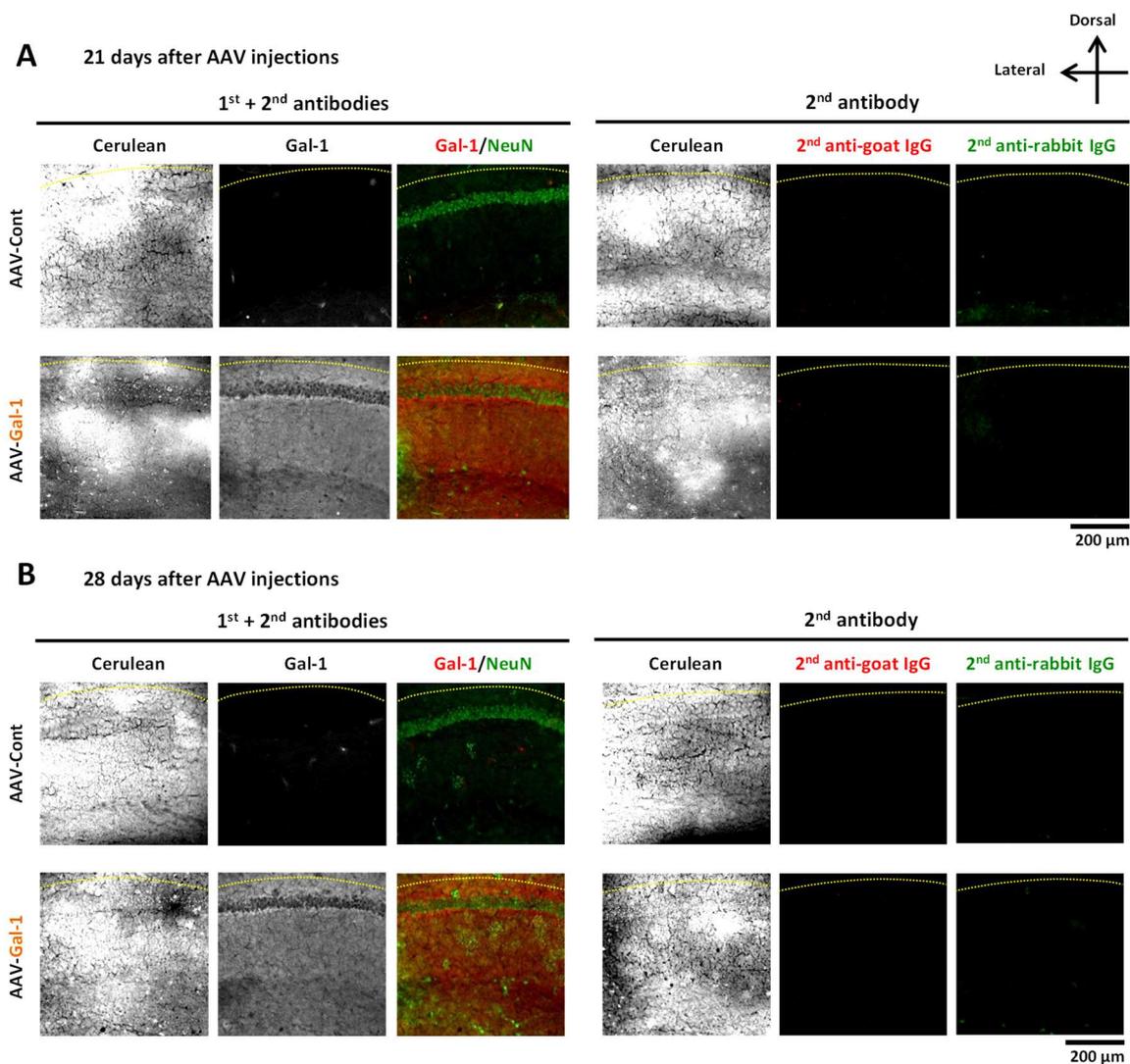


Fig. 35: AAV-Gal-1 注入によるマウス脳内での Gal-1 過剰発現の確認

Wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 に、 1×10^{10} GC/site AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入した。AAV 注入より 21 (A) または 28 (B) 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて抗 Gal-1 抗体及び抗 NeuN 抗体による蛍光免疫染色を行った。抗 Gal-1 抗体と抗 NeuN 抗体の二次抗体（2nd anti-goat IgG, 2nd anti-rabbit IgG）のみを染色に用いた場合には、Gal-1 と NeuN のシグナルは検出されなかった。[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

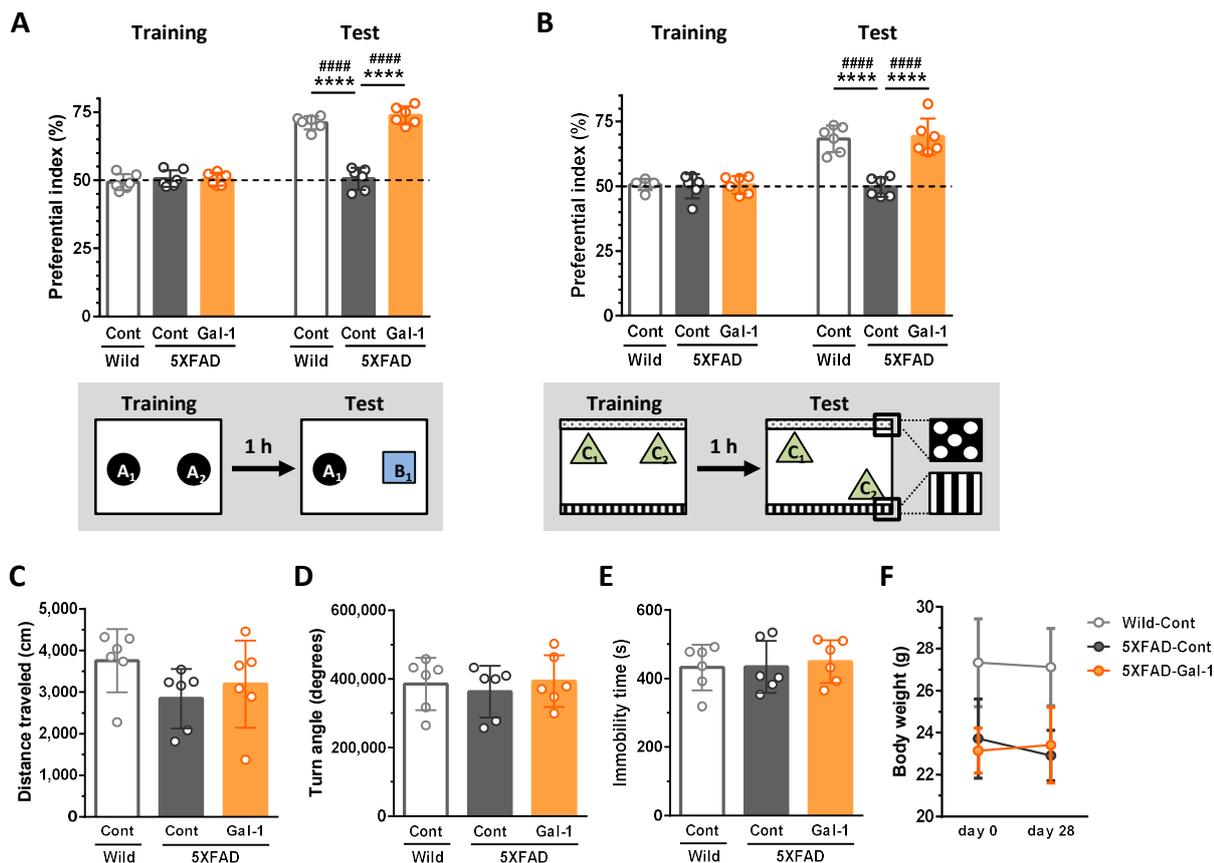


Fig. 36: 海馬神経細胞での Gal-1 の過剰発現による 5XFAD マウスの記憶障害改善作用

Wild-type マウス及び 5XFAD マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の両側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入した。

A, B, AAV 注入より 21 日後に物体認知記憶試験 (**A**)、27 日後に空間記憶試験 (**B**) をそれぞれ行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。新奇物体または位置を移動した物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。**** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test. A significant drug \times test interaction was found using repeated measures two-way ANOVA [(**A**) $F(2, 15) = 44.47, p < 0.0001$, (**B**) $F(2, 15) = 15.35, p = 0.0002$]. ##### $p < 0.00001$, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

C-F, AAV 注入より 28 日後に自発運動試験を行った。10 分間の自由行動をさせ、総移動距離 (**C**)、進行方向に対する方向転換角度 (**D**) 及び不動時間 (**E**) それぞれを測定した。 $p > 0.05$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 6$ mice. (**F**) AAV 注入によるマウスの体重推移。 $p > 0.05$, repeated-measures two-way ANOVA, mean \pm SD, $n = 6$ mice.

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.17. Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウス海馬—前頭前野における軸索再伸長作用の検討

HPC 神経細胞における Gal-1 の過剰発現が、5XFAD マウスの記憶障害を改善することが明らかになったことから、続いて、Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウス HPC—PFC における軸索再伸長作用について、2 色の逆行性トレーサーを用いた標識実験で検討した。

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）に対し、逆行性トレーサー-Dextran (3000 MW) Texas Red (赤) を右側 PFC に注入した。続いて右側 CA1 領域に、 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、その 21 日後に右側 PFC に 2 色目の逆行性トレーサー-Dextran (3000 MW) FITC (緑) を注入した (Fig. 37A)。その 7 日後に脳を摘出し、CA1 及び CA3 における逆行性トレーサー陽性細胞数をそれぞれ定量した (Fig. 37B)。

その結果、CA1—PFC において、軸索が再伸長した細胞 (Texas Red 陰性かつ FITC 陽性) 数は、Gal-1 過剰発現により有意に増加することが示された (Fig. 37C)。また、AAV が注入された期間中に軸索が萎縮した細胞 (Texas Red 陽性かつ FITC 陰性) 数は、wild-type と比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群で有意に増加したが、Gal-1 を過剰発現した 5XFAD マウスでは有意に減少した (Fig. 37D)。また、軸索が萎縮も伸長もしなかった naïve 細胞 (Texas Red 陽性かつ FITC 陽性) 数は、5XFAD マウスの AAV-Control 群と比べて AAV-Gal-1 群で有意に増加した (Fig. 37E)。また、5XFAD マウスの AAV-Control 群と AAV-Gal-1 群間では、元々 PFC に軸索投射する細胞 (全 Texas Red 陽性) 数に差がなく、また両群とも wild-type マウスと比べて有意に低かったことから (Fig. 37F)、AAV 注入前の段階において、5XFAD マウスの両群では同程度の軸索萎縮が起こっていたものと考えられる。また、AAV 注入後に CA1—PFC において軸索投射していた細胞 (全 FITC 陽性) 数は、Gal-1 を過剰発現した 5XFAD マウスで wild-type マウスと同程度にまで有意に増加したことから、Gal-1 過剰発現によって 5XFAD マウスでは wild-type マウスに匹敵するほどの軸索投射が起きていることが示唆された (Fig. 37G)。一方、定量した CA1 領域の面積は群間で差はなかった (Fig. 37H)。

CA3 領域においても AAV 由来の Cerulean 蛍光が検出されたことから、CA3—PFC においても定量を行った。その結果、Gal-1 の過剰発現によって全ての項目において CA1—PFC と同様の作用が検出された (Fig. 38)。以上より、HPC 神経細胞において Gal-1 を過剰発現した場合でも、SPARC と同様に、5XFAD マウスの HPC—PFC において一度萎縮した軸索が長距離、かつつながるべき脳部位に向かって再伸長することが示された。

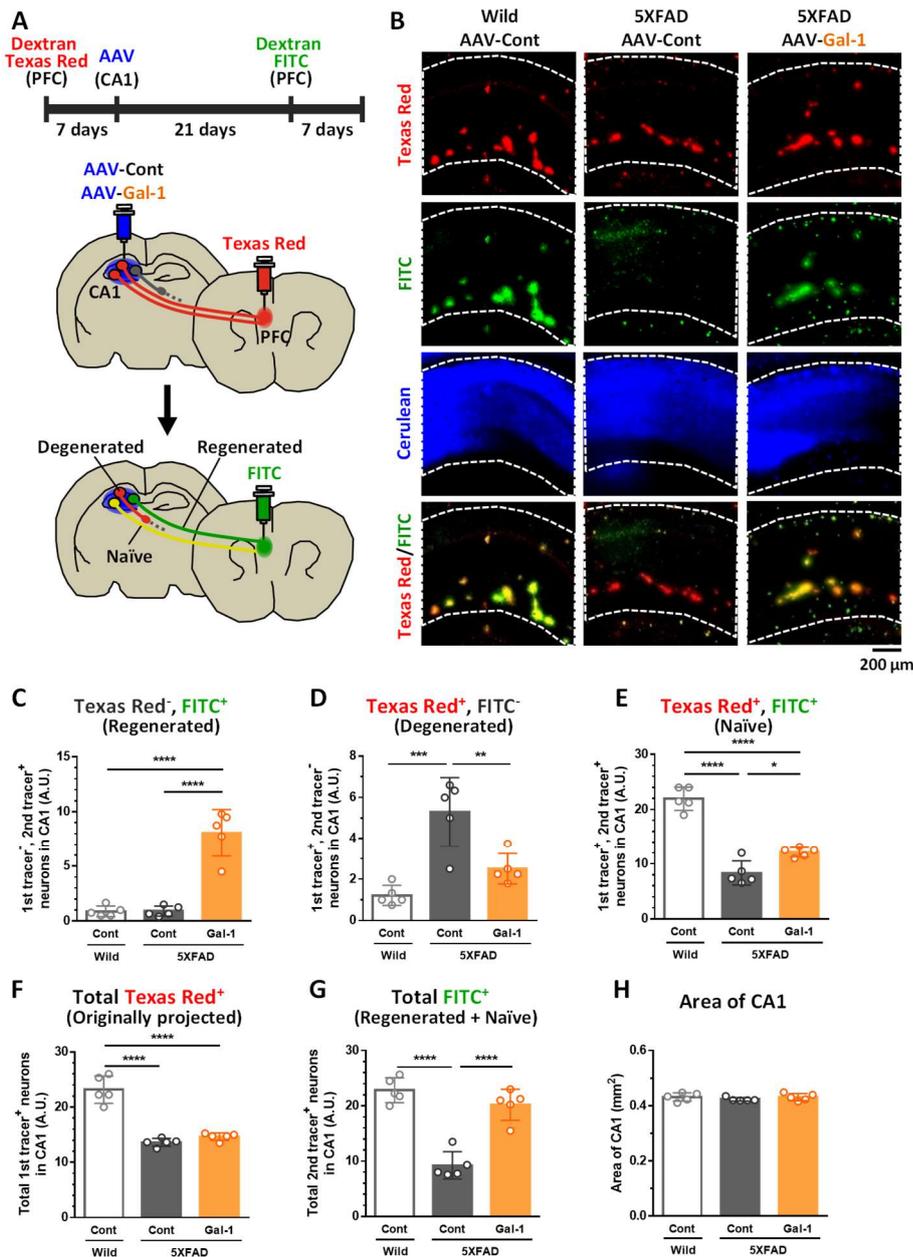


Fig. 37: Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウスの CA1—PFC における軸索再伸長作用

A, B, 5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7–9 ヶ月齢）の右側 PFC に Dextran Texas Red を注入した。その 7 日後に、右側 CA1 領域に 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、AAV 注入より 21 日後に Dextran FITC を PFC の同部位に注入した。その 7 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて各逆行性トレーサー陽性の細胞数を定量した。**(B)** 各群の右側 CA1 における逆行性トレーサー（Texas Red 及び FITC）を示す。**C–H,** 右側 CA1 における **(C)** Texas Red 陰性かつ FITC 陽性の細胞数、**(D)** Texas Red 陽性かつ FITC 陰性の細胞数、**(E)** Texas Red 陽性かつ FITC 陽性の細胞数、**(F)** 全 Texas Red 陽性細胞数、**(G)** 全 FITC 陽性細胞数、**(H)** 定量した CA1 の面積。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 5$ mice.

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

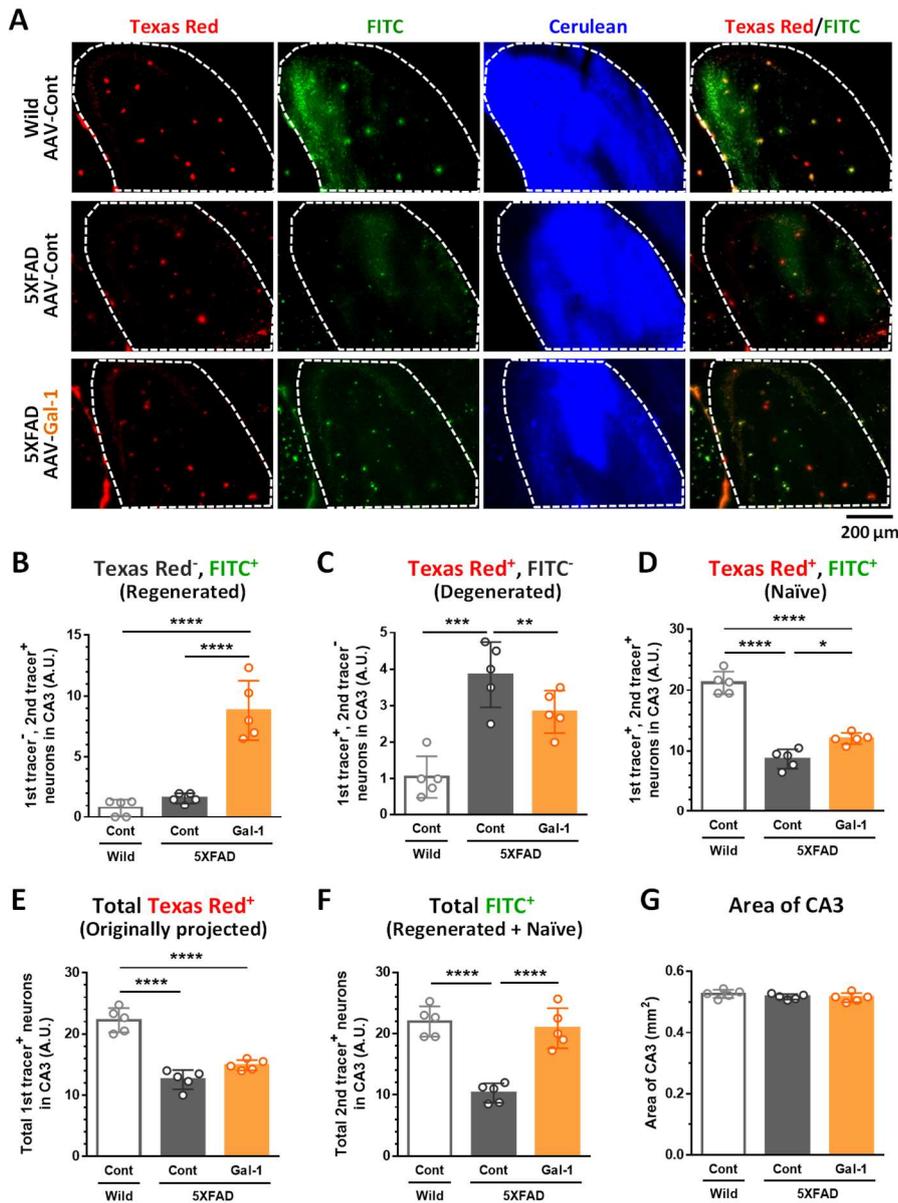


Fig. 38: Gal-1 過剰発現による 5XFAD マウスの CA3—PFC における軸索再伸長作用

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）の右側 PFC に Dextran Texas Red を注入した。その 7 日後に、右側 CA3 領域に 1×10^{10} GC/site の AAV-Control または AAV-Gal-1 を注入し、AAV 注入より 21 日後に Dextran FITC を PFC の同部位に注入した。その 7 日後に脳を摘出し、脳切片を用いて各逆行性トレーサー陽性の細胞数を定量した。(A) AAV 由来の Cerulean 蛍光が CA3 にも広がっている様子を確かめられた。右側 CA3 における (B) Texas Red 陰性かつ FITC 陽性の神経細胞数、(C) Texas Red 陽性かつ FITC 陰性の神経細胞数、(D) Texas Red 陽性かつ FITC 陽性の神経細胞数、(E) 全 Texas Red 陽性神経細胞数、(F) 全 FITC 陽性神経細胞数、(G) 定量した CA3 の面積。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 5$ mice. [Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.18. Diosgenin 処置が海馬神経細胞の Gal-1 の局在及び発現量に及ぼす影響の検討

神経細胞において、Gal-1 がどのような分子機序を介して方向特異的な軸索再伸長に関わるのかを予想するために、まずは A β 及び diosgenin 処置における海馬神経細胞の Gal-1 局在及び発現変化を検討した。

3日間培養した海馬神経細胞に A β_{25-35} (1.25, 2.5, or 5 μ M) または negative control A β_{35-25} (1.25, 2.5, or 5 μ M) を3日間処置し、溶媒または diosgenin (1 μ M) を処置した。その4日後に抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 39A)。その結果、control 群では、神経細胞体および軸索上で Gal-1 の発現が見られたが、2.5 μ M A β_{25-35} 処置によって軸索上の Gal-1 発現が有意に減少した (Fig. 39B: 白矢頭)。5 μ M A β_{25-35} 処置群では、顕著な神経細胞死が誘発されたため、軸索の定量は行えなかった。一方、A β_{35-25} 処置は、軸索上の Gal-1 の発現量に影響を与えなかった (Fig. 39A, B)。

次に、diosgenin が軸索上の Gal-1 の発現量に及ぼす影響、及びその発現量変化が 1,25D₃-MARRS を介して起こるかどうかを検討した。3日間培養した海馬神経細胞に A β_{25-35} (2.5 μ M) を3日間処置し、1,25D₃-MARRS 中和抗体または normal rabbit IgG を diosgenin (1 μ M) と共に処置した。その4日後に抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、diosgenin 処置によって軸索上の Gal-1 の発現量は有意に増加したが、1,25D₃-MARRS 中和抗体処置により diosgenin による Gal-1 の増加は消失した (Fig. 39C)。このことから、diosgenin は A β によって減少した軸索上での Gal-1 の発現を増加させることと、この Gal-1 の増加が 1,25D₃-MARRS シグナルを介して起こることが示唆された。

続いて、diosgenin 投与が 5XFAD マウス脳内の HPC—PFC において、軸索上の Gal-1 を増加させるかどうかを検討するために、HPC から PFC に投射する軸索を順行性トレーサー BDA により標識し、BDA 陽性軸索上における Gal-1 の発現を検討した。Wild-type 及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) に溶媒または diosgenin (0.1 μ mol/kg/day) を21日間連続で経口投与した。薬物投与14日目に BDA を右側 CA1 に注入し、HPC—PFC の神経回路を標識した。まず、海馬 CA1 に BDA が注入されていることが確認された (Fig. 40A)。また、抗 Gal-1 抗体及び DAPI による蛍光免疫染色を行ったところ (Fig. 40B)、PFC における BDA 陽性軸索の面積は、wild-type マウスに比べて 5XFAD マウスの溶媒投与群で有意に減少し (Fig. 40C)、また diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは有意に増加することが示され (Fig. 40C)、Fig. 30D の再現性が確認された。この際、wild-type マウスの PFC では、BDA 陽性軸索において Gal-1 が高発現していたが (Fig. 40B)、溶媒を投与した 5XFAD マウスでは、Gal-1 を発現する軸索数が有意に減少した (Fig. 40D)。一方、diosgenin を投与した 5XFAD マウスでは、Gal-1 を発現する BDA 陽性軸索数は wild-type マウスとほとんど同レベルにまで有意に増加した (Fig. 40D)。以上の結果より、diosgenin によって再伸長している軸索上では、Gal-1 の発現が高いことが示唆された。

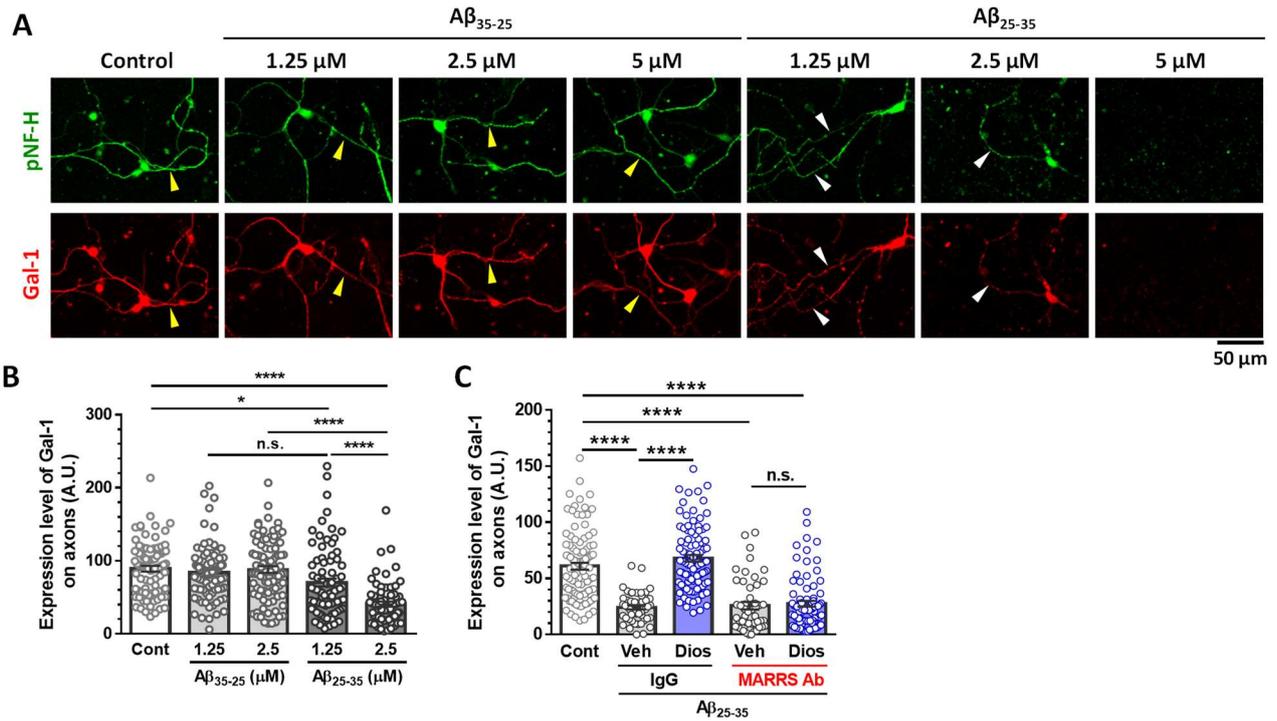


Fig. 39: Diosgenin 処置された海馬培養神経細胞における Gal-1 の局在及びその発現変化

A, B, 3 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に Aβ₂₅₋₃₅ (1.25, 2.5, or 5 μM) または negative control Aβ₃₅₋₂₅ (1.25, 2.5, or 5 μM) を 3 日間処置し、その後、通常の培地で 4 日間培養した。抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、軸索上での Gal-1 の発現量を測定した。Aβ₂₅₋₃₅ 処置群では、軸索上の Gal-1 の発現が低かった（白矢頭）。**p* < 0.05, *****p* < 0.0001, one-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test, mean ± SEM, *n* = 70–89 axons.

C, 3 日間培養した ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に Aβ₂₅₋₃₅ (2.5 μM) を 3 日間処置した。その後、normal rabbit IgG (Control Ab) または 1,25D₃-MARRS 中和抗体 (MARRS Ab) を処置し、15 分後に diosgenin (1 μM) を処置した。その 4 日後に、抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、軸索上の Gal-1 の発現量を測定した。*****p* < 0.0001, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean ± SEM, *n* = 49–100 axons.

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

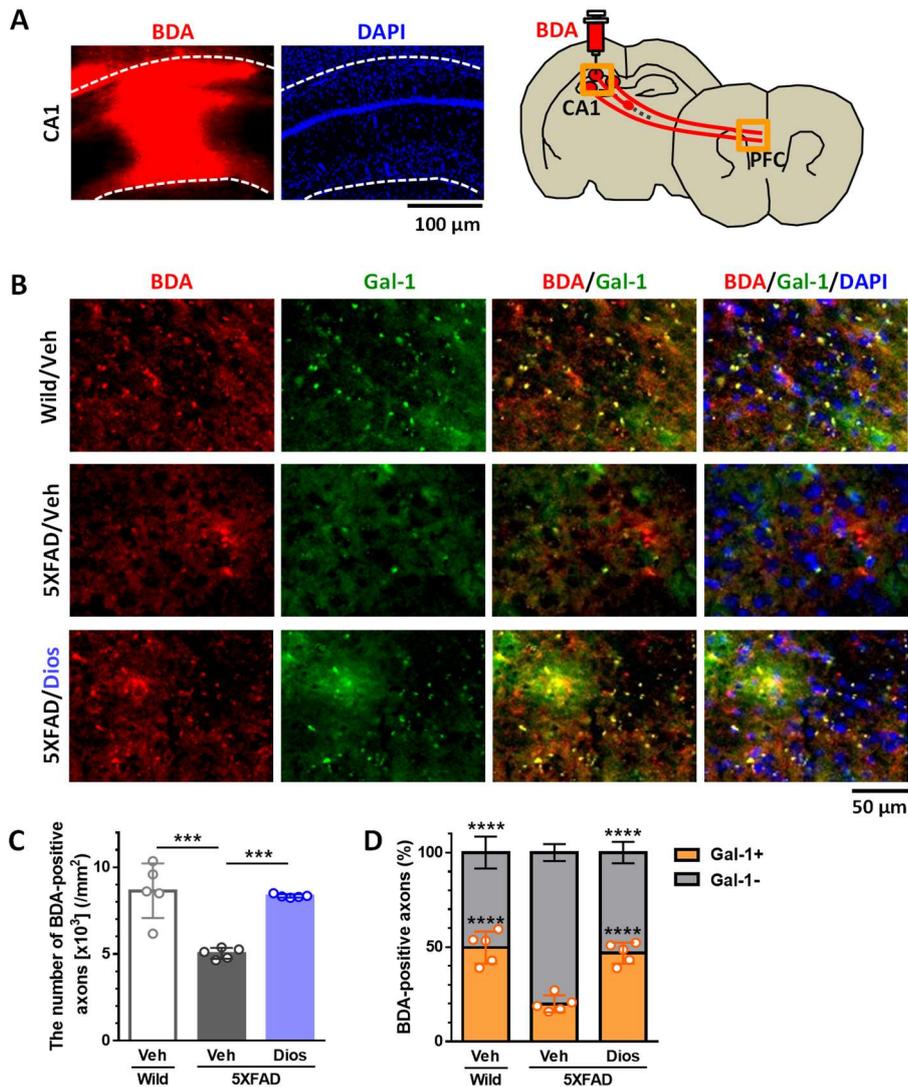


Fig. 40: HPC—PFC おける diosgenin による Gal-1 の局在及びその発現変化

5XFAD マウス及び wild-type マウス（雌性、7-9 ヶ月齢）に溶媒または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) を 21 日間経口投与し、薬物投与 14 日目に右側 CA1 に BDA を注入した。脳を摘出後、脳切片を用いて抗 pNF-H 抗体及び抗 Gal-1 抗体による蛍光免疫染色を行った。

A, BDA 注入部位 (CA1) を示す。

B, 各群の PFC における BDA 及び Gal-1、DAPI の染色像。

C, D, PFC における BDA 陽性軸索数 (**C**) 及び全 BDA 陽性軸索のうち Gal-1 陽性または Gal-1 陰性軸索数の割合 (**D**) を定量した。*** $p < 0.001$ vs 5XFAD/Veh, one-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 5$ mice.

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.19. 海馬神経細胞の軸索に発現する Gal-1 の方向特異的な軸索再伸長への寄与

正常海馬神経細胞の軸索上には Gal-1 が高発現するが、A β によってそれが減少し、diosgeninによって再び軸索上で Gal-1 が増加した結果より、軸索上の Gal-1 が軸索を正しい投射先 (PFC) まで誘導していると予想し、詳細な分子メカニズムの解明を目指した。そこでまず、Gal-1 の軸索上における局在の詳細を検討するために、細胞膜非透過処理の蛍光免疫染色を行った。

蛍光免疫染色による Gal-1 の検出感度を高めるために、海馬神経細胞に 5×10^7 GC/ μ l AAV-Gal-1 を 7 日間処置し、抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による細胞膜透過 (Permeable) または非透過処理 (Non-permeable) の蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した (Fig. 41A)。神経細胞体 (黄色アスタリスク) 及び軸索の形態は、AAV 由来の Cerulean 蛍光によって検出した。その結果、Gal-1 は神経細胞体や軸索側枝上だけでなく、軸索終末部の成長円錐 (青矢頭) にも高発現していた。さらに、成長円錐での Gal-1 は、細胞膜非透過処理の蛍光免疫染色でも検出されたことから、Gal-1 が成長円錐の膜上で発現することが示唆された。一方、細胞質タンパク質である pNF-H は、細胞膜非透過処理の蛍光免疫染色で検出されなかったことから、本手法により蛍光免疫染色に用いる抗体が確かに細胞質内に透過していないことが確認された。

この結果より私は、成長円錐膜上に発現する Gal-1 が、HPC 神経細胞の軸索投射先である PFC 神経細胞から分泌される何かしらの軸索誘導因子 (液性因子) を感知する受容体様にはたらき、HPC—PFC における軸索誘導に寄与する可能性を考えた。本仮説を検証するために、Gal-1 を過剰発現した HPC 神経細胞の成長円錐側からのみ、PFC 神経細胞の培養上清 (conditioned media; CM) を処置し、Gal-1 による軸索伸長が促進されるかどうかを検討した。海馬神経細胞を neuron device チャンバーの細胞体スペース内 (Soma; 灰色) に播種し、AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を処置した (Fig. 41B)。なお、Gal-1 の過剰発現と PFC CM の処置による軸索伸長作用の相加・相乗効果が見られるように、AAV-Gal-1 の処置濃度は、軸索伸長作用が最大に達しないよう低濃度の 5×10^5 GC/ μ l とした。同時に、チャンバーの軸索投射部 (Axonal site; ピンク) より、PFC CM を添加した。PFC CM は、7 日間培養した前頭皮質の神経細胞より採取した。チャンバー内で 7 日間培養後、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、microgroove 部 (M)、軸索投射部 (A)、及びその total の軸索密度を算出した (Fig. 41C–E)。その結果、AAV-Control 群において、PFC CM (-) に比べて PFC CM (+) では軸索伸長が有意に促進されることが示された (Fig. 41C–E)。つまり、HPC 神経細胞の軸索は、PFC 神経細胞から分泌される何かしらの因子に誘引されることが示唆された。また興味深いことに、AAV-Gal-1 群では AAV-Control 群と比べて、PFC CM による軸索誘導が有意に促進された (Fig. 41C–E)。これは、軸索円錐上に局在する Gal-1 が、PFC CM 中の因子と相互作用し、HPC—PFC における軸索誘導を促進することを示唆する結果である。なお、Gal-1 過剰発現によってチャンバー内の神経細胞数に変化がなかったことから (Fig. 41F)、本研究で検出されたチャンバー内での軸索密度の増加は、Gal-1 過剰発現による軸索伸長作用を反映しているものと考えられる。

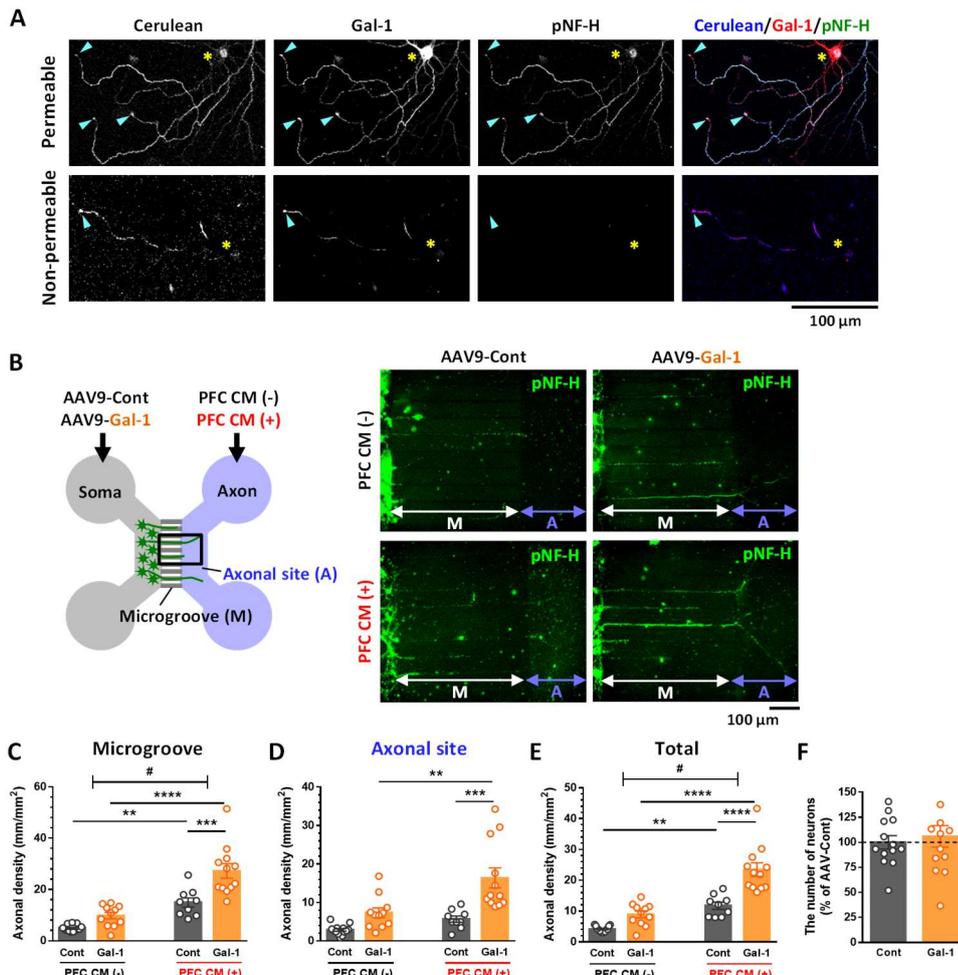


Fig. 41: 海馬神経細胞に局在する Gal-1 の PFC への方向特異的な軸索再伸長への寄与

A, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に AAV-Gal-1 (5×10^7 GC/ μ l) を 7 日間処置し、抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による細胞膜透過（染色時に界面活性剤あり）または細胞膜非透過（染色時に界面活性剤なし）の蛍光免疫染色を行った。撮影画像は共焦点顕微鏡より取得した。Gal-1 は成長円錐内及び膜上に局在していた（青色矢頭）。神経細胞体は黄色アスタリスクで示す。

B–E, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞を neuron device チャンバーの細胞体スペース（Soma; 灰色）に播種し、AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を Soma 部に処置した。同時に、PFC 神経細胞の CM（7 日間初代培養された前頭皮質神経細胞より回収）を軸索投射部（Axonal site; 青色）に処置し、7 日間培養した。その後、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。（**C**） microgroove (M)、（**D**） axonal site (A)、及び（**E**） その total における pNF-H 陽性軸索密度を算出した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test; # $p < 0.05$, PFC CM (-) vs PFC CM (+), two-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test; mean \pm SEM, $n = 9\text{--}13$ images.

F, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を 7 日間処置し、抗 Map2 抗体による蛍光免疫染色を行った。一定面積内における Map2 陽性神経細胞数を定量した。 $p > 0.05$, unpaired *t*-test, mean \pm SEM, $n = 13$ images. [Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.20. PFC 神経細胞より分泌される軸索誘導因子の探索

HPC 神経細胞の軸索円錐膜上に局在する Gal-1 が、PFC 神経細胞より分泌される何かしらの液性因子と相互作用し、HPC—PFC における軸索誘導を促進することが示唆されたため、次に Gal-1 と相互作用する軸索誘導因子の同定を試みた。

HPC 神経細胞は、PFC には多く軸索投射するものの、小脳 (Cerebellum) にはほとんど軸索投射しないことが報告されている (Oh et al., 2014)。したがって、PFC 神経細胞と比べて Cerebellum 神経細胞から全く分泌がない液性因子が、前述の軸索誘導因子候補になりうるのではないかと考えた。そこで、PFC 神経細胞または Cerebellum 神経細胞 (negative control) を 7 日間培養し、それぞれの CM を回収した。両神経細胞から得た CM を用いて、SDS-PAGE 及び銀染色を用いて、PFC CM では発現があるものの Cerebellum CM では発現がないタンパク質を網羅的に探索した (Fig. 42A)。分子量 50 k 前後のタンパク質 (赤矢印) は、PFC CM でのみ発現が見られ、Cerebellum CM では全く検出されなかった。他にも Cerebellum CM では PFC CM と比べていくつかのタンパク質の発現が低下していたが、発現量がゼロではなかった。50 k のバンドに含まれるタンパク質を nano-LC-MS/MS で同定したところ、Secernin-1 であると示唆された (coverage: 2%, score: 36)。

続いて、銀染色における Secernin-1 の発現量の再現性を確認するために、前段と同様にサンプルを作製し、抗 Secernin-1 抗体及び抗 β -actin 抗体を用いた western blot を行った (Fig. 42B)。その結果、PFC CM と比べて Cerebellum CM では、Secernin-1 の発現が顕著に減少することが確認され、銀染色の結果と一致した (Fig. 42C)。一方、細胞質 lysate における Secernin-1 の発現量は、PFC 及び Cerebellum の両神経細胞において、ほとんど差がなく検出された (Fig. 42D)。また、細胞質にのみ発現するタンパク質である β -actin は CM 中では検出されなかったため、CM の回収時に細胞質中のタンパク質が混在した可能性が低いことが確認された。以上の結果から、Secernin-1 は PFC と Cerebellum の両神経細胞で合成されるが、おそらく両神経細胞における分泌機構が異なっており、それによって PFC 神経細胞から多く分泌されるのではないかと考える。

PFC 神経細胞から分泌される Secernin-1 が、HPC 神経細胞に対する新規軸索誘導因子の候補になりうるかを検討するために、まずは遊離型 Secernin-1 の HPC 神経細胞に対する軸索伸長作用を検討した (Fig. 42E)。海馬神経細胞に溶媒または 1、10、100 ng/ml リコンビナント Secernin-1 (rSecernin-1) を処置し、7 日後に抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。その結果、1–100 ng/mL rSecernin-1 いずれを処理した神経細胞においても、溶媒処置と比較して pNF-H 陽性の軸索長が有意に増加した (Fig. 42F)。したがって、遊離型 (細胞外) Secernin-1 が、HPC 神経細胞の軸索伸長を促進することが示された。

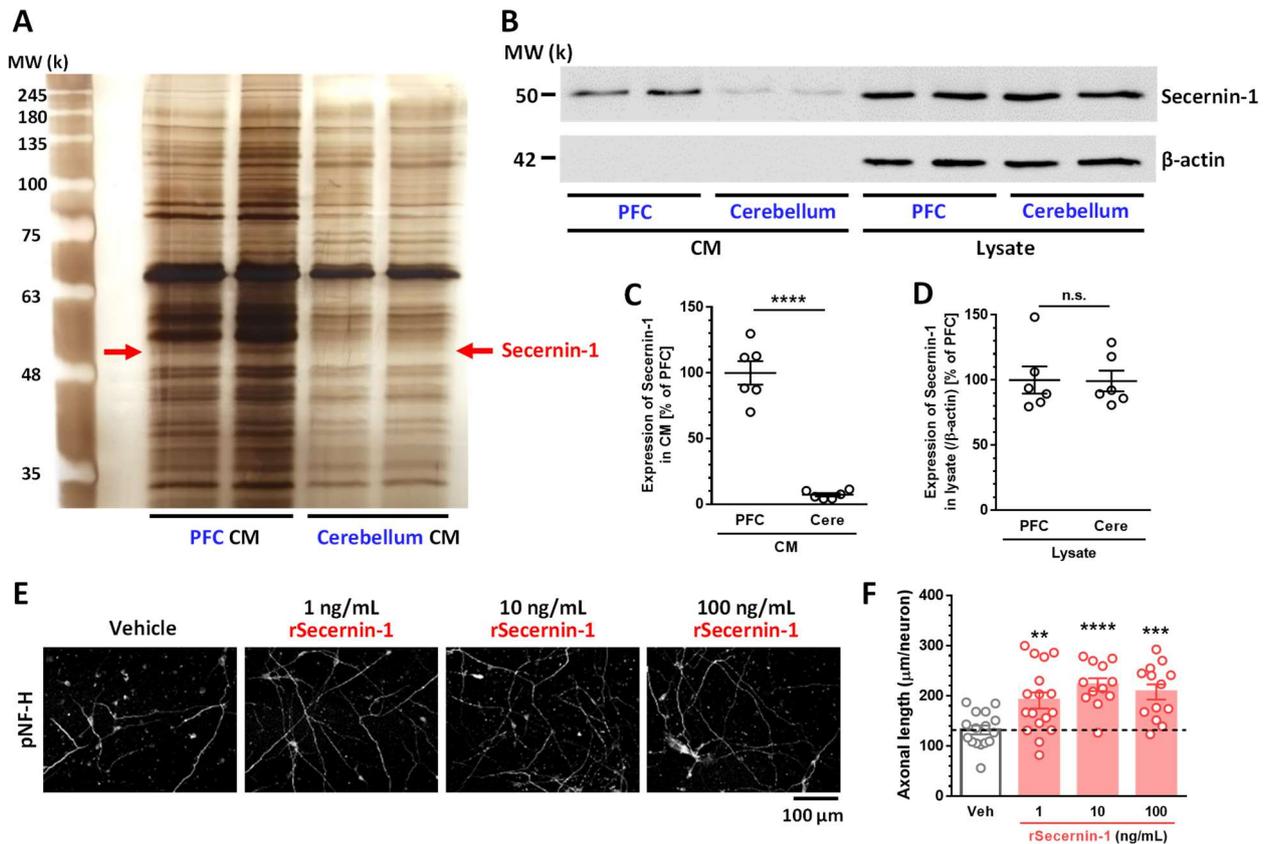


Fig. 42: PFC 神経細胞より分泌される軸索誘導因子候補の探索

A, ddY (E14) マウスより前頭皮質 (PFC) または小脳 (Cerebellum) 初代培養神経細胞を単離し7日間培養した。両神経細胞より回収した CM を用いて銀染色を行った。赤矢印のバンドは、PFC CM でのみ発現しており、Cerebellum CM 中では発現が認められなかった。Nano-LC/MS 解析の結果、本バンドは Secernin-1 だと示唆された。

B–D, ddY (E14) マウスより前頭皮質 (PFC) または小脳 (Cerebellum) 初代培養神経細胞を単離し7日間培養した。両神経細胞より回収した CM 及び細胞 lysate を用いて western blot を行った。(C) CM 及び (D) lysate 中における Secernin-1 の発現量 (β -actin) を定量した。**** $p < 0.0001$, unpaired *t*-test, mean \pm SEM, $n = 6$ different samples in each group.

E, F, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に 1, 10, 100 ng/mL rSecernin-1 または溶媒を7日間処置し、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。(F) pNF-H 陽性軸索の長さを定量した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, $n = 12$ –17 photos.

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.21. Gal-1 及び遊離型 Secernin-1 による HPC—PFC における軸索誘導作用の検討

PFC 神経細胞より分泌される遊離型（細胞外）Secernin-1 が、HPC 神経細胞の軸索誘導因子候補として同定されたため、次に Gal-1 を過剰発現する HPC 神経細胞の軸索が、遊離型 Secernin-1 によって伸長するかどうかについて検討した。

そこで、Neuron device チャンバーを用いて、Gal-1 を過剰発現した HPC 神経細胞の成長円錐側からのみ rSecernin-1 を処置し、Gal-1 による軸索伸長が促進されるかどうかを検討した。海馬神経細胞を neuron device チャンバーの細胞体スペース内（Soma; 灰色）に播種し、AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を処置した（**Fig. 43A**）。同時に、チャンバーの軸索投射部（Axonal site; 青色）より、1 ng/ml rSecernin-1 を添加した。チャンバー内で 7 日間培養後、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行い、microgroove 部 (M)、軸索投射部 (A)、及びその total の軸索密度を算出した（**Fig. 43B–D**）。その結果、HPC 神経細胞の成長円錐が存在する軸索投射部より rSecernin-1 を処置した場合では、AAV-Gal-1 による軸索伸長作用が顕著かつ有意に増強した（**Fig. 43B–D**）。これは、軸索円錐上に局在する Gal-1 が、PFC CM 中の軸索誘導因子 Secernin-1 を感知する受容体様にはたらくことで、HPC—PFC における軸索誘導を促進することを支持する結果であると考えられる。

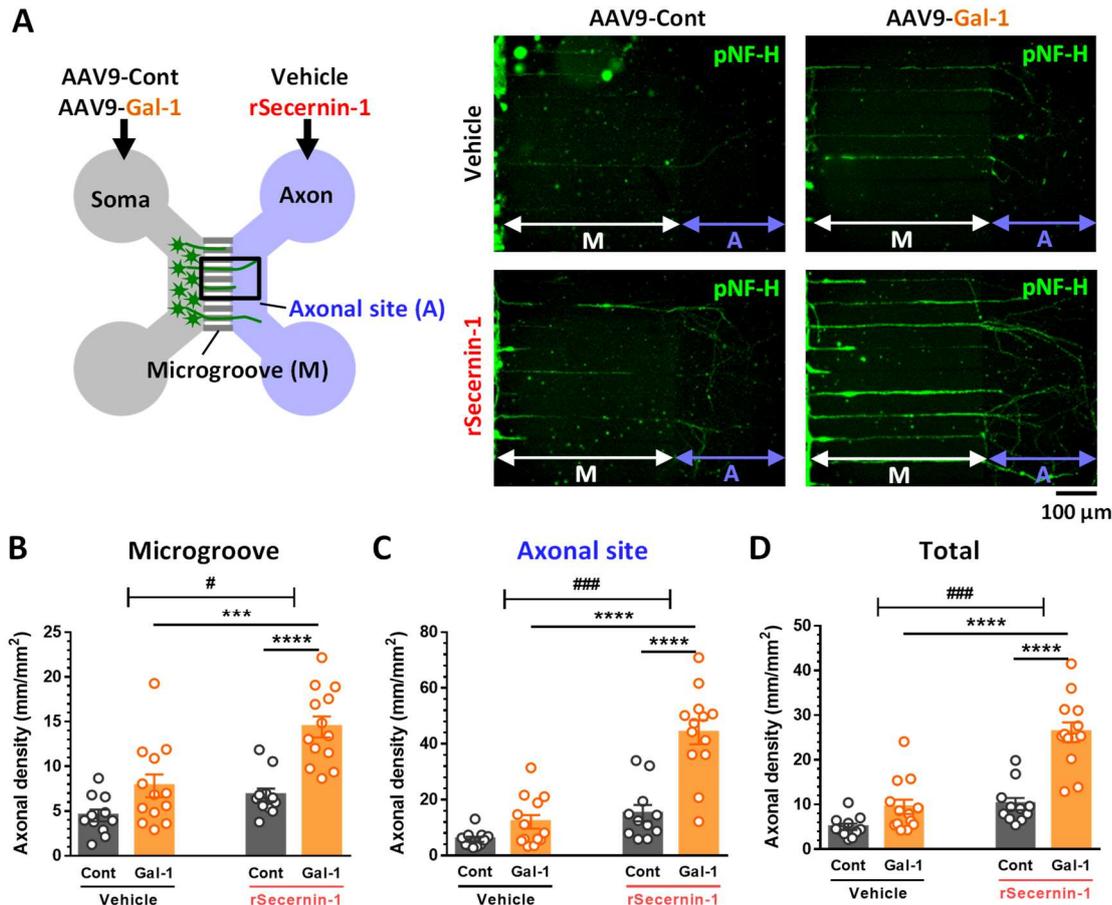


Fig. 43: Gal-1 及び遊離型 Secernin-1 による HPC—PFC における軸索誘導作用

ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞を neuron device チャンバーの細胞体スペース (Soma; 灰色) に播種し、AAV-Control または AAV-Gal-1 (5×10^5 GC/ μ l) を Soma 部に処置した。同時に、1 ng/ml rSecernin-1 または溶媒を軸索投射部 (Axonal site; 青色) に処置し、7日間培養した。その後、抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。(B) microgroove (M)、(C) axonal site (A)、及び (D) その total における pNF-H 陽性軸索密度を算出した。*** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, one-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, Vehicle vs rSecernin-1, two-way ANOVA, *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SEM, n = 11–13 images. [Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.3.22. Gal-1 と遊離型 Secernin-1 結合、及び成長円錐膜上における Gal-1 と遊離型 Secernin-1 共局在

ここまでの一連の実験より、HPC 神経細胞の軸索円錐膜上に局在する Gal-1 が、PFC より分泌される Secernin-1 を感知する受容体様にはたらき、HPC—PFC における軸索誘導に寄与する可能性を示した。そこで次に、遊離型 Secernin-1 と Gal-1 が、相互作用するペアであることを証明するために、両タンパク質が直接結合するかどうかを検討した。

海馬神経細胞に 5×10^6 GC/ μ l AAV-Gal-1 を 7 日間処置し、その細胞 lysate を回収した。回収した海馬神経細胞 lysate (50 μ g) に rSecernin-1 (1.5 μ g) を添加し、37°C で 60 分間混合した後、抗 Gal-1 抗体による免疫沈降 (IP) を行った (Fig. 44A)。抗 Gal-1 抗体による western blot を行ったところ (Fig. 44A: 下段)、input (lysate) の Gal-1 と同分子量に、IP された Gal-1 のバンドが検出され、抗 Gal-1 抗体によって確かに Gal-1 が IP されていることが確認された。また、normal IgG IP レーンにおいては、Gal-1 が IP されていない。続いて、抗 Secernin-1 抗体によって western blot を行ったところ (Fig. 44A: 上段)、抗 Gal-1 抗体によって IP したサンプルでは、rSecernin-1 input と同じ分子量にバンドが検出された。Normal IgG で IP したサンプルにもわずかに rSecernin-1 のバンドが検出されたが、その量は抗 Gal-1 抗体 IP サンプルよりもはるかに低かった。また、rSecernin-1 には His-tag 及び T7-tag (計、約 1.9 k) が付加されているため、海馬神経細胞 lysate 中の細胞内 Secernin-1 の分子量よりもわずかに高分子量側に検出された。以上より、遊離型 Secernin-1 が Gal-1 に直接結合していることが示された。神経細胞 lysate 中に含まれる細胞内 Secernin-1 は Gal-1 と共沈降されなかったが、この理由の 1 つとして、反応に用いた rSecernin-1 が細胞内 Secernin-1 の量よりも多かったため、細胞内 Secernin-1 との結合が検出限界以下であった可能性がある。もう 1 つの理由として、細胞内 Secernin-1 と遊離 (分泌) 型 Secernin-1 の三次構造が異なる可能性を考えている。Fig. 42B において、CM 中の Secernin-1 は lysate 中の Secernin-1 の分子量よりもわずかに大きいことが算出された (分子量差は約 0.6 k)。また、rSecernin-1 に付加されている His-tag と T7-tag は合計約 1.9 k であるが、Fig. 44A において lysate 中の Secernin-1 と rSecernin-1 の分子量の差は約 2.8 k だと算出され、Fig. 42B の結果に一致して遊離型 Secernin-1 の方がわずかに分子量が大きい可能性が考えられた。これらの理由から、lysate 中の Secernin-1 と Gal-1 の結合が検出されなかったのではないかと予想している。

さらに、Gal-1 と rSecernin-1 が成長円錐膜上で共局在するかどうかを検出した。海馬神経細胞に 5×10^7 GC/ μ l AAV-Gal-1 を 3 日間処置後、1 μ g/mL rSecernin-1 または溶媒を 1 時間処置した。抗 Gal-1 抗体、抗 His-tag 抗体、及び抗 Secernin-1 抗体による細胞膜透過 (Permeable) または非透過処理 (Non-permeable) の蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した (Fig. 44B)。なお、rSecernin-1 には poly histidine タグが付加されているため、処置した rSecernin-1 を検出するために抗 His-tag 抗体及び抗 Secernin-1 抗体の両方を用いた (神経細胞中の内在性 Secernin-1 も、抗 Secernin-1 抗体で検出されることになる)。その結果、rSecernin-1 処置群では、Permeable 及び Non-permeable 蛍光免疫染色のどちらにおいても、成長円錐で His-tag 及び Secernin-1 のシグナルが検出され、Gal-1 と共局在していた

(青矢頭)。一方、溶媒処置群では、rSecernin-1 由来の His-tag シグナルは検出されなかった (白矢印)。以上の結果より、遊離型 Secernin-1 は成長円錐膜上において、確かに Gal-1 と共局在することが示された。

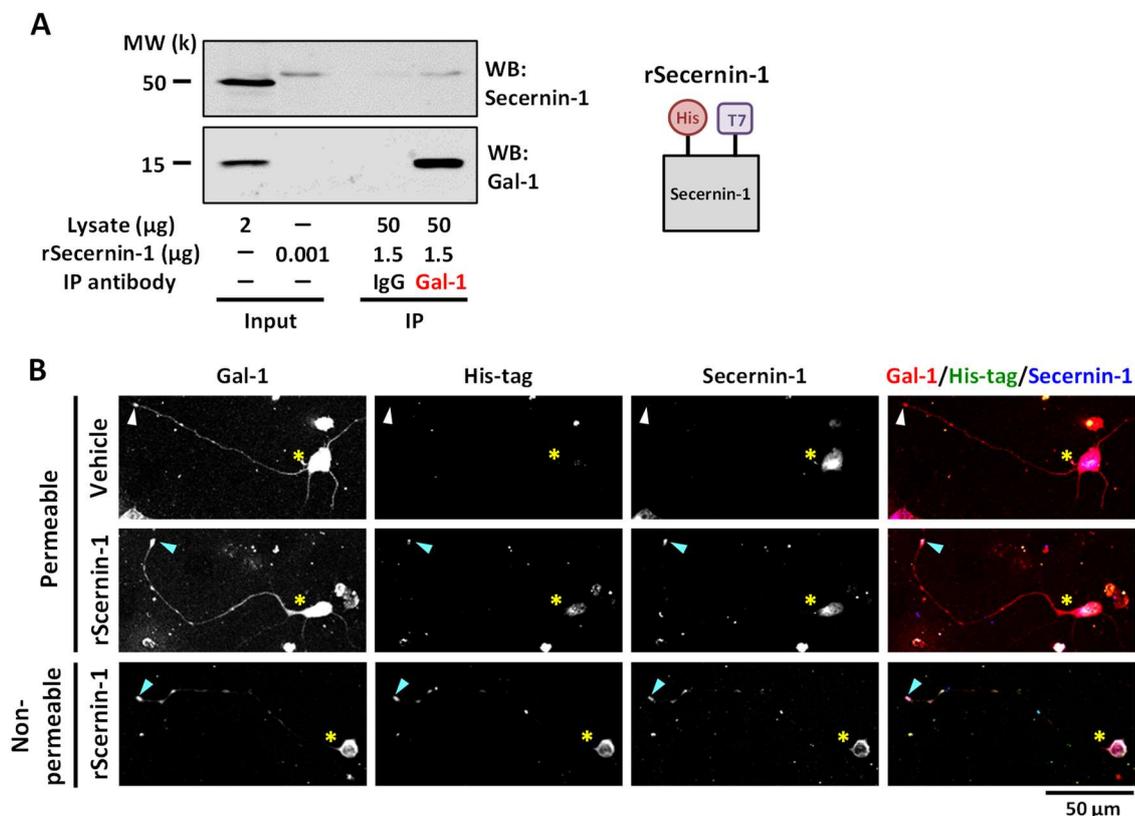


Fig. 44: Gal-1 及び遊離型 Secernin-1 の結合性

A, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に 5×10^6 GC/μl AAV-Gal-1 を 7 日間処置し、細胞 lysate を作製した。その lysate (50 μg) と rSecernin-1 (1.5 μg) を 37°C で 1 時間混合し、normal IgG (IgG) または抗 Gal-1 抗体を用いて免疫沈降 (IP) を行った。その後、IP されたタンパク質を抗 Gal-1 抗体及び抗 Secernin-1 抗体を用いた western blot により検出した。

B, ddY (E14) マウス海馬初代培養神経細胞に 5×10^7 GC/μl AAV-Gal-1 を 3 日間処置後、rSecernin-1 (1 μg/mL) または溶媒を 1 時間処置した。抗 Gal-1 抗体及び抗 pNF-H 抗体による細胞膜透過 (染色時に界面活性剤あり) または細胞膜非透過 (染色時に界面活性剤なし) の蛍光免疫染色を行った。撮影画像は共焦点顕微鏡より取得した。処置した rSecernin-1 (His-tag 及び Secernin-1 シグナル) は、成長円錐において Gal-1 と共局在していたが (青矢頭)、溶媒処置群では検出されなかった (白矢頭)。神経細胞体は黄色アスタリスクで示す。

[Yang & Tohda, 2023b より引用、一部改変]

2.4. 考察

本章では、diosgenin による 5XFAD マウスの脳内における方向特異的な軸索再伸長作用を検討し、本現象に関わる神経細胞中での機能分子の発見を目指した。まず、2 色の逆行性トレーサー (Dextran 3000 MW Texas Red 及び FITC) を用いて、薬物投与によって脳で軸索が萎縮した神経細胞、軸索が萎縮も伸長もしなかった naïve な神経細胞、及び軸索が方向特異的に再伸長した神経細胞それぞれを異なる色で可視化する手法を確立した (Fig. 15, 16)。本手法を用いた解析の結果、5XFAD マウスへの diosgenin 投与によって海馬 CA1 及び CA3 から PFC への軸索再伸長が促進されることを初めて示した (Fig. 16–18)。また、diosgenin 投与によって軸索が方向特異的に再伸長した神経細胞特異的に発現量が増変化した因子をマイクロアレイで網羅的に解析し (Fig. 19, Table 3)、SPARC 及び Galectin-1 (Gal-1) に着目し、機能解析を行った。SPARC に関しては、HPC 神経細胞への過剰発現により、5XFAD マウスの物体認知記憶及び空間記憶障害が改善すること (Fig. 24)、HPC から PFC へ軸索が再伸長すること (Fig. 25, 26)、SPARC の過剰発現によって HPC から PFC へ軸索が再伸長した神経細胞が物体認知記憶の改善に直接寄与すること (Fig. 28)、5XFAD マウスの HPC 神経細胞の軸索上で発現減少し、diosgenin 投与によって特に軸索膜上で発現増加すること (Fig. 29–31)、軸索膜上に発現する SPARC が、軸索が元々伸びていた場所に残存する細胞外 collagen I と相互作用することで、方向特異的な軸索再伸長に寄与すること (Fig. 31, 32) をそれぞれ証明した。Gal-1 についても、HPC 神経細胞への過剰発現により、5XFAD マウスの物体認知記憶及び空間記憶障害が改善すること (Fig. 36)、HPC から PFC へ軸索が再伸長すること (Fig. 37, 38)、5XFAD マウスの HPC 神経細胞の軸索上で発現減少し、diosgenin 投与によって軸索上で発現増加すること (Fig. 39, 40)、HPC 神経細胞の成長円錐膜上に高発現し、PFC 神経細胞から分泌される新規軸索誘導因子 Secernin-1 を感知する受容体様にはたらくことで、HPC—PFC における方向特異的な軸索再伸長に寄与すること (Fig. 41–44) をそれぞれ証明した。以上の結果は、AD の脳においていったん萎縮した軸索が方向性を持って再伸長できることを初めて証明するものであり、本現象を可能にする薬物 diosgenin の有用性と、その際の神経細胞中での機能分子の働きを実証した。

本章で見出した機能分子について、個々に考察する。5XFAD マウスへの diosgenin 投与によって軸索が HPC から PFC に方向特異的に再伸長した神経細胞を脳切片より LCM で単離し、溶媒投与群の naïve 神経細胞と比べて発現変化する遺伝子をマイクロアレイで網羅的に比較し (Fig. 19)、Table 3 にも示す通り、多くの遺伝子を検出した。軸索や記憶との関連、神経機能への関与等を文献調査し、Table 3 の中から *Sparc*, *Klk6*, *Arpc1b*, *CXCL16*, *Lgals1* の 5 遺伝子を抽出した。これらの 5 因子について、Fig. 20 及び Fig. 33 と同様に diosgenin 処置による神経細胞中でのタンパク質レベルでの発現量を western blot で検討したところ、SPARC 及び Gal-1 (*Lgals1* 遺伝子) のみがマイクロアレイにおける RNA レベルの発現の再現性が確認されたため、これら 2 分子に着目することとした。

SPARC は、細胞接着 (Cheng et al., 2013; Murphy-Ullrich et al., 1995)、細胞増殖 (Chen et al., 2012)、細胞

遊走 (Hung et al., 2017)、組織修復 (Bradshaw & Sage, 2001) や発達 (Sage et al., 1989b) を促進する糖タンパク質である。中枢神経系では、神経回路形成が最も盛んな発達期において発現がピークを示し (Vincent et al., 2008)、シナプス形成 (Jones et al., 2018) や除去 (López-Murcia et al., 2015) にも関与することが報告されている。HPC 神経細胞の軸索投射部位の 1 つである内嗅皮質を切断後、修復期において HPC で SPARC が自ずと増加すること (Liu et al., 2005) から、SPARC が神経修復に寄与している可能性が議論されていたが、SPARC の増加が直接軸索再伸長や記憶回復に関わるかどうかは不明であった。本研究において、神経細胞中における SPARC の過剰発現が脳での軸索再伸長及び記憶回復に寄与するだけでなく、軸索膜上に発現する SPARC が、軸索萎縮前に元々軸索が伸びていた場所に残存する細胞外 collagen I と相互作用することで、方向特異的な軸索再伸長を促進することを初めて証明した。

Collagen ファミリーは、発達期の脳において軸索伸長や軸索誘導、シナプス形成に重要な役割を担っている (Hubert et al., 2009)。末梢神経系の運動神経では、軸索がターゲット部位に再投射する際に collagen 4a5 が関わることを報告されている (Isaacman-Beck et al., 2015)。しかし、脳神経細胞の軸索再伸長時に collagen I が軸索の伸び先の道しるべ分子様にはたらくことは本研究で初めて明らかにした。Collagen I が培養神経細胞から分泌されることは既に報告されている (Kuhn et al., 2012; Mendes-Pinheiro et al., 2018)。本研究では、軸索伸長時に collagen I は軸索が伸びている場所の周囲に蓄積し、軸索が A β によって萎縮した後でも、細胞外に残存することを示した (Fig. 31)。また、軸索膜上の SPARC をマスクするとその軸索は細胞外 collagen I を辿ることができず、方向特異的に再伸長できなくなることも確認された (Fig. 32C-E)。そこで重要になるのが、軸索萎縮後に collagen I がそのくらい長期間道しるべ分子として脳内に残存するか、という点である。本研究では、Fig. 31D に示すように、少なくとも 7-9 ヶ月齢の 5XFAD マウスの PFC においては、collagen I が残存することを観察している。また、AD 患者の脳における collagen I の発現量は、正常時と比べて不変 (Xu et al., 2019) もしくは、むしろ増加する (Freitas et al., 2021) との報告があるため、脳に残存し続ける可能性は十分あり得ると考える。

Gal-1 は、*Lgals1* 遺伝子によってコードされており、細胞内・外に発現するガラクトース結合タンパク質である (Camby et al., 2006)。特に細胞外 Gal-1 については、中枢神経系及び末梢神経系の軸索伸長・再生に関わることが多く報告されており、例えば細胞外 (リコンビナント) Gal-1 は後根神経節 (DRG) 及び運動神経の軸索伸長及び再生を促進する (Horie et al., 1999; McGraw et al., 2004)。また、リコンビナント Gal-1 で刺激されたマクロファージからは、DRG 神経細胞に対する軸索伸長促進因子が分泌されることもわかっている (Horie et al., 2004)。さらに、Gal-1 は嗅神経の軸索誘導にも関わる (Barondes et al., 1994; Mahanthappa et al., 1994; Puche et al., 1996; Tenne-Brown et al., 1998)。中枢神経系においては、リコンビナント Gal-1 が NRP1/PlexinA4 受容体に結合することで、軸索伸長阻害因子 Semaphorin3A が NRP1/PlexinA4 受容体に結合することをブロックし、脊髄損傷マウスにおいて脊髄中の軸索を再伸長させ、運動機能障害を回復する (Quintá et al., 2014)。一方、脳においては、Gal-1 はア

ストロサイト (Gaudet et al., 2015; Wu et al., 2016)、マクロファージ (Gaudet et al., 2015)、神経細胞 (Kajitani et al., 2014) で広く発現が報告されている。脳神経細胞中での Gal-1 の機能はほとんど明らかにされていないものの、細胞外 Gal-1 が PlexinA4 受容体とともに海馬初代培養神経細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれ、軸索再伸長に関わることが報告されている (Quintá et al., 2016)。また、Gal-1 ノックアウトマウスでは、記憶障害が起こる (Sakaguchi et al., 2011)。以上のことから、脳神経細胞中の Gal-1 が、軸索再伸長作用を介して記憶障害の改善に寄与する可能性は高いと考えられるが、神経細胞中での Gal-1 の増加が脳での軸索再伸長や記憶改善に関わるかどうかは検討されたことがなかった。本研究では、神経細胞中における Gal-1 の過剰発現が脳での軸索再伸長及び記憶回復に寄与することを示した。

Gal-1 は $\beta 1$ -integrin と共局在していることから、細胞膜上にも発現すると考えられている (Bojic-Trbojevic et al., 2018)。本研究においても、Gal-1 が成長円錐膜上に局在することを細胞膜非透過の蛍光免疫染色で確認した。また、Gal-1 は小脳神経細胞と比べて PFC 神経細胞から分泌が多い Secernin-1 と直接結合し、遊離型 Secernin-1 が Gal-1 発現軸索を誘導したことから、Gal-1 が軸索誘導因子 Secernin-1 の受容体としてはたらく可能性を初めて示した。しかし、神経細胞に過剰発現された Gal-1 が、神経細胞から分泌され、それら細胞外 Gal-1 が軸索再伸長を促進している可能性も否定できない。今後は、Gal-1 と遊離型 Secernin-1 の成長円錐膜上における結合様式を詳細に解明する必要があると考える。

Secernin-1 は、肥満細胞においてエキソサイトーシスを制御する細胞質タンパク質として、近年同定されたタンパク質である (Way et al., 2002)。中枢神経系における Secernin-1 の機能についてはまだほとんど報告がないが、少なくとも Secernin-1 はラットの脳及び脊髄組織に発現することがわかっている (Lindhout et al., 2019)。また、海馬神経細胞の Secernin-1 をノックダウンすると、シナプス形成が減少することから (Lindhout et al., 2019)、神経細胞において Secernin-1 が神経活動の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆されている。さらに、AD 患者の脳において Secernin-1 がアミロイドプラーク内に異常に蓄積していることも検出されている (Pires et al., 2019)。しかし、本研究で見出したように、Secernin-1 が分泌型タンパク質として存在し、軸索誘導因子として機能することを報告した例はない。また、Secernin-1 は PFC 及び小脳神経細胞のどちらにおいても合成されるにもかかわらず、その分泌量は PFC 神経細胞ではるかに多かった (Fig. 42B-D)。したがって、PFC 及び小脳神経細胞における Secernin-1 の分泌機構は異なる可能性があるが、その機構の詳細についてはさらなる解明が必要である。

Diosgenin による SPARC 及び Gal-1 の発現増加に関わる分子メカニズムについても、少なくとも 1,25D₃-MARRS を介することを示した (Fig. 29C, D 及び Fig. 39C)。SPARC の転写促進因子の 1 つとして、c-Jun が報告されているが (Briggs et al., 2002)、diosgenin による 1,25D₃-MARRS 刺激後に活性化される PI3K、ERK、PKA、PKC (Tohda et al., 2012) の下流において、c-Jun の転写活性が増強することが

わかっている (Zhao et al., 2015)。よって、diosgenin は少なくともこれらの 4 つの protein kinase を介して c-Jun の転写活性を増加し、SPARC の発現を増加させる可能性があると考えられる。また、Gal-1 についても、RET/PIK3 シグナルの下流で発現増加することが報告されている (Takaku et al., 2013)。

Diosgenin によって軸索が PFC に向かって再伸長した HPC 神経細胞が、どのような性質や特徴を持つのか、どのようなサブタイプの神経細胞集団なのか、或いは発達期と成熟期神経細胞のどちらに近いフェノタイプを有するか等については、非常に重要な論点だが、まだ不明な点が多い。まず興味深いこととして、**Fig. 16B, C** における逆行性トレーサーの広がりを観察すると、一般的に HPC 神経細胞体が多く位置する錐体細胞層には、トレーサー陽性神経細胞が少なかった。むしろ錐体細胞層の上下層（上昇層及び分子層）にトレーサー陽性神経細胞がまばらに局在していた。これら二層に局在する神経細胞がどのような性質を持つか、特に軸索再伸長活性が高いのかについては不明だが、少なくとも **Fig. 19** において軸索が再伸長した神経細胞では、naïve な神経細胞と比べて Calretinin の発現量が 5.5 倍増加していた（データ未提示）。Calretinin は、HPC 介在神経細胞のマーカーとして用いられてきたため、HPC—PFC のように長距離の神経回路ではなく、HPC 内の局所回路の形成を担っていると一般的に考えられてきた。しかし、PFC の抑制性神経細胞に軸索投射している HPC 神経細胞の約半分以上は、Calretinin 陽性の神経細胞であることが報告されており (Ährlund-Richter et al., 2019)、全ての Calretinin 陽性神経細胞が介在神経細胞様の性質を持つわけではないことが示唆されている。**Fig. 16** 中の Texas Red 陰性かつ FITC 陽性の（軸索再伸長した）神経細胞の局在が、HPC における Calretinin 陽性の神経細胞の局在場所と非常に類似している (Gulyás et al., 1992; Mátyás et al., 2004) ことも踏まえると、Calretinin 陽性神経細胞の一部は、いったん萎縮した後も軸索を長距離に再伸長できる population かもしれない。これら神経細胞の機能及び特徴を特定するために、電気生理学的手法やシングルセル解析等をさらに進める必要がある。また、5XFAD マウスにおいて、特定の神経細胞に蛍光タンパク質を発現させ、萎縮した軸索が本当に diosgenin 投与によって長距離に再伸長するかどうかについて、二光子励起蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察することも、今後の重要な課題である。

以上、本章では、diosgenin 投与が AD 脳の少なくとも HPC—PFC において、軸索を方向特異的に再伸長させることと、HPC—PFC での軸索再伸長が記憶改善の直接かつ十分な要因であることを証明した。5XFAD マウスでは、生後 4-5 ヶ月齢で記憶障害が発症するが、この AD 発症のタイミングは神経突起の変性及びシナプスの脱落と一致していること、少なくとも 9 ヶ月齢では神経細胞の脱落は起きていないことが報告されている (Kim et al., 2019; Oakley et al., 2006)。本研究では、神経細胞の脱落が起こっていない 7-9 ヶ月齢の 5XFAD マウスを用いたため、diosgenin による記憶改善は軸索再伸長によってもたらされており、神経細胞保護作用の関与は小さいと考える。今後は、diosgenin 投与が HPC—PFC 以外の神経回路においても軸索を方向特異的に再伸長させるかどうかを解析するとともに、それら神経回路の修復にも SPARC 及び Gal-1 が関与する可能性を検討する予定である。

2.5. 小括

本章では、diosgenin 投与が 5XFAD マウス脳内において方向性を持って軸索を再伸長させることを初めて証明し、本現象に関わる神経細胞中の機能分子として SPARC (Yang & Tohda, 2023a) 及び Gal-1 (Yang & Tohda, 2023b) を見出した。また、脳での軸索再伸長が記憶改善の直接かつ十分な要因であることを機能学的に証明した。これらの結果は、脳内の軸索再伸長が AD に対する有力な根本的治療戦略になりうることを強く示唆する。

第3章 : 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

(Yang X, Nomoto K, Tohda C. *Journal of Natural Medicines*, 75, 207–216, 2021)

(Tohda C, Yang X, Nomoto K. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 27, 102–105, 2020)

(Tohda C, Yang X, Matsui M, Inada Y, Kadomoto E, Nakada S, Watari H, Shibahara N. *Nutrients*, 9, 1160, 2017)

3.1. 緒言

以前からの当研究室での diosgenin の基礎研究、及び第1章、第2章の結果より、diosgenin が AD に対して有用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、我々はハードルの高い化合物 diosgenin ではなく、diosgenin を含有した山薬エキスで臨床研究まで展開する戦略を立てた。まずは diosgenin を機能性表示食品として開発することを目指すために、本章では、正常マウスに対する山薬エキスの記憶亢進作用を検討することと、そのエキスを用いて健常人の認知機能に対する効果を臨床研究で評価することを目的とした。

山薬中における diosgenin の含量は、*Dioscorea* 属の種類に依存して大きく異なり、例えば、*D. zingiberensis* 及び *D. collettii* は diosgenin 含量が高いが、*D. japonica* 及び *D. opposita* では diosgenin 含量は低い (Li et al., 2010a; Vendl et al., 2006; Yi et al., 2014)。また、重要なこととして、日本薬局方で規定される山薬 (*Dioscorea Rhizome*) は、*D. japonica* 又は *D. batatas* (= *D. opposita*) を基原植物としており、つまり diosgenin 含量が非常に低い。一方で、山薬中には、種々の diosgenin 配糖体 (例 : dioscin, protodioscin, pseudoprotodioscin) 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 に代謝されると考えられている (Yi et al., 2014)。一方、実際には、生体内における diosgenin 配糖体から diosgenin への代謝効率は低いことが報告されている (Okawara et al., 2013)。そこで私は、日本薬局方山薬を通常通り熱水抽出した場合の「常法山薬エキス」では、そもそもエキス中に十分量の diosgenin が含まれていない可能性や、diosgenin 配糖体から diosgenin への代謝効率が悪く、記憶亢進作用を期待できないのではないかと予想した。そこで、常法山薬エキスエキスと、diosgenin 含量を高める処置を施した山薬エキスを比較することとした。*D. batatas* の中でも、中国雲南省で栽培された山薬は、diosgenin 配糖体の dioscin の含量が非常に高い (山薬中の 2%以上) ことがわかっていることから、この *D. batatas* を基原とした山薬を含水エタノールで抽出後、エキスに酸加水分解反応を加えることによって、エキス中の diosgenin 含量を 16%まで高めた「diosgenin 高濃度山薬エキス」も用いて検討を行った。

本章では、これら 2 種類の山薬エキスそれぞれを種々の溶媒に溶解させた状態で正常マウスに経口投与し、その際の diosgenin の脳移行率及び記憶亢進作用の違いから、山薬エキスとして diosgenin を脳に作用させる製剤条件を検討した。続いて、見出された最も有力な条件で作製された山薬エキスを用いて、健常人の認知機能に対する作用を臨床研究で評価した。

3.2. 実験材料ならびに実験方法

倫理宣言

動物の取り扱いには富山大学動物実験指針に従った。また、本動物実験のプロトコールは、富山大学動物実験委員会及び遺伝子組換え実験委員会の承認を得ている（動物実験承認番号：A2017INM-1、遺伝子組換え実験承認番号：G2013INM-1, G2018INM-2）。健成人を対象としたプラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー試験は、富山大学倫理委員会の承認を得ている（ID: UMIN000021151）。

山薬エキス

日本薬局方山薬の熱水抽出（常法山薬）エキスは、アルプス薬品工業（岐阜）に調製を委託し、購入した。500 g の *Dioscorea Rhizome*（15 mm 片）に 5 l の超純水を加え、90°C 以上で 1 時間熱水抽出し、凍結乾燥機で乾燥させて粉末とした（収率 19.2%）。Diosgenin 高濃度山薬エキス（商品名：ジオパワー15[®]）（中国雲南省産の *Dioscorea batatas* を含水エタノールで抽出後、酸加水分解処理を施したもので、diosgenin 含量は 16%）は、アンチエイジングプロ株式会社（東京）より購入した。

マウスに対する薬物投与

Fig. 45A, B では、diosgenin を EtOH に溶解した後、5%グルコース水溶液に 10 倍希釈したものを diosgenin (10 $\mu\text{mol/kg/day}$) で 1 日 1 回 5 日間経口または腹腔内投与した。その他の実験は、diosgenin を日本薬局方ゴマ油（カナダ）、日本薬局方オリーブオイル（丸石製薬）、及び日本薬局方大豆油（カナダ）に溶解させ、**3.3. 実験結果**に示す各濃度及び日数で経口投与した。

常法山薬エキス及び diosgenin 高濃度山薬エキスは、滅菌水、日本薬局方ゴマ油（カナダ）、日本薬局方オリーブオイル（丸石製薬）、日本薬局方大豆油（カナダ）、魚油（from menhaden; Sigma-Aldrich）、または中鎖脂肪酸トリグリセリド (MCT E6000; MUSIM MAS, Singapore) にそれぞれ溶解させ、**3.3. 実験結果**に示す各濃度及び日数で経口投与した。

正常 (ddY) マウス

ddY マウス（雄性及び雌性、6–9 週齢）は、Japan SLC（浜松）より購入した。

AD モデル (5XFAD) マウス

5XFAD (Tg6799) またはその wild-type マウス（雄性及び雌性、6 ヶ月齢）を用いた。他は、第 1 章の同項に同じ。

5XFAD マウスの genotyping

第 1 章の同項に同じ。

マウス胎児大脳皮質神経細胞の初代培養

第1章の同項と同じ。

神経細胞に対する薬物処置

3日間初代培養した神経細胞に、2.5 µg/ml 常法山薬エキス、2.5 µg/ml diosgenin 高濃度山薬エキス、または2.5 µg/ml 常法山薬エキス + 0.4 µg/ml (1 µM) diosgenin を B-27 supplement を含む無血清培地に混ぜ、4日間培養した。他は、第1章の同項と同じ。

培養細胞の蛍光免疫染色

神経細胞の培養終了後、培地を除去し PBS で洗浄した後、4% Paraformaldehyde-PBS 溶液を加えて60分間常温で静置し固定した。溶液を除去し、0.3% TritonX-100 (和光純薬) -PBS 溶液で5分間の洗浄を2回行った。一次抗体溶液 [0.3% TritonX-100-PBS 溶液、normal goat serum (和光純薬)、mouse IgG₁ 抗 pNF-H モノクローナル抗体 (1:250, Convance, Princeton) 及び rabbit IgG 抗 Map2 ポリクローナル抗体 (1:500, Abcam)] を 100 µl 加え、4°Cで一晩反応させた。翌日、一次抗体液を除去し、0.3% TritonX-100-PBS 溶液で5分間の洗浄を2回行った後、二次抗体液 [0.3% TritonX-100-PBS 溶液、Alexa Fluor 488 標識 goat anti-mouse IgG 抗体 (1:400, Life Technologies) 及び Alexa Fluor 594 標識 goat anti-rabbit IgG 抗体 (1:400, Life Technologies)] を 100 µl 加え、遮光下、常温で2時間反応させた。反応後、溶液を除去し、PBS で5分間の洗浄を2回行った後、DAPI (1 µg/ml) (Enzo Life Science) -PBS 溶液を加え、遮光下、常温で5分間反応させた。その後、溶液を除去し、PBS で5分間の洗浄を行った後、Aqua Poly Mount (Polyscience) で封入した。

培養細胞の画像解析

蛍光免疫染色後のスライド観察には、倒立蛍光顕微鏡 Cell Observer (Carl Zeiss) 及び Axio Vision 4.8 ソフトウェア (Carl Zeiss) を用いた。一枚当たり 864.98 µm × 645.62 µm の大きさを取得した。pNF-H 陽性軸索長及び Map2 陽性樹状突起長の測定には、画像解析ソフト MetaMorph version 7.8 (Molecular Devices) を用いて自動計測した。画像全体の pNF-H 陽性軸索の長さを測定し、Map2 陽性の神経細胞体の数で除することで、神経細胞当たりの軸索の長さを算出した。

マウスの行動試験

5XFAD マウスの物体認知記憶試験については、第1章の同項と同様に行った。正常 ddY マウスの物体認知記憶試験は、Training session と Test session 間のインターバルを48時間に設定した。

LC-MS/MSによる diosgenin の検出

ddY マウスに diosgenin、常法山薬エキス、または diosgenin 高濃度山薬エキスを **3.3. 実験結果**に示す各濃度で単回経口投与した。投与より 3, 6, 9, 12, 24, または 48 時間後に、マウスをイソフルランで吸入麻酔し、血液（下大静脈より）を約 500 μ l 採取した。10,000 g、4°C で 10 分間遠心分離後、上層の血漿（200 μ l）を回収し、2000 μ l のメタノールを加えてタンパク変性させた。また、マウス胸部を切開し、左心室に翼状針（トップ）を刺入した後、右心房に切れ込みを入れ、左心室より氷冷した saline を 20 ml 灌流後、マウスの全大脳皮質を摘出した。大脳皮質の質量の 10 倍量（ μ l）のメタノールを加えて homogenate し、タンパク変性させた。血漿及び大脳皮質サンプルについて、変性タンパクを遠心分離 [10,000 g, 4°C, 10 分間] で取り除き、上清を乾燥（65°C、1 日間〜）後、100 μ l メタノールを加え再溶解し、0.45 μ m 径マイレクス-LH フィルター（Merck Millipore）に通した溶液を LC-MS/MS 解析した。

標品 diosgenin はメタノールに溶解して用いた。LC-MS/MS 解析には、Thermo Fisher Scientific Accela HPLC システム及び LTQ Orbitrap XL hybrid Fourier Transform Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を使用した。液体クロマトグラフィーは、40°C に保持した Capcell Pak C18 MGIII S-5 (1.5 mm i.d. \times 150 mm, Shiseido) カラムを用いて、200 μ l/min の流速で実施した。移動相には、超純水及びメタノール (M) を使用し、0–5 分: 65% M、5–16 分: 95% M、16–20: 55% M の濃度勾配で検出した。スプレー電圧 4.5 kV、キャピラリー電圧 40.0 kV、管レンズ 150 V、キャピラリー温度 330°C、シーズガス流量 50 unit、及び補助ガス流量 10 unit とした。

健常人を対象とした臨床試験

被験者の募集期間は、2015 年 12 月 12 日から 2016 年 2 月 4 日までとした。被験者の参加基準は、(a) 20 歳以上、(b) 日本語を話せる、(c) 富山県在住、(d) 心身の健康状態が良好であること、とした。また、除外基準は、(a) AD、(b) 精神障害、または (c) がんと診断されている、(d) 教育歴が 12 年未満、(e) 山芋アレルギー、(f) 認知機能改善薬または抗精神病薬を処方されている、とした。全被験者は、臨床試験参加前にインフォームド・コンセントに同意している。全被験者候補 (n = 41) のうち、参加基準を満たした 31 名について、ランダムに 2 群に分けた。途中で 3 名が健康上の理由で服薬を中止し、最終的に 28 名のデータを分析した。被験者は、富山大学を計 4 回訪れ、各検査を受けた。

プラセボ（2 カプセル/日 = オリーブ油 [グリセリン脂肪酸エステル、ビタミン E 誘導体、白ミツロウ]）または diosgenin 高濃度山薬エキス（2 カプセル/日 = ジオパワー15[®] 50 mg; diosgenin 量として 8 mg、オリーブ油 672 mg）は、GMP 及び ISO22000 認証に基づき、白鳥薬品（習志野）で製造された。

認知記憶試験として、RBANS (Repeatable Battery for the Assessment of Neuropsychological Status) (Randolph et al., 1998) の日本語版を実施した。また、安全性評価として、有害事象の記録及び一般血液検査を各検査日に実施した。

データ解析

データは平均値 \pm 標準誤差 (SEM) または \pm 標準誤差 (SD) で表した。有意差検定には、Prism 6.07 (Graph Pad software, Sun Diego, CA, USA) を用い、two-tailed unpaired *t*-test、One-way analysis of variance (ANOVA) *post hoc* Bonferroni test または Dunnett's test、repeated measures Two-way ANOVA *post hoc* Bonferroni test を行った。有意水準は 5% とした。

3.3. 実験結果

3.3.1. Diosgenin、常法山薬エキス、及び diosgenin 高濃度山薬エキスが記憶亢進作用を発揮する投与濃度及び投与溶媒の検討

まず、正常マウスに対する常法山薬エキス及び diosgenin 高濃度山薬エキスによる記憶亢進作用を比較することとした。Diosgenin は脂溶性が高い (cLogP = 5.912) ため、ここまでの実験では、ゴマ油 (第 1 章) またはオリーブオイル (第 2 章) 等の油溶媒に溶解させ、経口投与実験を行っていた。また、予備実験において、diosgenin をゴマ油またはオリーブオイルに溶解させて経口投与すると、diosgenin が脳に移行することも確認している (データ未提示)。一方で、diosgenin を経口投与する際の溶媒を水溶性溶媒として記憶に対する効果及び脳移行性を比較したことはなかったため、まずは diosgenin を用いてこの点を検討した。

水溶液に完全に溶解させるために、diosgenin を EtOH に溶解した後、5%グルコース水溶液に 10 倍希釈した。つまり、溶媒は 10% EtOH in 5%グルコースで構成されている。先行研究では、10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ diosgenin (in 10% EtOH in 5%グルコース溶媒) の腹腔内投与によって、正常マウスの記憶亢進作用を確認している (Tohda et al., 2013) ため、まずは本濃度を用いて経口投与を行った。本濃度は、第 1, 2 章 (ゴマ油またはオリーブオイルに溶解した場合) で投与した 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ よりも、100 倍高い投与量となる。正常 ddY マウス (雄性、6 週齢) に溶媒または 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ diosgenin を 5 日間連続で経口投与または腹腔内投与し、物体認知記憶試験を行った (Fig. 45A, B)。その結果、diosgenin の腹腔内投与では先行研究に一致して記憶亢進作用が見られたが、経口投与では記憶亢進作用は見られなかった。続いて、第 1, 2 章での経口投与濃度と同じく 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ diosgenin に濃度を低め、ゴマ油に溶解した場合の実験を行った。正常 ddY マウス (雄性及び雌性、9 週齢) に溶媒または 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ diosgenin をゴマ油に溶解し、4 日間連続で経口投与した結果、マウスの物体認知記憶は有意に亢進した (Fig. 45C)。

続いて、wild-type 及び 5XFAD マウス (雄性及び雌性、6 ヶ月齢) に溶媒 (ゴマ油) または diosgenin (0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$) を種々の油溶媒 (ゴマ油、オリーブオイル、または大豆油) に溶解し、それぞれ 20 日間連続で経口投与した。物体認知記憶を行った結果、diosgenin をいずれの油溶媒に溶解して経口投与した場合でも、5XFAD マウスの記憶障害が有意に改善することが示された (Fig. 45D)。

次に、diosgenin 高濃度山薬エキスをゴマ油に溶解し、正常マウス (雄性、6 週齢) に 7 日間経口投与した。Diosgenin 高濃度山薬エキス (diosgenin を 16%含有) の投与量は 0.259 mg/kg/day とし、diosgenin として 0.1 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ (0.0414 mg/kg/day) となるように設定した。その結果、diosgenin 高濃度山薬エキスの投与によっても、正常マウスの物体認知記憶が有意に亢進した (Fig. 45E)。

ここまでの実験を踏まえ、diosgenin を油溶媒に溶解すると記憶亢進作用を発揮できる可能性が考えられたため、常法山薬エキス及び diosgenin 高濃度山薬エキスをオリーブオイルに溶解し、正常マウスに対する記憶亢進作用を検討した。また、3.1. 緒言で記述の通り、*D. batatas* を基原とする日本薬

局方山薬は、diosgenin 含量が低いことが知られているため、diosgenin 高濃度化処理を施していない常法山薬エキスでも作用を発揮する可能性のある投与濃度として、各山薬エキスとして 100 mg/kg/day (diosgenin 高濃度山薬エキス中の diosgenin 量として、16 mg/kg/day [= 38.59 $\mu\text{mol/kg/day}$]) と高めに設定した。また、diosgenin 高濃度山薬エキスを水に懸濁したものを経口投与する条件でも比較した。正常 ddY マウス（雌性、6 週齢）に溶媒または 100 mg/kg/day 常法山薬エキス (Yam) または diosgenin 高濃度山薬エキス (Dios-rich Yam) を 7 日間連続で経口投与し、物体認知記憶試験を行った (Fig. 45F)。その結果、常法山薬エキス投与群においては記憶亢進作用が見られなかった。一方、オリーブオイルを溶媒とした diosgenin 高濃度山薬エキス群では、Fig. 45E の結果と一致して記憶亢進作用が見られたが、水を溶媒とした diosgenin 高濃度山薬エキス群では、記憶亢進作用が見られなかった。

以上の一連の結果より、diosgenin による記憶亢進作用を期待するためには、経口投与の溶媒を水ではなく油とすることが重要であること、油溶媒とした場合には 0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$ diosgenin という低用量で diosgenin の効果が表れること、常法山薬エキスを油溶媒に溶解して経口投与を行っても記憶亢進作用が見られないことが示された。そこで、水溶媒及び常法山薬エキスとして経口投与したときになぜ diosgenin による記憶亢進作用が見られないかの理由を探るために、エキス中の diosgenin 含量及び経口投与後の diosgenin の脳移行性の観点から次項より検証した。

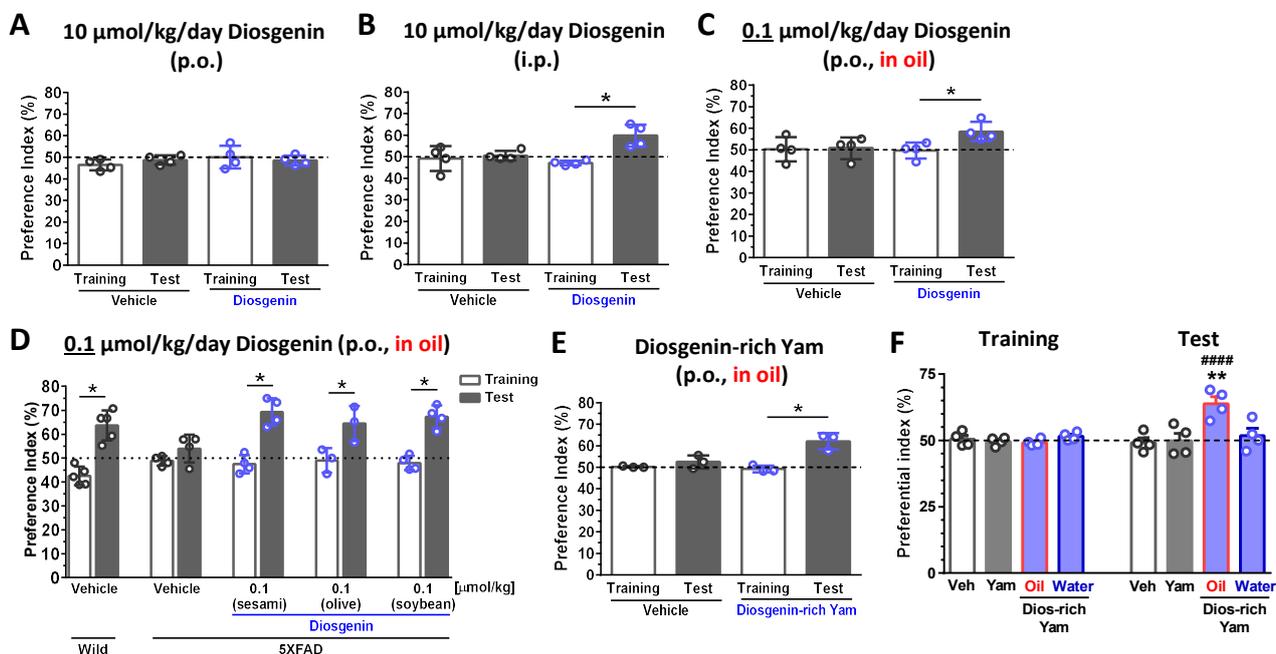


Fig. 45: Diosgenin、常法山薬エキス、diosgenin 高濃度山薬エキス投与によるマウスの記憶亢進作用

A, B, Diosgenin を 10% EtOH in 5% グルコース水溶液に溶解し、ddY マウス（雄性、6 週齢）に 10 $\mu\text{mol/kg/day}$ で (A) 経口投与 (p.o.) または (B) 腹腔内投与 (i.p.) した。5 日間連続で投与後、物体認識記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 48 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。* $p < 0.05$, paired t -test, mean \pm SD, $n = 4$ mice.

C, Diosgenin をゴマ油に溶解し、ddY マウス（雄性及び雌性、9 週齢）に 0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$ で経口投与した。4 日間連続で投与後、物体認識記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 48 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。* $p < 0.05$, paired t -test, mean \pm SD, $n = 4$ mice.

D, 溶媒（大豆油）または 0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$ diosgenin をゴマ油、オリーブオイル、または大豆油に溶解し、wild-type 及び 5XFAD マウス（雄性及び雌性、6 ヶ月齢）に 20 日間連続で経口投与後、物体認識記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 1 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。* $p < 0.05$, paired t -test, mean \pm SD, $n = 3-5$ mice.

D, Diosgenin 高濃度山薬エキスをゴマ油に溶解し、ddY マウス（雄性、6 週齢）に 0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$ で経口投与した。7 日間連続で投与後、物体認識記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 48 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。* $p < 0.05$, paired t -test, mean \pm SD, $n = 3$ mice.

E, 常法山薬エキスまたは diosgenin 高濃度山薬エキスをオリーブオイルまたは水に溶解または懸濁し、ddY マウス（雌性、6 週齢）に 100 mg/kg/day で経口投与した。7 日間連続で投与後、物体認識記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 48 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。** $p < 0.01$ vs Veh, one-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's test; ##### $p < 0.0001$ vs Veh, repeated measures two-way ANOVA [F(2, 9) = 10.15, $p = 0.0049$], *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 4$ mice.

[Tohda et al., 2017; Yang et al., 2021 より引用、一部改変]

3. 3. 2. 常法山薬エキス及び diosgenin 高濃度山薬エキス中の diosgenin 含量、及び経口投与後の diosgenin の脳移行性の比較

ここまでの検討により、経口投与する際の溶媒を水ではなく油とすることと、常法山薬エキスではなく diosgenin 高濃度山薬エキスとして経口投与することが、diosgenin による記憶亢進作用に重要である可能性が示された。この違いが生じる理由を探るために、各山薬エキス中の diosgenin 含量、及び経口投与後の diosgenin の脳移行性を検討した。

まず、LC-MS/MS おいて標品 diosgenin (10 µg/ml in EtOH) のイオン電流クロマトグラム (Fig. 46A、左) および質量スペクトル (Fig. 46A、右) を検出した。質量 ($m/z = 415.3192$) 誤差 ± 1 mmu の高精度準分子イオン ($[M+H]^+$) ピークを抽出することにより、diosgenin の質量スペクトル及びフラグメンテーションパターンが検出された。続いて、常法山薬エキス (Yam) 及び diosgenin 高濃度山薬エキス (Diosgenin-rich Yam) を 100 µg/ml となるよう EtOH に溶解し、同様に LC-MS/MS で diosgenin ピークを検出した (Fig. 46B)。その結果、常法山薬エキスからは全く diosgenin 由来のピークが検出されなかった (Fig. 46B、左)。なお、常法山薬エキスの 150 mg/ml (in EtOH) 溶解液 (1500 倍高濃度) 中からでも、diosgenin のピークが検出されないことが確認され (データ未提示)、常法山薬エキス中には diosgenin がほとんど含有されていない (LC-MS/MS の検出限界以下) ことが示唆された。一方、diosgenin 高濃度山薬エキスからは、標準 diosgenin と同じ retention time において、diosgenin のピークが検出された (Fig. 46B、右)。この結果より、常法山薬エキス中には十分量の diosgenin が含有されていないために、Fig. 45F において記憶亢進作用が見られなかったのではないかと推測された。

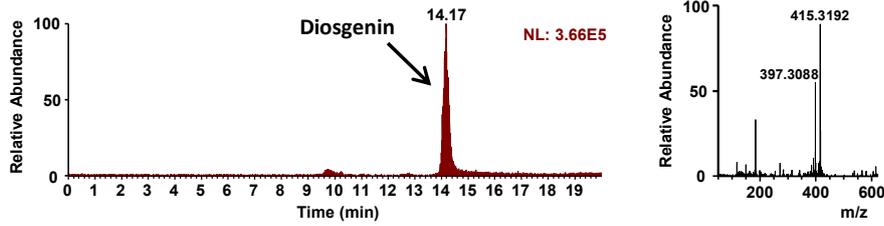
しかし、日本薬局方山薬は、diosgenin 含量は低いものの、種々の diosgenin 配糖体 (例: dioscin, protodioscin, pseudoprotodioscin) が含有されており、服用後に腸内細菌によって diosgenin に代謝されることが知られている (Yi et al., 2014)。そこで、常法山薬エキス経口投与後に、体内で diosgenin 配糖体から diosgenin に代謝され、その diosgenin が脳移行する可能性を期待し、常法山薬エキスまたは diosgenin 高濃度山薬エキス経口投与後における diosgenin の脳移行性を比較した。正常マウス (雄性、7 週齢) に対し、記憶試験 (Fig. 45F) で用いた投与量と同じ 100 mg/kg の常法山薬エキス及び diosgenin 高濃度山薬エキスを単回経口投与した。また、ポジティブコントロールとして diosgenin を 16 mg/kg (100 mg/kg diosgenin 高濃度山薬エキス中に含有される diosgenin 相当量) を単回経口投与した。各投与 6 時間後に、マウスから大脳皮質と血漿を採取し、LC-MS/MS で diosgenin を検出した。その結果、常法山薬エキス投与群では大脳皮質及び血漿 (データ未提示) 中いずれにおいても diosgenin が検出されなかったが、diosgenin 高濃度山薬エキス及び diosgenin を投与したマウスの大脳皮質及び血漿からは、標品 diosgenin (Fig. 46A) と同じ retention time に、diosgenin のピークが検出された (Fig. 46C)。したがって、常法山薬エキスを経口投与しても、diosgenin 配糖体から diosgenin への代謝、及び diosgenin の脳への移行はないものと考えられた。

一方で、*D. nipponica*、*D. panthaica*、*D. zingiberensis* 等の他の *Dioscorea* 属植物のエキスを経口投与

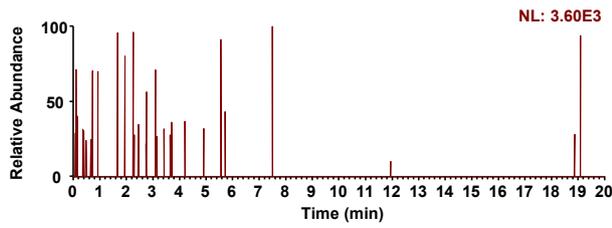
した場合、長時間（1-2 日）後にならないと diosgenin 配糖体からの代謝がピークに到達せず、diosgenin の血漿濃度が増加しないことが報告されている (Tang et al., 2015)。そこで次に、常法山薬エキス投与の 24 または 48 時間後に脳を摘出し、diosgenin の検出を試みた。さらに、LC-MS/MS での検出限界を考慮し、常法山薬エキスの投与量を 500 mg/kg に高めて経口投与した。正常マウス（雄性、7 週齢）に 500 mg/kg 常法山薬エキスを単回経口投与し、その 24 または 48 時間後にマウスから大脳皮質と血漿を採取し、LC-MS/MS で diosgenin を検出した。その結果、エキス投与から 24、48 時間後のいずれにおいても、diosgenin は大脳皮質及び血漿中で検出されなかった (Fig. 46D)。ヒトに対する投与量を考慮した際に、この 500 mg/kg 以上のエキスを投与することは非現実的だと考えたため、これ以上高濃度の常法山薬エキスを経口投与する実験は行わなかった。

最後に、エキスを油及び水溶媒で投与した際の diosgenin の脳移行性の違いについて検討した。LC-MS/MS での検出感度を高めるために、diosgenin 高濃度山薬エキスを 50 mg/マウス（体重 40 g マウスの場合、1250 mg/kg）の高用量となるようにオリーブオイルまたは水に懸濁した。ddY マウス（雌性、8 週齢）に 50 mg/マウス diosgenin 高濃度山薬エキスを単回経口投与し、その 3、6、または 12 時間後にマウスから大脳皮質と血漿を採取し、LC-MS/MS で diosgenin を検出した (Fig. 46E)。その結果、エキスの溶媒をオリーブオイルとした場合と比べて、水溶媒とした場合では diosgenin の血漿中及び脳移行性がともに顕著に低かった。また、溶媒をオリーブオイルとした場合では、投与後 12 時間後においても diosgenin の脳内濃度が高く維持されていることが示された。以上より、油溶媒として経口投与することが、diosgenin の脳移行性を高め、記憶亢進作用を発揮するために必須であると考えられた。

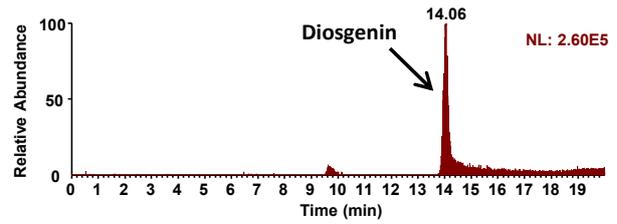
A Standard Diosgenin



B Yam



Diosgenin-rich Yam



C

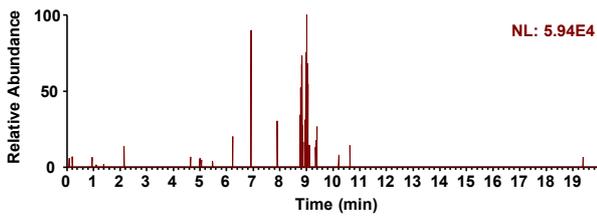
Vehicle
Yam (100 mg/kg)
Diosgenin-rich Yam (100 mg/kg)
Diosgenin (16 mg/kg)



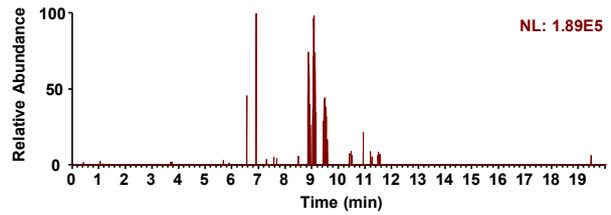
6 h

Cortex and Plasma samples

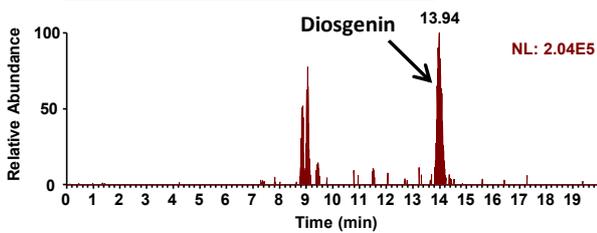
Vehicle (Cortex, 6 h)



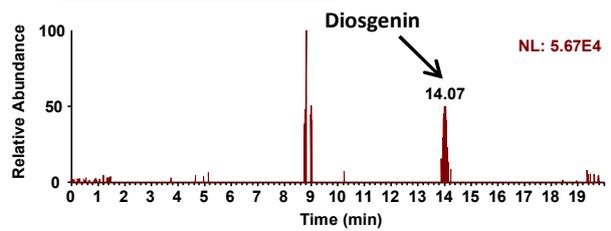
Yam (Cortex, 6 h)



Diosgenin-rich Yam (Cortex, 6 h)

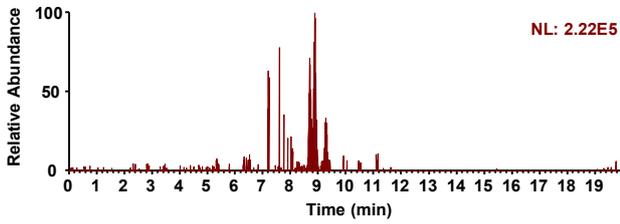


Diosgenin (Cortex, 6 h)

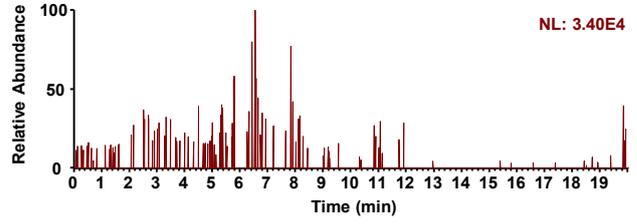




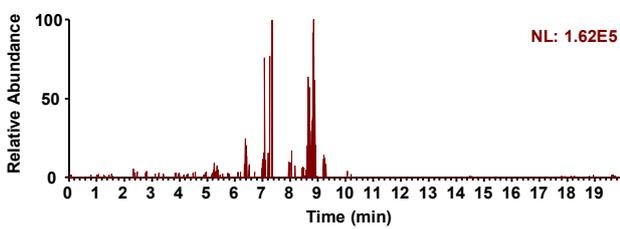
Vehicle (Cortex, 24 h)



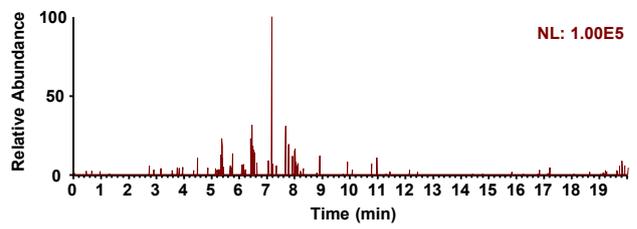
Vehicle (Plasma, 24 h)



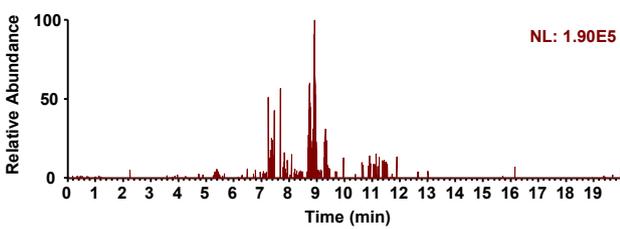
Yam (Cortex, 24 h)



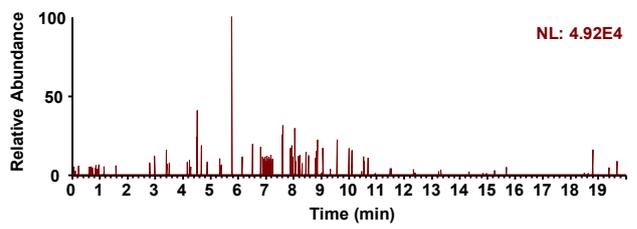
Yam (Plasma, 24 h)



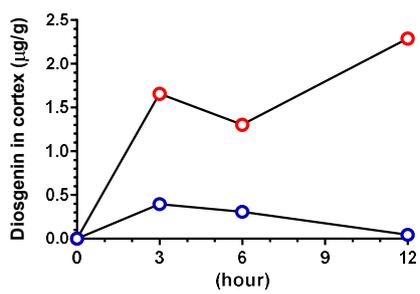
Yam (Cortex, 48 h)



Yam (Plasma, 48 h)



E **Cortex**



Plasma

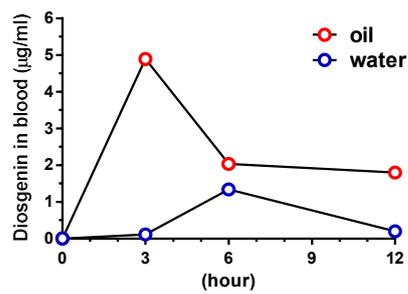


Fig. 46: 常法山薬エキスまたは diosgenin 高濃度山薬エキス経口投与後の diosgenin の脳移行性の検討

A, LC-MS/MS における diosgenin (10 µg/ml) の標準ピーク。Diosgenin ($m/z = 415.3192$) のイオン電流クロマトグラム (左) 及び質量スペクトル (右) を示す。NL: 正規化レベル (ベースピークを基準)。

B, 常法山薬エキス (左) または diosgenin 高濃度山薬エキス (右) (各 100 µg/ml) のイオン電流クロマトグラムを示す。

C, ddY マウス (雄性、7 週齢) に溶媒または 100 mg/kg 常法山薬エキス、100 mg/kg diosgenin 高濃度山薬エキス、または 16 mg/kg diosgenin を単回経口投与した。薬物投与 6 時間後に大脳皮質を採取した。LC-MS/MS において、イオン電流クロマトグラムより大脳皮質中に含まれる diosgenin を検出した。

D, ddY マウス (雄性、7 週齢) に溶媒または 500 mg/kg 常法山薬エキスを単回経口投与した。薬物投与 24 または 48 時間後に血漿および大脳皮質を採取した。LC-MS/MS において、イオン電流クロマトグラムより大脳皮質及び血漿中に含まれる diosgenin を検出した。

E, ddY マウス (雌性、8 週齢) に溶媒または 50 mg/マウス diosgenin 高濃度山薬エキスを単回経口投与した。薬物投与 3、6、または 48 時間後に血漿および大脳皮質を採取した。LC-MS/MS において、イオン電流クロマトグラムより大脳皮質及び血漿中に含まれる diosgenin を検出した。

[Yang et al., 2021 より引用、一部改変]

3.3.3. 山薬エキスによる記憶亢進に関わる活性成分の検討

ここまでの検討により、常法山薬エキスにはそもそも diosgenin が全く検出されないため、経口投与後に diosgenin が脳移行できず、記憶亢進作用が見られないことが示された。しかし、常法山薬エキス中には diosgenin 以外の成分が多く含まれるため、それらが本当に軸索伸長及び記憶亢進に関与しないかどうかを検討した。具体的には、常法山薬エキスに diosgenin を人為的に添加し、正常マウスの記憶亢進作用、及び培養神経細胞に対する軸索伸長作用を比較する実験を行った。

まず、正常 ddY マウス（雌性、6 週齢）に溶媒または 100 mg/kg/day 常法山薬エキス、または 100 mg/kg/day 常法山薬エキス + 16 mg/kg/day diosgenin (diosgenin 高濃度山薬エキス中の diosgenin 相当量) をそれぞれオリーブオイルに溶解し、7 日間連続で経口投与後、物体認知記憶試験を行った (Fig. 47A)。その結果、常法山薬エキス投与群では記憶亢進作用が見られなかったのに対し、常法山薬エキス + diosgenin 添加群では、記憶亢進作用が見られた。

続いて、大脳皮質神経細胞を 3 日間培養し、溶媒、2.5 µg/ml 常法山薬エキス、2.5 µg/ml diosgenin 高濃度山薬エキス (1 µM diosgenin に相当)、または 2.5 µg/ml 常法山薬エキス + 1 µM diosgenin を 4 日間処置し、抗 Map2 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った (Fig. 47B)。その結果、常法山薬エキス群では有意な軸索及び樹状突起伸長作用は見られなかったが、diosgenin 高濃度山薬エキス群及び常法山薬エキス + diosgenin 群では、軸索及び樹状突起が有意に伸長した (Fig. 47C)。以上の結果より、山薬中の記憶亢進作用及び神経突起伸長作用は、エキス中の diosgenin 量のみ依存していることが示され、つまり diosgenin 以外の成分はこれらの作用に関与する活性成分ではないことが示唆された。

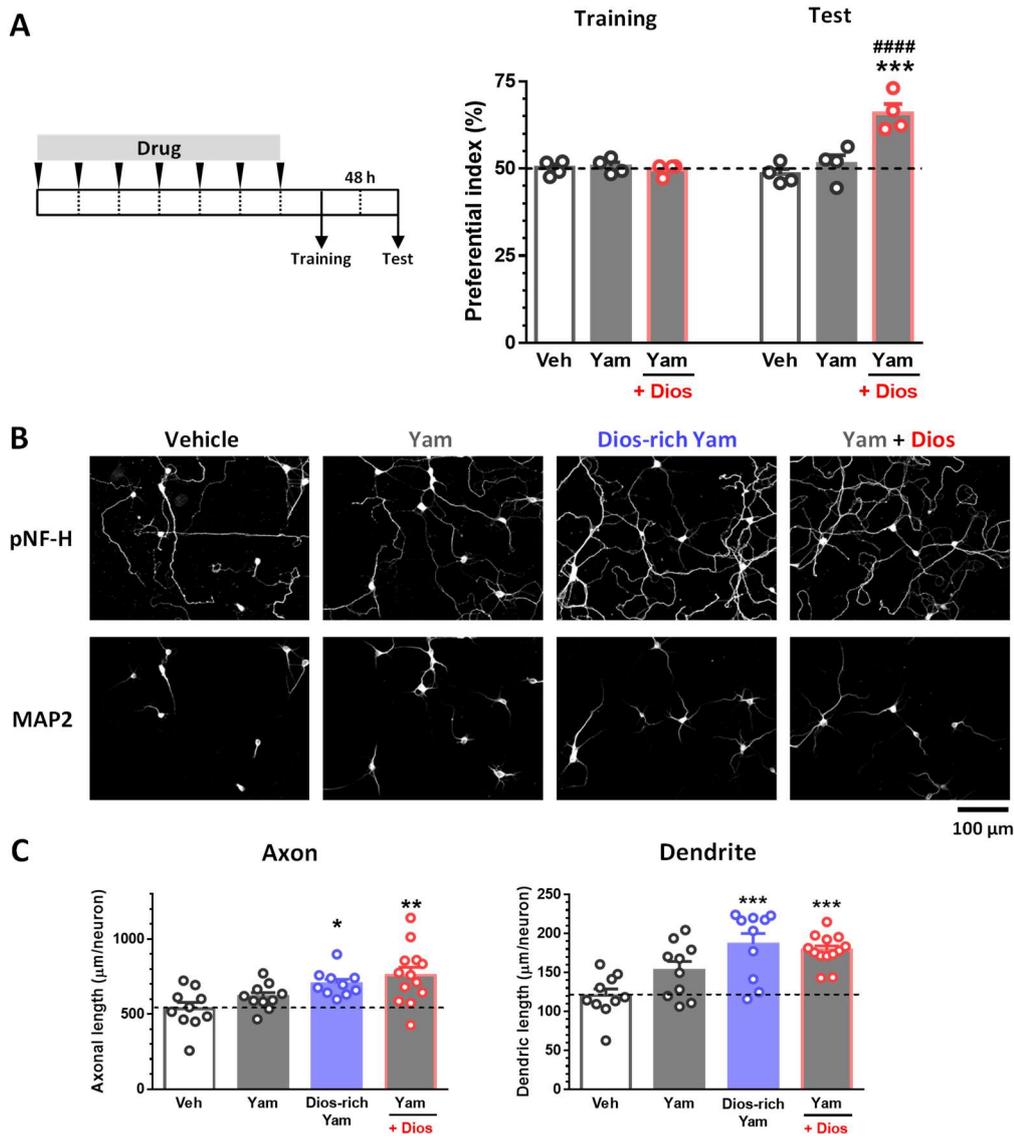


Fig. 47: 山薬エキスによる記憶亢進及び神経突起伸長に関わる活性成分

A, 100 mg/kg/day 常法山薬エキスまたは 100 mg/kg/day 常法山薬エキス + 16 mg/kg/day をオリーブオイルに溶解し、ddY マウス (雌性、6 週齢) に 7 日間経口投与した。その後、物体認識記憶試験を行った。Training session と Test session は各々 10 分間行い、インターバルは 48 時間に設定した。新奇物体に対するマウスの接触回数を計測し、preferential index (%) を算出した。*** $p < 0.01$ vs Veh, one-way ANOVA, *post hoc* Dunnett's test; #### $p < 0.0001$ vs Veh, repeated measures two-way ANOVA [F(2, 9) = 11.94, $p = 0.0029$], *post hoc* Bonferroni test, mean \pm SD, $n = 4$ mice. **B, C**, ddY (E14) マウス大脳皮質初代培養神経細胞を 3 日間培養後、溶媒、2.5 μ g/ml 常法山薬エキス、2.5 μ g/ml diosgenin 高濃度山薬エキス (1 μ M diosgenin に相当)、または 2.5 μ g/ml 常法山薬エキス + 1 μ M diosgenin を 4 日間処置し、抗 Map2 抗体及び抗 pNF-H 抗体による蛍光免疫染色を行った。(B) 各薬物処理群における pNF-H 陽性軸索の長さ、及び Map2 陽性樹状突起の長さを定量した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs Veh, one-way ANOVA *post hoc* Dunnett's test, mean \pm SEM, $n = 10$ –13 photos. [Yang et al., 2021 より引用、一部改変]

3.3.4. 種々の油溶媒で経口投与した際の diosgenin の脳移行性の比較

ここまでの実験において、少なくとも diosgenin をオリーブオイルまたはゴマ油のいずれに溶解させて経口投与した場合でも、diosgenin が脳に移行し、記憶を亢進させることを示した。しかし、全ての油脂が diosgenin の脳移行性を高めるのか、あるいは油脂の種類によって脳移行性が異なるのかは未検討であった。そこで、オリーブオイルと比べて、魚油、中鎖脂肪酸トリグリセリドに溶解した場合の diosgenin の脳移行性を比較した。

8 mg diosgenin (Fig. 46E における 50 mg diosgenin 高濃度山薬エキス中の diosgenin 量に相当) をオリーブオイル、魚油、または中鎖脂肪酸トリグリセリドにそれぞれに溶解したものを正常 ddY マウス (雄性、8 週齢) に単回経口投与した。投与 6 時間後にマウスから血漿及び大脳皮質を採取し、LC-MS/MS で diosgenin 含量を検出した (Fig. 48A, B)。その結果、diosgenin をオリーブオイルに溶解した場合には、diosgenin の血中濃度が高かった ($32.196 \pm 3.773 \mu\text{g/ml}$) が、魚油に溶解した場合には $9.781 \pm 4.790 \mu\text{g/ml}$ となり、オリーブオイルに溶解した場合より有意に低いことがわかった。さらに、中鎖脂肪酸トリグリセリドに溶解した場合には diosgenin の血中濃度がさらに低い ($0.909 \pm 0.488 \mu\text{g/ml}$) ことが示された (Fig. 48A)。大脳皮質中の diosgenin 量についても、diosgenin をオリーブオイルに溶解した場合には高い値を示し ($17.576 \pm 6.642 \mu\text{g/g}$)、魚油に溶解した場合には $2.024 \pm 0.278 \mu\text{g/g}$ と有意に低かった。また、中鎖脂肪酸トリグリセリドに溶解した場合には diosgenin の脳移行性はさらに低かった ($0.374 \pm 0.408 \mu\text{g/g}$) (Fig. 48B)。このことより、溶解する油脂によって diosgenin の脳移行性に大きな違いが生じることが示唆された。

この理由を考察するために、各油脂の脂肪酸組成を Table 4 に示した。中鎖脂肪酸トリグリセリドは、飽和脂肪酸 (炭素間二重結合なし) のカプリル酸とカプリン酸のみで構成されている。一方で、オリーブオイルや魚油は、カプリル酸とカプリン酸以外の飽和脂肪酸の他、一価不飽和脂肪酸 (1 つの炭素間二重結合) 及び多価不飽和脂肪酸 (複数の炭素間二重結合) によっても構成されている。また、オリーブオイルと魚油の違いとして、オリーブオイルにはオレイン酸やリノール酸が多く含まれることが挙げられる。油による diosgenin の血漿及び脳への輸送メカニズムは不明であるが、本研究より、少なくともオレイン酸及びリノール酸が diosgenin の脳輸送に重要な役割を担っているのではないかと考えられた。詳細は 3.4. 考察において議論する。

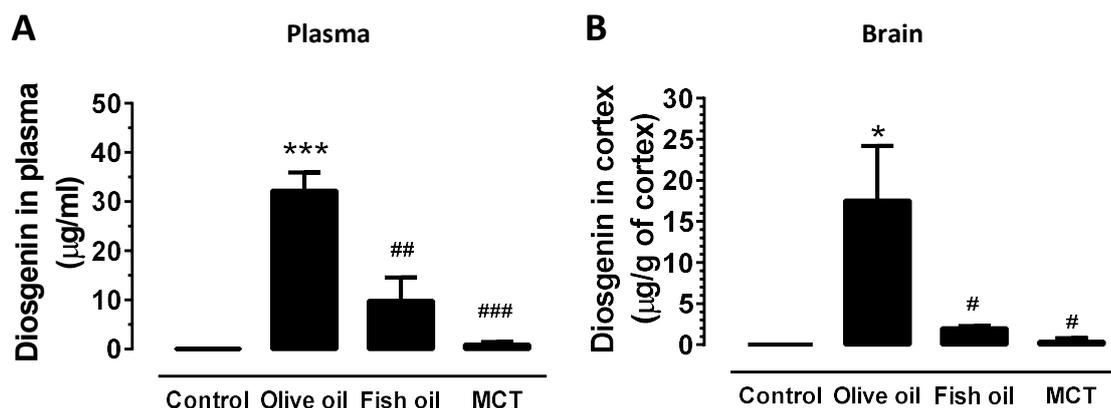


Fig. 48: 溶媒となる油脂の違いによる diosgenin の血漿中及び脳移行性の違い

ddY マウス（雄性、8週齢）に溶媒（control）及び8 mg diosgeninをオリーブオイル、魚油、または中鎖脂肪酸トリグリセリドに溶解したものを単回経口投与した。薬物投与6時間後に血漿および大脳皮質を採取した。LC-MS/MSにおいて、イオン電流クロマトグラムより血漿 (A) 及び大脳皮質 (B) 中に含まれる diosgeninを検出した。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs Control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs Olive oil, one-way ANOVA, *post hoc* Tukey test, mean \pm SD, $n = 3$ mice. [Tohda et al., 2020 より引用、一部改変]

Table 4: オリーブオイル、魚油、及び中鎖脂肪酸トリグリセリドの脂肪酸組成

[Tohda et al., 2020 より引用、一部改変]

	飽和脂肪酸											一価不飽和脂肪酸					多価不飽和脂肪酸				
	Caprylic acid	Capric acid	Lauric acid	Myristic acid	Pentadecanoic acid	Palmitic acid	Heptadecanoic acid	Stearic acid	Arachidic acid	Behenic acid	Lignoceric acid	Myristoleic acid	Palmitoleic acid	Heptadecenoic acid	Oleic acid	Icosenoic acid	Linoleic acid	α -Linolenic acid	Arachidonic acid	Eicosapentaenoic acid	Docosahexaenoic acid
Fatty acid composition	8:0	10:0	12:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	24:0	14:1	16:1	17:1	18:1	20:1	18:2 (n=6)	18:3 (n=3)	20:4 (n=6)	20:5 (n=3)	22:6 (n=3)
Olive oil	0	0	0	0	0	10.4	0	3.1	0.4	0.1	0	0	0.7	0	77.3	0.3	7	0.8	0	0	0
Fish oil from menhaden	0	0	0	6-9	0	15-20	0	3-4	0	0	0	0	9-14	0	5-12	0	0	0	0	10-15	8-15
Medium-chain triglyceride	60	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3.5. Diosgenin 高濃度山薬エキスによる健常人の認知記憶に対する効果の検討

ここまでの基礎検討により、山薬エキスとして diosgenin を脳に作用させ、記憶亢進作用を発揮するには、diosgenin 高濃度山薬エキスを油溶媒（特にオリーブオイル）に溶解したものをを用いることが最適な製剤条件であることが示唆された。そこで、これを独自製剤（特許権利化: レジリオ株式会社）として開発し、健常人の認知機能に対する効果を評価する臨床研究を行うこととした。

Fig. 49 において、本臨床研究（プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー試験）の CONSORT フローチャートを示す。まず、計 41 人の被検者をランダムに 2 群に割り付け、除外基準に該当した 10 名を除外した。残りの被検者（31 名）に対し、12 週間のプラセボまたは 50 mg/day diosgenin 高濃度山薬エキス（diosgenin 量として 8 mg/day）の服用を実施した。うち 3 名の被験者は、個人の都合により途中で試験参加を中止した。その後、6 週間の休薬期間を設けた後、プラセボ群と diosgenin 高濃度山薬エキス群を逆にし、さらに 12 週間の服薬期間を設けた（クロスオーバー）。最終的に全服薬を終了した計 28 人の被験者について、服薬前後における認知機能変化を RBANS にて評価した。

RBANS における総得点、及び RBANS の 5 つの下位項目である即時記憶、視空間/構成、言語、注意、遅延記憶それぞれのスコアの変化量を算出した。その結果、diosgenin 高濃度山薬エキス服用により、全被検者 28 名における RBANS の総得点変化は有意に増加しており、健常人において認知機能が亢進することが示された (**Fig. 50A**)。また、28 名の被験者を男女（男性 12 名、女性 16 名）別に分けて見ると、diosgenin 高濃度山薬エキス服用によりどちらにおいても認知機能が亢進する傾向を示した (**Fig. 50B**)。さらに、全被験者について、46 歳以下（15 名）と 47 歳以上（13 名）に分けた場合、及び 58 歳以下（19 名）と 60 歳以上（9 名）に分けた場合のどちらにおいても、年齢が上のグループで認知機能が有意に亢進することが示された (**Fig. 50C**)。また、RBANS の 5 つの下位項目については、即時記憶 (**Fig. 50D**) を除く全ての項目 (**Fig. 50E-H**) において、diosgenin 高濃度山薬エキス服用群では平均値が高かった。なお、血液検査の値はいずれの項目も群間差は見られなかったため（データ未提示）、今回の服用量では有害事象は起こっていないことが示された。以上の結果より、diosgenin 高濃度山薬エキスを服用することにより、健常人において認知機能が亢進することが初めて明らかとなった。また、この科学的根拠及び特許に基づき、新規機能性表示食品「ジオスゲニン・ゴールド[®]」（レジリオ株式会社）の開発に繋げることができた。

CONSORT 2010 Flow Diagram

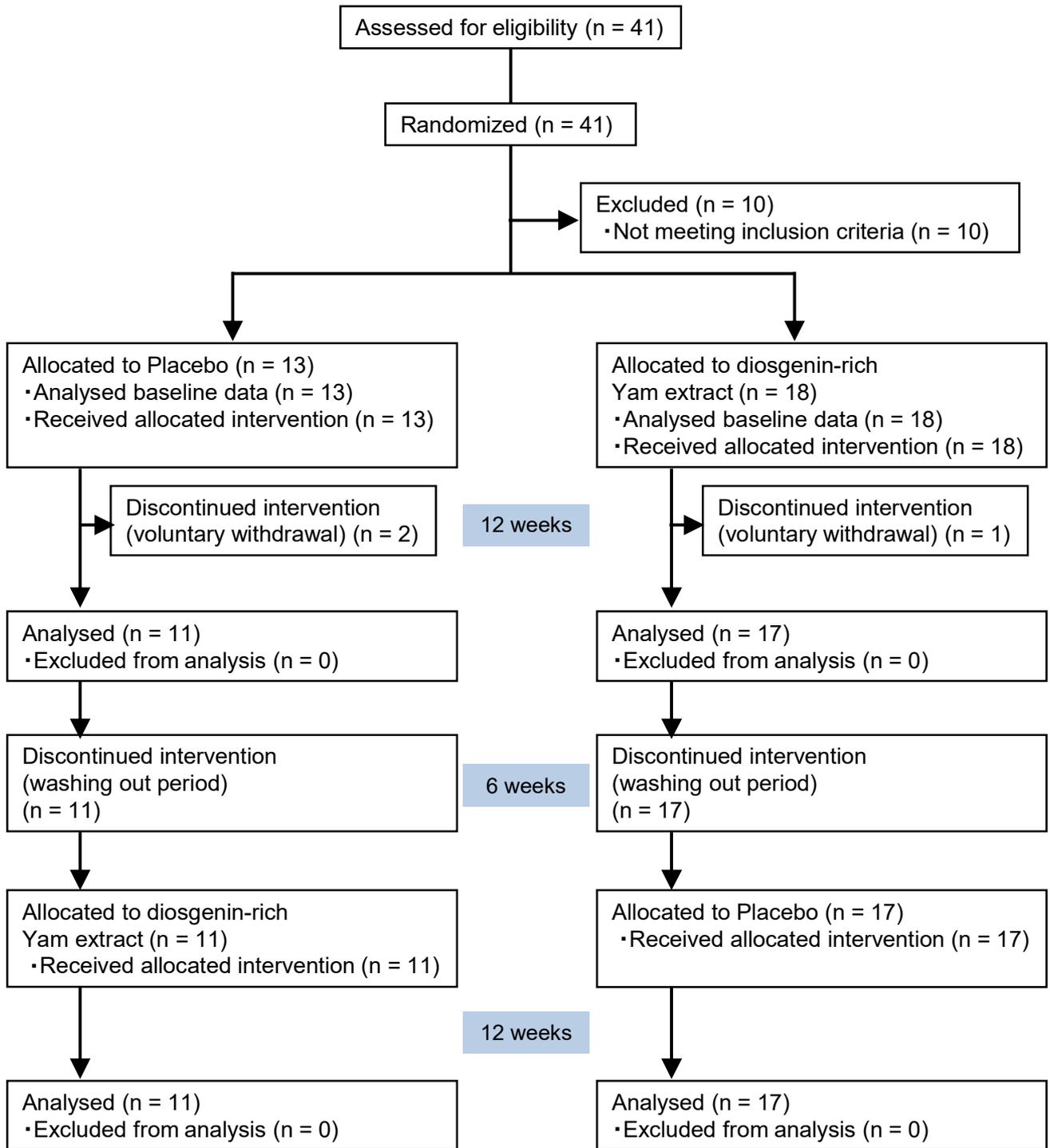


Fig. 49: 本研究の CONSORT フローチャート

[Tohda et al., 2017 より引用]

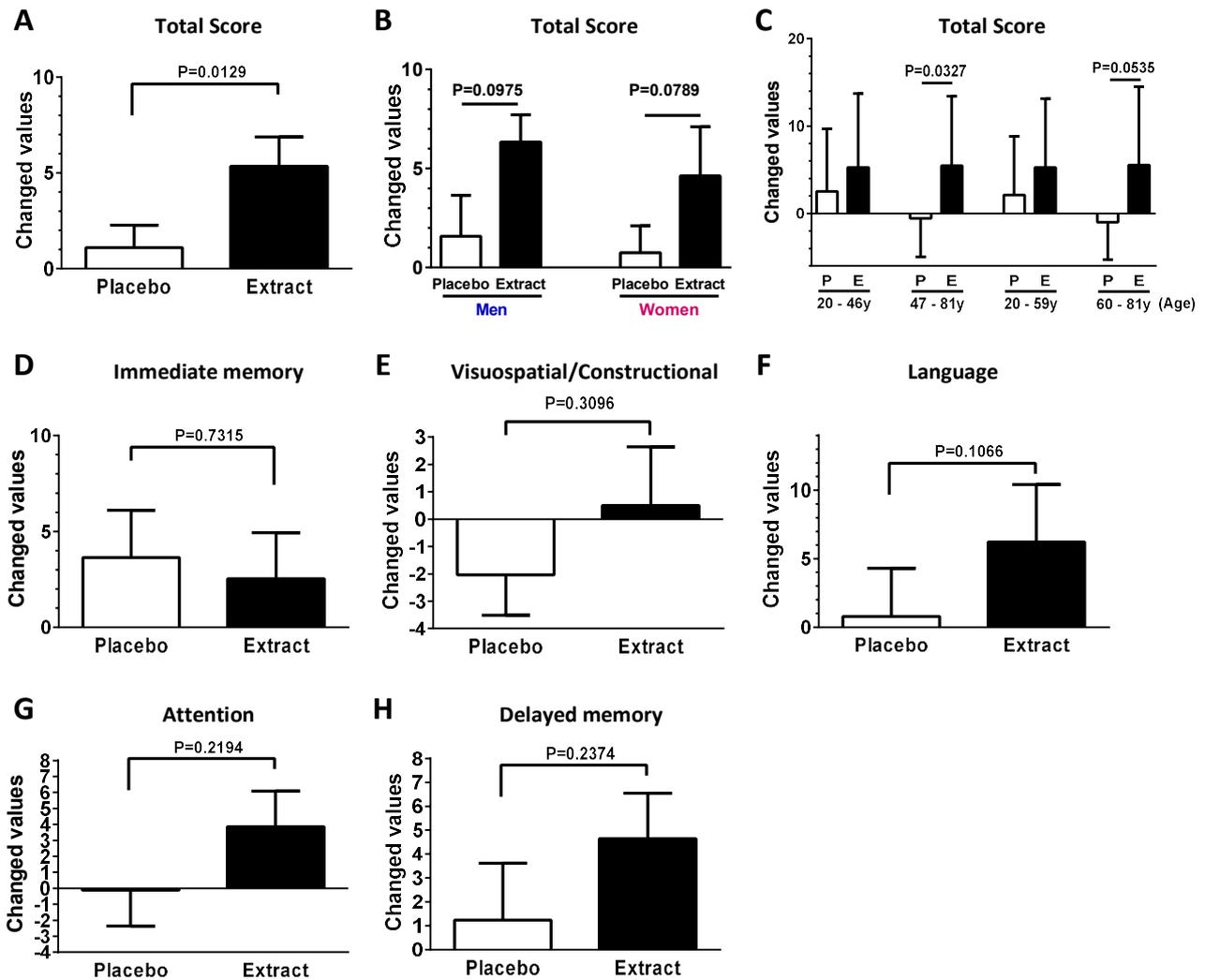


Fig. 50: Diosgenin 高濃度山薬エキスによる健常人の認知記憶亢進に対する効果

プラセボまたは 50 mg/day diosgenin 高濃度山薬エキスを 12 週間服用し、服用前後における健常人（男女計 28 名）の認知機能変化を RBANS で評価した。(A) 28 名の全被験者における総得点変化、(B) 男性 12 名、女性 16 名別の総得点変化、(C) 46 歳以下（15 名）、47 歳以上（13 名）（左）、及び 58 歳以下（19 名）、60 歳以上（9 名）（右）の総得点変化、(D) 即時記憶、(E) 視空間/構成、(F) 言語、(G) 注意、(H) 遅延記憶それぞれのスコアの変化量を示す。Paired *t*-test, mean ± SD. [Tohda et al., 2017 より引用、一部改変]

3.4. 考察

本章ではまず、diosgenin を水溶性溶媒に溶解して経口投与しても正常マウスにおいて記憶亢進作用が見られないが、油溶媒に溶解して経口投与すると低用量 (0.1 $\mu\text{mol/kg/day}$) でも記憶が亢進することを示した (Fig. 45)。この原因として、水溶性溶媒に溶解した場合には diosgenin の脳移行が低いとめだと考えられた (Fig. 47E)。一方で、油溶媒でも油脂の種類によっては経口投与後の diosgenin の脳移行性が悪くなることも示された (Fig. 49)。また、3.1. 緒言で述べた予想の通り、常法山薬エキス中にはそもそも diosgenin の含量がなく、また高投与量で経口投与しても体内で配糖体から diosgenin への代謝も見られず、記憶亢進作用も見られなかった。一方、diosgenin 高濃度山薬エキスを経口投与すると十分量の diosgenin が脳に移行し、記憶亢進作用を示した (Fig. 45F, Fig. 46)。さらに、山薬エキス中の diosgenin 以外の成分は軸索伸長及び記憶亢進作用には関与しないことが示唆された (Fig. 48)。そこで、diosgenin 高濃度山薬エキスをオリーブオイル溶媒に溶解した製剤を用いて臨床研究 (プラセボ対照ランダム化二重盲検クロスオーバー試験) を行ったところ、diosgenin 高濃度山薬エキスを服用した健常人では認知機能が亢進することが明らかになった (Fig. 50)。これら一連の科学的根拠及び特許に基づき、diosgenin を機能関与成分とした初めての機能性表示食品「ジオスゲニン・ゴールド[®]」(レジリオ株式会社) の開発に寄与した。

Diosgenin は一般的に山薬中の主要成分と認識されてきたため、*D. batatas* を基原とする日本薬局方山薬の熱水抽出エキス中から diosgenin が全く検出されなかった (少なくとも 150 mg/ml 常法山薬エキスをを用いても、LC-MS/MS の検出限界以下) ことは、予想外だった。高用量の 500 mg/kg 常法山薬エキスを経口投与し、体内における diosgenin への代謝を期待した実験をしても、diosgenin が血中及び脳内に全く移行しなかったこと (Fig. 46D) から、今回用いた *D. batatas* 中には diosgenin だけでなく diosgenin 配糖体の量も低い、或いは diosgenin 配糖体から diosgenin への生体内での代謝効率が著しく低いことが予想された。他の研究グループも、日本薬局方山薬 *Dioscorea Rhizome* のメタノール抽出エキスからは、diosgenin が全く検出されないことを報告している (Kawazoe et al., 2017)。また、これまでに種々の *Dioscorea* 属抽出エキスが、動物実験において記憶亢進作用を有することが報告されており (Chiu et al., 2009; Yang et al., 2009)、エキス中の diosgenin や diosgenin 配糖体の含量を測定していないものもあるにもかかわらず、おそらく活性成分は diosgenin だろうと考察されている文献も見受けられるが、もし diosgenin 含量の低い *Dioscorea* エキスをを用いた場合は、その効果は diosgenin によるものではない可能性が高いと考えられる。同様に、仮に山薬を含む漢方方剤が記憶亢進作用を示す場合にも、その効果を担う活性成分は diosgenin であろうと安易に推測されがちだが、エキス中の diosgenin 含量、経口投与の溶媒、diosgenin の脳移行性の有無の観点から慎重に考察しない限り、そのエキス中の他の真の活性成分を見落としてしまうリスクがあるため、注意が必要である。

Diosgenin は脂溶性が高い化合物 (cLogP = 5.912) であるにも関わらず、投与後のバイオアベイラビリティは低いため、例えば diosgenin を β -シクロデキストリンに溶解し、皮膚への移行の改善を試み

た例もある (Okawara et al., 2013)。本研究においても、diosgenin を水溶性溶媒で腹腔内投与すると正常マウスの記憶が亢進するが、水溶性溶媒で経口投与しても記憶亢進作用を示さないこと (Fig. 45A, B) が確認された。Diosgenin を水溶性溶媒で経口投与すると、消化管からの吸収が悪いのか、初回通過効果の影響を受けるせいで、血中 diosgenin 濃度が高まらない可能性を考えている。一方で、diosgenin をオリーブオイル、ゴマ油、大豆油等の油溶媒に溶解して経口投与すると、diosgenin の血中濃度及び脳移行が高まり、記憶亢進作用を示したこと (Fig. 45C-E) から、油溶媒とすることが diosgenin のバイオアベイラビリティを高めるカギとなっていることが示された。しかし、油脂であれば何でも diosgenin の血中及び脳への移行を高める訳ではなく (Fig. 49)、オレイン酸及びリノール酸配合が高いオリーブオイルが、比較検討に用いた油脂の中では最適であることも示された (Table 4)。

油による diosgenin の血漿及び脳への輸送メカニズムの詳細は不明であるが、diosgenin は脂溶性が高いため、そもそも油溶媒との親和性が高い。一般的に、水溶性薬物は経口投与後に毛細血管に取り込まれやすく、門脈及び肝臓に移行するため、初回通過効果を受ける。一方で、脂溶性薬物はリンパ管から取り込まれやすく、初回通過効果を受けることなく全身に移行することが知られている。他のグループによる 9 種類の油脂をラットに投与してリンパへの移行率を比較した研究では、リンパ液中の蓄積量はオリーブオイルが最大であり、魚油を含むその他の油脂はそれよりも低かった (Porsgaard & Høy, 2000)。したがって、diosgenin をオリーブオイルに溶解して経口投与すると、オリーブオイルによってリンパ管への移行がさらに高まり、それによって体内における滞在性が増加し、脳移行性が高まった可能性が考えられる。また、オリーブオイル及び魚油投与後にリンパ管に吸収される脂肪酸の種類を比較すると、オリーブオイル投与後にはオレイン酸のリンパ管での蓄積が多いこともわかっている (Porsgaard & Høy, 2000) ことから、オレイン酸が diosgenin の血中及び脳移行に重要な役割を担っている可能性がある。脳内にもリンパ管が存在するとの報告があることから (Louveau et al., 2015)、diosgenin のリンパ管への吸収性、リンパ管からの脳移行性が油溶媒 (特に高オレイン酸油脂) によって促進される分子メカニズムを詳細に解明する必要があると考えられる。

これまでに diosgenin には、抗がん作用、抗心疾患作用、抗高脂血症作用、抗糖尿病作用等の多くの薬理作用を有することが *in vitro* 及び *in vivo* の実験系によって明らかにされている (Chen et al., 2015; Semwal et al., 2022)。しかし、diosgenin の効果を臨床研究で検証した例はなかった。本研究では、diosgenin 高濃度山薬エキスを服用すると、健常人の認知機能が亢進することを初めて見出した (Fig. 50)。その亢進効果は 47 歳以上の中高年において顕著であった (Fig. 50C)。加齢に伴って脳内の神経回路の密度及びシナプス伝達能は低下するため (Hof & Morrison, 2004)、diosgenin 高濃度山薬エキスの記憶亢進効果が特に高齢グループで顕著に検出されたものと考えられる。また、本臨床研究における diosgenin 高濃度山薬エキスの用量は 50 mg/day (diosgenin として 8 mg/day) に設定した。マウスへの経口投与で効果を示すことが確実な diosgenin の投与量 0.1–10 $\mu\text{mol}/\text{kg}/\text{day}$ をヒト等価用量で除して、体重 60 kg のヒトに換算すると、0.2–20.2 mg/ヒト/day となることから、およその中間値として 8 mg/

ヒト/day とした。また、本臨床研究において、diosgenin 高濃度山薬エキス服用による有害事象は検出されず、中性脂肪の値が減少傾向を示したことから（データ未提示）、少なくとも今回設定した服用量では副作用はなかったものと思われる。実際に diosgenin は安全性が高い化合物として知られており、マウスにおける LD50 は 8 g/kg 以上（体重 60 kg のヒトに換算すると 480 g/ヒト以上）である。また、山薬も diosgenin も食薬区分において“非医”に区分されており、安全な素材であることが裏付けされている。以上の結果より、diosgenin 高濃度山薬エキスは健常人において認知機能を高める有力な素材であることが示された。

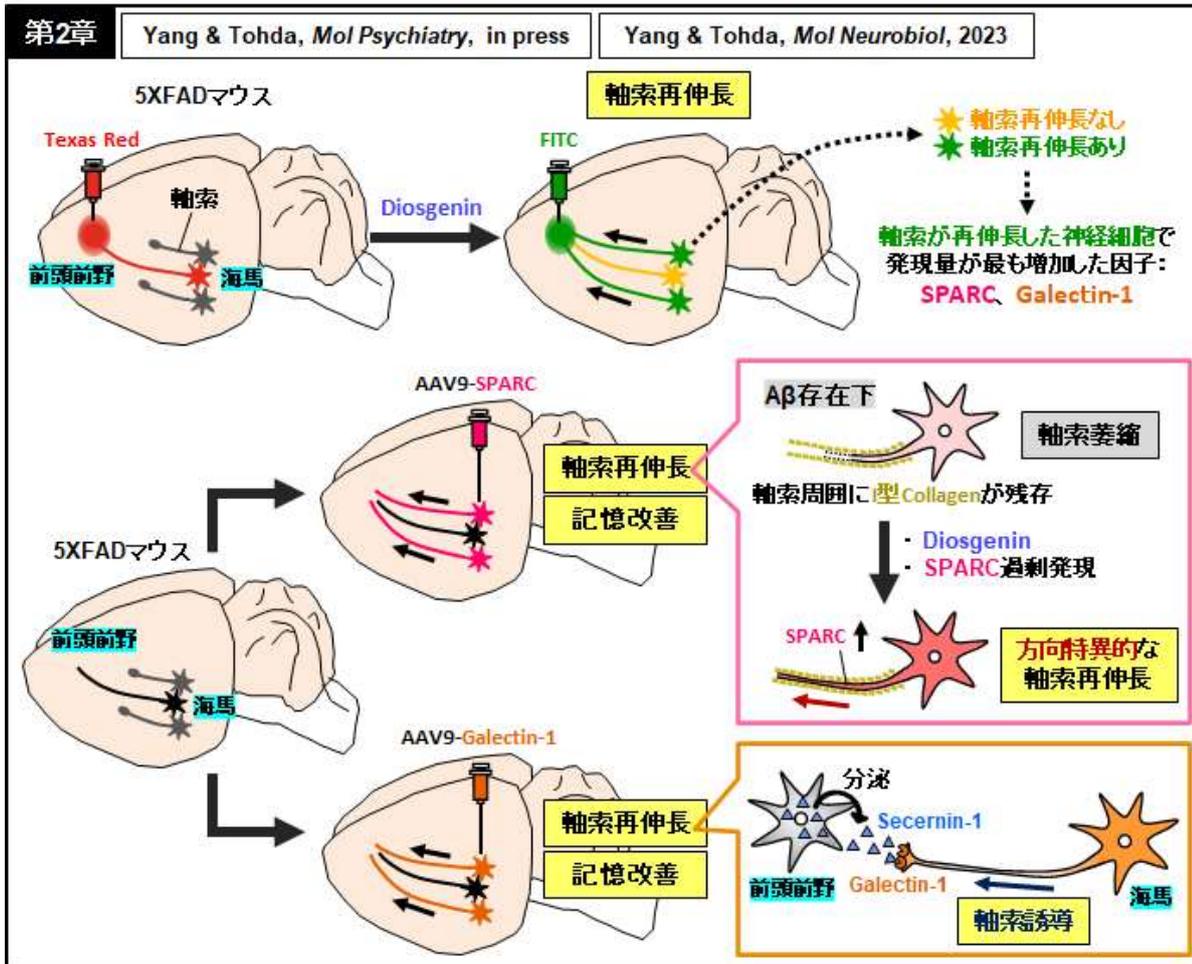
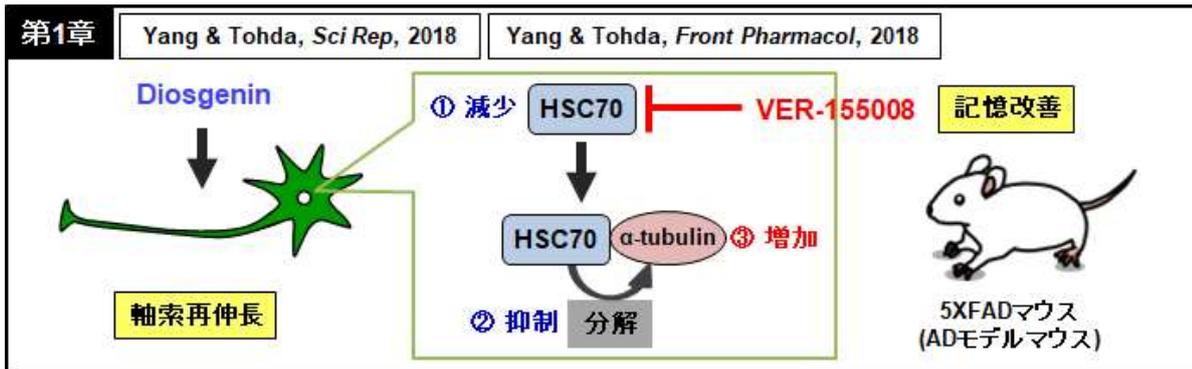
2.5. 小括

本章では、diosgenin を多く含む diosgenin 高濃度山薬エキスを、オリーブオイルを始めとする油溶媒で経口投与することにより、十分量の diosgenin が脳に移行し、正常マウスの記憶を亢進することを動物実験で示した (Tohda et al., 2020; Yang et al., 2021)。また、山薬エキス中の diosgenin 以外の成分は、記憶亢進作用には関与しないことも示唆された。さらに、基礎研究で見出した山薬エキスの条件に基づき、diosgenin 高濃度山薬エキスをオリーブオイルに溶解したソフトカプセル製剤を作製し、本エキス製剤が健常人の認知機能を高めることを初めて証明した (Tohda et al., 2017)。現在は、本エキス製剤の軽度認知障害及び軽度 AD 患者の認知機能に対する効果を特定臨床研究で検討しており、diosgenin 含有製剤が新規 AD 治療薬に発展することが期待される。

総括および展望

本研究のまとめの概要図を **Fig. 51** に示す。本研究では、AD モデルマウス脳内において萎縮した軸索が、diosgenin によってつながるべき投射先に向かって再伸長する現象を初めて明らかにした。また、diosgenin による脳内での軸索再伸長に関わる機能分子として、HSC70, SPARC, 及び Galectin-1 を見出した。さらに、脳での軸索再伸長が記憶改善の直接的な要因であることを機能学的に証明し、軸索再伸長をターゲットとした AD の根本的治療戦略の有用性を提示した。一方、diosgenin を脳に作用させるための山薬エキス製剤の条件を明らかにし、diosgenin 高濃度山薬エキス製剤が健常人の認知機能を亢進させることを示した。

Diosgenin は 5XFAD マウス脳内において AD の原因物質 (A β 及びリン酸化タウ) を減らす作用 (Tohda et al., 2012) に加えて、本研究で見出した神経回路の再形成作用を併せ持っていることから、diosgenin や diosgenin 含有山薬エキスは、AD の記憶障害を食い止め改善する画期的な根本的治療薬になりうることを期待される。実際に、当研究室では現在、diosgenin 高濃度山薬エキスの軽度認知障害及び軽度 AD 患者の認知機能に対する特定臨床研究を実施しており、今後は AD 患者を対象とした治験を行うことも目指している。



第3章 Yang et al, *J Nat Med*, 2021 | Tohda et al, *JJFCS*, 2020 | Tohda et al, *Nutrients*, 2017

基礎研究 正常マウスに対する山薬エキスの効果

	Diosgenin 含量	経口投与の溶媒	経口投与後の diosgenin 脳移行性	記憶亢進作用
常法山薬エキス	検出限界以下	オリーブオイル	検出限界以下	×
Diosgenin高濃度山薬エキス	16%	水	低い	×
		オリーブオイル	高い	○

臨床研究 健常人に対する 認知機能亢進作用

Fig. 51: 本研究のまとめ (概要図)

参考文献

- Åhrlund-Richter, S., Xuan, Y., van Lunteren, J. A., Kim, H., Ortiz, C., Pollak Dorocic, I., Meletis, K., & Carlén, M. (2019). A whole-brain atlas of monosynaptic input targeting four different cell types in the medial prefrontal cortex of the mouse. *Nat Neurosci*, 22(4), 657-668. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0354-y>
- Bamburg, J. R., & Bernstein, B. W. (2016). Actin dynamics and cofilin-actin rods in alzheimer disease. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73(9), 477-497. <https://doi.org/10.1002/cm.21282>
- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., et al. (1994). Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, 76(4), 597-598. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7)
- Blazquez-Llorca, L., Valero-Freitag, S., Rodrigues, E. F., Merchán-Pérez, Á., Rodríguez, J. R., Dorostkar, M. M., DeFelipe, J., & Herms, J. (2017). High plasticity of axonal pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathol Commun*, 5(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0415-y>
- Bojic-Trbojevic, Ž., Jovanovic Krivokuca, M., Stefanoska, I., Kolundžic, N., Vilotic, A., Kadoya, T., & Vicovac, L. (2018). Integrin $\beta 1$ is bound to galectin-1 in human trophoblast. *J Biochem*, 163(1), 39-50. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx061>
- Bradshaw, A. D., & Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest*, 107(9), 1049-1054. <https://doi.org/10.1172/jci12939>
- Briggs, J., Chamboredon, S., Castellazzi, M., Kerry, J. A., & Bos, T. J. (2002). Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells. *Oncogene*, 21(46), 7077-7091. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205857>
- Browne, L. P., Crespo, A., & Grubb, M. S. (2022). Rapid presynaptic maturation in naturally regenerating axons of the adult mouse olfactory nerve. *Cell Rep*, 41(10), 111750. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111750>
- Cadiz Diaz, A., Schmidt, N. A., Yamazaki, M., Hsieh, C. J., Lisse, T. S., & Rieger, S. (2022). Coordinated NADPH oxidase/hydrogen peroxide functions regulate cutaneous sensory axon de- and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(30), e2115009119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115009119>
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., & Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16(11), 137r-157r. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl025>

- Chen, J., Wang, M., Xi, B., Xue, J., He, D., Zhang, J., & Zhao, Y. (2012). SPARC is a key regulator of proliferation, apoptosis and invasion in human ovarian cancer. *PLoS One*, 7(8), e42413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042413>
- Chen, Y., Tang, Y. M., Yu, S. L., Han, Y. W., Kou, J. P., Liu, B. L., & Yu, B. Y. (2015). Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chin J Nat Med*, 13(8), 578-587. [https://doi.org/10.1016/s1875-5364\(15\)30053-4](https://doi.org/10.1016/s1875-5364(15)30053-4)
- Cheng, L., Sage, E. H., & Yan, Q. (2013). SPARC fusion protein induces cellular adhesive signaling. *PLoS One*, 8(1), e53202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053202>
- Cheng, Y., Yin, Y., Zhang, A., Bernstein, A. M., Kawaguchi, R., Gao, K., Potter, K., Gilbert, H. Y., Ao, Y., Ou, J., Fricano-Kugler, C. J., Goldberg, J. L., He, Z., Woolf, C. J., Sofroniew, M. V., Benowitz, L. I., & Geschwind, D. H. (2022). Transcription factor network analysis identifies REST/NRSF as an intrinsic regulator of CNS regeneration in mice. *Nat Commun*, 13(1), 4418. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31960-7>
- Chiu, C. S., Deng, J. S., Hsieh, M. T., Fan, M. J., Lee, M. M., Chueh, F. S., Han, C. K., Lin, Y. C., & Peng, W. H. (2009). Yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto) ameliorates cognition deficit and attenuates oxidative damage in senescent mice induced by D-galactose. *Am J Chin Med*, 37(5), 889-902. <https://doi.org/10.1142/s0192415x09007296>
- Citron, B. A., Saykally, J. N., Cao, C., Dennis, J. S., Runfeldt, M., & Arendash, G. W. (2015). Transcription factor Sp1 inhibition, memory, and cytokines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis*, 4(2), 40-48.
- Conde, C., & Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*, 10(5), 319-332. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>
- Cuervo, A. M. (2011). Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(8), 535-541. <https://doi.org/10.1038/nrm3150>
- Deffit, S. N., & Blum, J. S. (2015). A central role for HSC70 in regulating antigen trafficking and MHC class II presentation. *Mol Immunol*, 68(2 Pt A), 85-88. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.04.007>
- Dickson, T. C., & Vickers, J. C. (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 105(1), 99-107. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00169-5](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00169-5)

- Durairajan, S. S., Liu, L. F., Lu, J. H., Chen, L. L., Yuan, Q., Chung, S. K., Huang, L., Li, X. S., Huang, J. D., & Li, M. (2012). Berberine ameliorates β -amyloid pathology, gliosis, and cognitive impairment in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Neurobiol Aging*, 33(12), 2903-2919. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.02.016>
- Everitt, E. A., & Sage, E. H. (1992). Overexpression of SPARC in stably transfected F9 cells mediates attachment and spreading in Ca^{2+} -deficient medium. *Biochem Cell Biol*, 70(12), 1368-1379. <https://doi.org/10.1139/o92-185>
- Fenouille, N., Puissant, A., Dufies, M., Robert, G., Jacquet, A., Ohanna, M., Deckert, M., Pasquet, J. M., Mahon, F. X., Cassuto, J. P., Raynaud, S., Tartare-Deckert, S., & Auberger, P. (2010). Persistent activation of the Fyn/ERK kinase signaling axis mediates imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cells through upregulation of intracellular SPARC. *Cancer Res*, 70(23), 9659-9670. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-10-2034>
- Finka, A., Sharma, S. K., & Goloubinoff, P. (2015). Multi-layered molecular mechanisms of polypeptide holding, unfolding and disaggregation by HSP70/HSP110 chaperones. *Front Mol Biosci*, 2, 29. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00029>
- Freitas, A., Aroso, M., Rocha, S., Ferreira, R., Vitorino, R., & Gomez-Lazaro, M. (2021). Bioinformatic analysis of the human brain extracellular matrix proteome in neurodegenerative disorders. *Eur J Neurosci*, 53(12), 4016-4033. <https://doi.org/10.1111/ejn.15316>
- Gache, V., Louwagie, M., Garin, J., Caudron, N., Lafanechere, L., & Valiron, O. (2005). Identification of proteins binding the native tubulin dimer. *Biochem Biophys Res Commun*, 327(1), 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.138>
- Gaudet, A. D., Sweet, D. R., Polinski, N. K., Guan, Z., & Popovich, P. G. (2015). Galectin-1 in injured rat spinal cord: implications for macrophage phagocytosis and neural repair. *Mol Cell Neurosci*, 64, 84-94. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.12.006>
- Goloudina, A. R., Demidov, O. N., & Garrido, C. (2012). Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer Lett*, 325(2), 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.003>
- Gulyás, A. I., Miettinen, R., Jacobowitz, D. M., & Freund, T. F. (1992). Calretinin is present in non-pyramidal cells of the rat hippocampus--I. A new type of neuron specifically associated with the mossy fibre system. *Neuroscience*, 48(1), 1-27. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90334-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90334-x)

- He, Z., & Jin, Y. (2016). Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron*, *90*(3), 437-451. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.022>
- Hof, P. R., & Morrison, J. H. (2004). The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. *Trends Neurosci*, *27*(10), 607-613. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.07.013>
- Horie, H., Inagaki, Y., Sohma, Y., Nozawa, R., Okawa, K., Hasegawa, M., Muramatsu, N., Kawano, H., Horie, M., Koyama, H., Sakai, I., Takeshita, K., Kowada, Y., Takano, M., & Kadoya, T. (1999). Galectin-1 regulates initial axonal growth in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci*, *19*(22), 9964-9974. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-22-09964.1999>
- Horie, H., Kadoya, T., Hikawa, N., Sango, K., Inoue, H., Takeshita, K., Asawa, R., Hiroi, T., Sato, M., Yoshioka, T., & Ishikawa, Y. (2004). Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci*, *24*(8), 1873-1880. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4483-03.2004>
- Hubert, T., Grimal, S., Carroll, P., & Fichard-Carroll, A. (2009). Collagens in the developing and diseased nervous system. *Cell Mol Life Sci*, *66*(7), 1223-1238. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8561-9>
- Hung, J. Y., Yen, M. C., Jian, S. F., Wu, C. Y., Chang, W. A., Liu, K. T., Hsu, Y. L., Chong, I. W., & Kuo, P. L. (2017). Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) induces cell migration and epithelial mesenchymal transition through WNK1/snail in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, *8*(38), 63691-63702. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19475>
- Isaacman-Beck, J., Schneider, V., Franzini-Armstrong, C., & Granato, M. (2015). The lh3 glycosyltransferase directs target-selective peripheral nerve regeneration. *Neuron*, *88*(4), 691-703. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.004>
- Isabella, A. J., Stonick, J. A., Dubrulle, J., & Moens, C. B. (2021). Intrinsic positional memory guides target-specific axon regeneration in the zebrafish vagus nerve. *Development*, *148*(18). <https://doi.org/10.1242/dev.199706>
- Izaki, Y., Takita, M., & Akema, T. (2008). Specific role of the posterior dorsal hippocampus-prefrontal cortex in short-term working memory. *Eur J Neurosci*, *27*(11), 3029-3034. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06284.x>
- Jin, Y., Dougherty, S. E., Wood, K., Sun, L., Cudmore, R. H., Abdalla, A., Kannan, G., Pletnikov, M., Hashemi, P., & Linden, D. J. (2016). Regrowth of serotonin axons in the adult mouse brain following injury. *Neuron*,

91(4), 748-762. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.024>

Jinwal, U. K., O'Leary, J. C., 3rd, Borysov, S. I., Jones, J. R., Li, Q., Koren, J., 3rd, Abisambra, J. F., Vestal, G. D., Lawson, L. Y., Johnson, A. G., Blair, L. J., Jin, Y., Miyata, Y., Gestwicki, J. E., & Dickey, C. A. (2010). Hsc70 rapidly engages tau after microtubule destabilization. *J Biol Chem*, 285(22), 16798-16805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.113753>

Jones, E. V., Bernardinelli, Y., Zarruk, J. G., Chierzi, S., & Murai, K. K. (2018). SPARC and GluA1-containing AMPA receptors promote neuronal health following CNS injury. *Front Cell Neurosci*, 12, 22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00022>

Kajitani, K., Kobayakawa, Y., Nomaru, H., Kadoya, T., Horie, H., & Nakabeppu, Y. (2014). Characterization of galectin-1-positive cells in the mouse hippocampus. *Neuroreport*, 25(3), 171-176. <https://doi.org/10.1097/wnr.0000000000000068>

Kawazoe, S., Hamaguchi, M., Tanaka, R., Okumura, A., Terabayashi, S. (2017). Contents of diosgenin and dioscin in wild yam supplements. *Journal of food science*, 072, 25-31. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1050564287532074752>

Kim, S., Nam, Y., Jeong, Y. O., Park, H. H., Lee, S. K., Shin, S. J., Jung, H., Kim, B. H., Hong, S. B., Park, Y. H., Kim, J., Yu, J., Yoo, D. H., Park, S. H., Jeon, S. G., & Moon, M. (2019). Topographical visualization of the reciprocal projection between the medial septum and the hippocampus in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163992>

Kitamura, T., Ogawa, S. K., Roy, D. S., Okuyama, T., Morrissey, M. D., Smith, L. M., Redondo, R. L., & Tonegawa, S. (2017). Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. *Science*, 356(6333), 73-78. <https://doi.org/10.1126/science.aam6808>

Kos, K., & Wilding, J. P. (2010). SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat Rev Endocrinol*, 6(4), 225-235. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.18>

Kuhn, P. H., Koroniak, K., Hogg, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., Haass, C., Roßner, S., Bräse, S., & Lichtenthaler, S. F. (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO J*, 31(14), 3157-3168. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.173>

Li, J., Yang, D., Yu, K., He, J., & Zhang, Y. (2010a). Determination of diosgenin content in medicinal plants with enzyme-linked immunosorbent assay. *Planta Med*, 76(16), 1915-1920. <https://doi.org/10.1055/s-0030->

- Li, L., Fang, F., Feng, X., Zhuang, P., Huang, H., Liu, P., Liu, L., Xu, A. Z., Qi, L. S., Cong, L., & Hu, Y. (2022). Single-cell transcriptome analysis of regenerating RGCs reveals potent glaucoma neural repair genes. *Neuron*, *110*(16), 2646-2663. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.022>
- Li, S., Overman, J. J., Katsman, D., Kozlov, S. V., Donnelly, C. J., Twiss, J. L., Giger, R. J., Coppola, G., Geschwind, D. H., & Carmichael, S. T. (2010b). An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci*, *13*(12), 1496-1504. <https://doi.org/10.1038/nn.2674>
- Lim, J. H., Stafford, B. K., Nguyen, P. L., Lien, B. V., Wang, C., Zukor, K., He, Z., & Huberman, A. D. (2016). Neural activity promotes long-distance, target-specific regeneration of adult retinal axons. *Nat Neurosci*, *19*(8), 1073-1084. <https://doi.org/10.1038/nn.4340>
- Lindhout, F. W., Cao, Y., Kevenaar, J. T., Bodzeta, A., Stucchi, R., Boumpoutsari, M. M., Katrukha, E. A., Altelaar, M., MacGillavry, H. D., & Hoogenraad, C. C. (2019). VAP-SCRN1 interaction regulates dynamic endoplasmic reticulum remodeling and presynaptic function. *EMBO J*, *38*(20), e101345. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018101345>
- Liu, T., Daniels, C. K., & Cao, S. (2012). Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, *136*(3), 354-374. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.014>
- Liu, X., Ying, G., Wang, W., Dong, J., Wang, Y., Ni, Z., & Zhou, C. (2005). Entorhinal deafferentation induces upregulation of SPARC in the mouse hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*, *141*(1), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.08.003>
- López-Murcia, F. J., Terni, B., & Llobet, A. (2015). SPARC triggers a cell-autonomous program of synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(43), 13366-13371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512202112>
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, *523*(7560), 337-341. <https://doi.org/10.1038/nature14432>
- Mahanthappa, N. K., Cooper, D. N., Barondes, S. H., & Schwarting, G. A. (1994). Rat olfactory neurons can utilize the endogenous lectin, L-14, in a novel adhesion mechanism. *Development*, *120*(6), 1373-1384. <https://doi.org/10.1242/dev.120.6.1373>

- Mahler, S. V., & Aston-Jones, G. (2018). CNO evil? Considerations for the use of DREADDs in behavioral neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, *43*(5), 934-936. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.299>
- Mátyás, F., Freund, T. F., & Gulyás, A. I. (2004). Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of mouse strains used in transgenic technology. *Hippocampus*, *14*(4), 460-481. <https://doi.org/10.1002/hipo.10191>
- Mayer, U., Aumailley, M., Mann, K., Timpl, R., & Engel, J. (1991). Calcium-dependent binding of basement membrane protein BM-40 (osteonectin, SPARC) to basement membrane collagen type IV. *Eur J Biochem*, *198*(1), 141-150. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15996.x>
- McGraw, J., McPhail, L. T., Oschipok, L. W., Horie, H., Poirier, F., Steeves, J. D., Ramer, M. S., & Tetzlaff, W. (2004). Galectin-1 in regenerating motoneurons. *Eur J Neurosci*, *20*(11), 2872-2880. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03802.x>
- Meimaridou, E., Gooljar, S. B., & Chapple, J. P. (2009). From hatching to dispatching: the multiple cellular roles of the Hsp70 molecular chaperone machinery. *J Mol Endocrinol*, *42*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1677/jme-08-0116>
- Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F. G., Anjo, S. I., Manadas, B., Behie, L. A., & Salgado, A. J. (2018). Secretome of undifferentiated neural progenitor cells induces histological and motor improvements in a rat model of Parkinson's disease. *Stem Cells Transl Med*, *7*(11), 829-838. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0009>
- Modrego, P. J., Fayed, N., Errea, J. M., Rios, C., Pina, M. A., & Sarasa, M. (2010). Memantine versus donepezil in mild to moderate Alzheimer's disease: a randomized trial with magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Neurol*, *17*(3), 405-412. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02816.x>
- Murphy-Ullrich, J. E., Lane, T. F., Pallero, M. A., & Sage, E. H. (1995). SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca²⁺-binding EF-hand. *J Cell Biochem*, *57*(2), 341-350. <https://doi.org/10.1002/jcb.240570218>
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). 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. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1202-06.2006>
- Oh, S. W., Harris, J. A., Ng, L., Winslow, B., Cain, N., Mihalas, S., Wang, Q., Lau, C., Kuan, L., Henry, A. M.,

- Mortrud, M. T., Ouellette, B., Nguyen, T. N., Sorensen, S. A., Slaughterbeck, C. R., Wakeman, W., Li, Y., Feng, D., Ho, A., Nicholas, E., Hirokawa, K. E., Bohn, P., Joines, K. M., Peng, H., Hawrylycz, M. J., Phillips, J. W., Hohmann, J. G., Wahnoutka, P., Gerfen, C. R., Koch, C., Bernard, A., Dang, C., Jones, A. R., & Zeng, H. (2014). A mesoscale connectome of the mouse brain. *Nature*, *508*(7495), 207-214. <https://doi.org/10.1038/nature13186>
- Okawara, M., Tokudome, Y., Todo, H., Sugibayashi, K., & Hashimoto, F. (2013). Enhancement of diosgenin distribution in the skin by cyclodextrin complexation following oral administration. *Biol Pharm Bull*, *36*(1), 36-40. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00467>
- Perez, N., Sugar, J., Charya, S., Johnson, G., Merrill, C., Bierer, L., Perl, D., Haroutunian, V., & Wallace, W. (1991). Increased synthesis and accumulation of heat shock 70 proteins in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, *11*(3-4), 249-254. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(91\)90033-t](https://doi.org/10.1016/0169-328x(91)90033-t)
- Piedrahita, D., Castro-Alvarez, J. F., Boudreau, R. L., Villegas-Lanau, A., Kosik, K. S., Gallego-Gomez, J. C., & Cardona-Gómez, G. P. (2015). β -Secretase 1's targeting reduces hyperphosphorylated tau, implying autophagy actors in 3xTg-AD mice. *Front Cell Neurosci*, *9*, 498. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00498>
- Pires, G., McElligott, S., Drusinsky, S., Halliday, G., Potier, M. C., Wisniewski, T., & Drummond, E. (2019). Secernin-1 is a novel phosphorylated tau binding protein that accumulates in Alzheimer's disease and not in other tauopathies. *Acta Neuropathol Commun*, *7*(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0848-6>
- Porsgaard, T., & Høy, C. E. (2000). Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *J Nutr*, *130*(6), 1619-1624. <https://doi.org/10.1093/jn/130.6.1619>
- Puche, A. C., Poirier, F., Hair, M., Bartlett, P. F., & Key, B. (1996). Role of galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Dev Biol*, *179*(1), 274-287. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0257>
- Quintá, H. R., Pasquini, J. M., Rabinovich, G. A., & Pasquini, L. A. (2014). Glycan-dependent binding of galectin-1 to neuropilin-1 promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *Cell Death Differ*, *21*(6), 941-955. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.14>
- Quintá, H. R., Wilson, C., Blidner, A. G., González-Billault, C., Pasquini, L. A., Rabinovich, G. A., & Pasquini, J. M. (2016). Ligand-mediated Galectin-1 endocytosis prevents intraneural H₂O₂ production promoting F-actin dynamics reactivation and axonal re-growth. *Exp Neurol*, *283*(Pt A), 165-178. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.009>
- Randolph, C., Tierney, M. C., Mohr, E., & Chase, T. N. (1998). The repeatable battery for the assessment of

neuropsychological status (RBANS): preliminary clinical validity. *J Clin Exp Neuropsychol*, 20(3), 310-319. <https://doi.org/10.1076/jcen.20.3.310.823>

Ren, Y., Zhao, J., & Feng, J. (2003). Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci*, 23(8), 3316-3324. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-08-03316.2003>

Roy, D. S., Arons, A., Mitchell, T. I., Pignatelli, M., Ryan, T. J., & Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature*, 531(7595), 508-512. <https://doi.org/10.1038/nature17172>

Sadleir, K. R., Kandalepas, P. C., Buggia-Prévoit, V., Nicholson, D. A., Thinakaran, G., & Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 132(2), 235-256. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1558-9>

Sage, H., Vernon, R. B., Decker, J., Funk, S., & Iruela-Arispe, M. L. (1989b). Distribution of the calcium-binding protein SPARC in tissues of embryonic and adult mice. *J Histochem Cytochem*, 37(6), 819-829. <https://doi.org/10.1177/37.6.2723400>

Sage, H., Vernon, R. B., Funk, S. E., Everitt, E. A., & Angello, J. (1989a). SPARC, a secreted protein associated with cellular proliferation, inhibits cell spreading in vitro and exhibits Ca⁺²-dependent binding to the extracellular matrix. *J Cell Biol*, 109(1), 341-356. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.1.341>

Sakaguchi, M., Arruda-Carvalho, M., Kang, N. H., Imaizumi, Y., Poirier, F., Okano, H., & Frankland, P. W. (2011). Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. *Mol Brain*, 4, 33. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-33>

Santpere, G., Nieto, M., Puig, B., & Ferrer, I. (2006). Abnormal Sp1 transcription factor expression in Alzheimer disease and tauopathies. *Neurosci Lett*, 397(1-2), 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.062>

Schlecht, R., Scholz, S. R., Dahmen, H., Wegener, A., Sirrenberg, C., Musil, D., Bomke, J., Eggenweiler, H. M., Mayer, M. P., & Bukau, B. (2013). Functional analysis of Hsp70 inhibitors. *PLoS One*, 8(11), e78443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078443>

Semwal, P., Painuli, S., Abu-Izneid, T., Rauf, A., Sharma, A., Daştan, S. D., Kumar, M., Alshehri, M. M., Taheri, Y., Das, R., Mitra, S., Emran, T. B., Sharifi-Rad, J., Calina, D., & Cho, W. C. (2022). Diosgenin: an updated pharmacological review and therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022,

1035441. <https://doi.org/10.1155/2022/1035441>

Serger, E., Luengo-Gutierrez, L., Chadwick, J. S., Kong, G., Zhou, L., Crawford, G., Danzi, M. C., Myridakis, A., Brandis, A., Bello, A. T., Müller, F., Sanchez-Vassopoulos, A., De Virgiliis, F., Liddell, P., Dumas, M. E., Strid, J., Mani, S., Dodd, D., & Di Giovanni, S. (2022). The gut metabolite indole-3 propionate promotes nerve regeneration and repair. *Nature*, *607*(7919), 585-592. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04884-x>

Sevigny, J., Chiao, P., Bussière, T., Weinreb, P. H., Williams, L., Maier, M., Dunstan, R., Salloway, S., Chen, T., Ling, Y., O'Gorman, J., Qian, F., Arastu, M., Li, M., Chollate, S., Brennan, M. S., Quintero-Monzon, O., Scannevin, R. H., Arnold, H. M., Engber, T., Rhodes, K., Ferrero, J., Hang, Y., Mikulskis, A., Grimm, J., Hock, C., Nitsch, R. M., & Sandrock, A. (2016). The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, *537*(7618), 50-56. <https://doi.org/10.1038/nature19323>

Stricher, F., Macri, C., Ruff, M., & Muller, S. (2013). HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting. *Autophagy*, *9*(12), 1937-1954. <https://doi.org/10.4161/auto.26448>

Takaku, S., Yanagisawa, H., Watabe, K., Horie, H., Kadoya, T., Sakumi, K., Nakabeppu, Y., Poirier, F., & Sango, K. (2013). GDNF promotes neurite outgrowth and upregulates galectin-1 through the RET/PI3K signaling in cultured adult rat dorsal root ganglion neurons. *Neurochem Int*, *62*(3), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.01.008>

Tang, M. J., & Tai, I. T. (2007). A novel interaction between procaspase 8 and SPARC enhances apoptosis and potentiates chemotherapy sensitivity in colorectal cancers. *J Biol Chem*, *282*(47), 34457-34467. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704459200>

Tang, Y. N., Pang, Y. X., He, X. C., Zhang, Y. Z., Zhang, J. Y., Zhao, Z. Z., Yi, T., & Chen, H. B. (2015). UPLC-QTOF-MS identification of metabolites in rat biosamples after oral administration of Dioscorea saponins: a comparative study. *J Ethnopharmacol*, *165*, 127-140. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.017>

Tenne-Brown, J., Puche, A. C., & Key, B. (1998). Expression of galectin-1 in the mouse olfactory system. *Int J Dev Biol*, *42*(6), 791-799.

Tohda, C., Lee, Y. A., Goto, Y., & Nemere, I. (2013). Diosgenin-induced cognitive enhancement in normal mice is mediated by 1,25D₃-MARRS. *Sci Rep*, *3*, 3395. <https://doi.org/10.1038/srep03395>

Tohda, C., Urano, T., Umezaki, M., Nemere, I., & Kuboyama, T. (2012). Diosgenin is an exogenous activator of 1,25D₃-MARRS/Pdia3/ERp57 and improves Alzheimer's disease pathologies in 5XFAD mice. *Sci Rep*, *2*, 535. <https://doi.org/10.1038/srep00535>

- Tohda, C., Yang, X., Matsui, M., Inada, Y., Kadomoto, E., Nakada, S., Watari, H., & Shibahara, N. (2017). Diosgenin-rich yam extract enhances cognitive function: a placebo-controlled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults. *Nutrients*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/nu9101160>
- Tohda, C., Yang, X., & Nomoto, K. (2020). Transported amount of diosgenin to the brain is differed by a solvent fat. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, *27*(2), 102-105.
- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., 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, L. D., & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in early Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, *388*(1), 9-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>
- Vendl, O., Wawrosch, C., Noe, C., Molina, C., Kahl, G., & Kopp, B. (2006). Diosgenin contents and DNA fingerprint screening of various yam (*Dioscorea* sp.) genotypes. *Z Naturforsch C J Biosci*, *61*(11-12), 847-855. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-11-1213>
- Vincent, A. J., Lau, P. W., & Roskams, A. J. (2008). SPARC is expressed by macroglia and microglia in the developing and mature nervous system. *Dev Dyn*, *237*(5), 1449-1462. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21495>
- Wan, J., Wu, W., Huang, Y., Ge, W., & Liu, S. (2016). Incomplete radiofrequency ablation accelerates proliferation and angiogenesis of residual lung carcinomas via HSP70/HIF-1 α . *Oncol Rep*, *36*(2), 659-668. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4858>
- Wang, C., Furlong, T. M., Stratton, P. G., Lee, C. C. Y., Xu, L., Merlin, S., Nolan, C., Arabzadeh, E., Marek, R., & Sah, P. (2021). Hippocampus-prefrontal coupling regulates recognition memory for novelty discrimination. *J Neurosci*, *41*(46), 9617-9632. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1202-21.2021>
- Wang, Q., Song, F., Zhang, C., Zhao, X., Zhu, Z., Yu, S., & Xie, K. (2011). Carboxyl-terminus of Hsc70 interacting protein mediates 2,5-hexanedione-induced neurofilament medium chain degradation. *Biochem Pharmacol*, *81*(6), 793-799. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.12.021>
- Way, G., Morrice, N., Smythe, C., & O'Sullivan, A. J. (2002). Purification and identification of secernin, a novel cytosolic protein that regulates exocytosis in mast cells. *Mol Biol Cell*, *13*(9), 3344-3354. <https://doi.org/10.1091/mbc.e01-10-0094>
- Wen, W., Liu, W., Shao, Y., & Chen, L. (2014). VER-155008, a small molecule inhibitor of HSP70 with potent anti-cancer activity on lung cancer cell lines. *Exp Biol Med (Maywood)*, *239*(5), 638-645. <https://doi.org/10.1177/1535370214527899>

Wu, G., Lu, Z. H., André, S., Gabius, H. J., & Ledeen, R. W. (2016). Functional interplay between ganglioside GM1 and cross-linking galectin-1 induces axon-like neurogenesis via integrin-based signaling and TRPC5-dependent Ca²⁺ influx. *J Neurochem*, *136*(3), 550-563. <https://doi.org/10.1111/jnc.13418>

Xu, J., Patassini, S., Rustogi, N., Riba-Garcia, I., Hale, B. D., Phillips, A. M., Waldvogel, H., Haines, R., Bradbury, P., Stevens, A., Faull, R. L. M., Dowsey, A. W., Cooper, G. J. S., & Unwin, R. D. (2019). Regional protein expression in human Alzheimer's brain correlates with disease severity. *Commun Biol*, *2*, 43. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0254-9>

Yang, M. H., Yoon, K. D., Chin, Y. W., Park, J. H., Kim, S. H., Kim, Y. C., & Kim, J. (2009). Neuroprotective effects of *Dioscorea opposita* on scopolamine-induced memory impairment in in vivo behavioral tests and in vitro assays. *J Ethnopharmacol*, *121*(1), 130-134. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.010>

Yang, W., Tanaka, Y., Bundo, M., & Hirokawa, N. (2014). Antioxidant signaling involving the microtubule motor KIF12 is an intracellular target of nutrition excess in beta cells. *Dev Cell*, *31*(2), 202-214. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.08.028>

Yang, X., Nomoto, K., & Tohda, C. (2021). Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of yam extracts. *J Nat Med*, *75*(1), 207-216. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01451-4>

Yang, X., & Tohda, C. (2018a). Diosgenin restores A β -induced axonal degeneration by reducing the expression of heat shock cognate 70 (HSC70). *Sci Rep*, *8*(1), 11707. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30102-8>

Yang, X., & Tohda, C. (2018b). 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. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00048>

Yang, X., & Tohda, C. (2023a). Diosgenin restores memory function via SPARC-driven axonal growth from the hippocampus to the PFC in Alzheimer's disease model mice. *Mol Psychiatry*, in press.

Yang, X., & Tohda, C. (2023b). Axonal regeneration mediated by a novel axonal guidance pair, Galectin-1 and Secernin-1. *Mol Neurobiol*, *60*, 1250-1266. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-03125-6>

Yang, Z., Kuboyama, T., & Tohda, C. (2017). A systematic strategy for discovering a therapeutic drug for Alzheimer's disease and its target molecule. *Front Pharmacol*, *8*, 340. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00340>

Yi, T., Fan, L. L., Chen, H. L., Zhu, G. Y., Suen, H. M., Tang, Y. N., Zhu, L., Chu, C., Zhao, Z. Z., & Chen, H.

B. (2014). Comparative analysis of diosgenin in Dioscorea species and related medicinal plants by UPLC-DAD-MS. *BMC Biochem*, 15, 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-15-19>

Zhang, F., Su, B., Wang, C., Siedlak, S. L., Mondragon-Rodriguez, S., Lee, H. G., Wang, X., Perry, G., & Zhu, X. (2015). Posttranslational modifications of α -tubulin in alzheimer disease. *Transl Neurodegener*, 4, 9. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0030-4>

Zhao, H. F., Wang, J., & Tony To, S. S. (2015). The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (Review). *Int J Oncol*, 47(2), 429-436. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3052>

Zhu, H., & Roth, B. L. (2014). DREADD: a chemogenetic GPCR signaling platform. *Int J Neuropsychopharmacol*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu007>

謝辞

大変興味深い研究テーマを与えて頂き、科学的意義及び社会的意義と独創性の高い研究を遂行し、社会実装につなげる信念、大きなゴールを見据え根気強くチャレンジし続ける姿勢、物事を俯瞰的に捉える力などを幅広く親身かつ丁寧に御指導賜り、また、研究者として、人として、持つべき志を自ら示して下さい、自身の夢への挑戦に対して多大なる御支援、御尽力を賜りました富山大学和漢医薬学総合研究所 神経機能学領域 教授 東田千尋先生に心より深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、幅広い専門知識や実験手技、解析方法などを親身に御指導賜り、様々な視点から物事を論理的かつ客観的に思考することの重要性を示して下さいました第一薬科大学薬学部 漢方薬学科 生薬学分野 准教授 久保山友晴先生（元 神経機能学領域 助教）に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、臨床学的な観点や統計解析などについて多くの有益な御助言を賜り、また日々の研究生活において共に切磋琢磨しながら、様々な面から支えて下さ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 助教 稲田祐奈先生に深く感謝申し上げます。

本研究において、DREADD システムの実験を行うにあたり、脳へのカニューレ埋込法を御教示賜りました富山大学医学部 生化学講座 助教 野本真順 先生、教授 井ノ口馨先生に深く感謝申し上げます。

本研究において、山薬エキスの臨床研究にご尽力賜りました金沢大学 臨床神経心理学（臨床認知科学・心理学）研究室 教授 松井三枝先生、稲田祐奈先生、門本笑花氏、中田翔太郎氏、富山大学医学部 和漢診療学講座 教授 柴原直利先生、助教 渡り英俊先生に深く感謝申し上げます。

本研究において、実験手技や解析方法を御指導賜り、自ら真摯かつ誠実に研究に取り組む姿で私たち後輩を鼓舞して下さいました広東海洋大学 海洋薬物研究所 准教授 楊志友先生に深く感謝いたします。

本研究において、実験手技を御指導賜り、多くの貴重なアドバイスや御意見を下さっただけでなく、精神的に大きな支えとなり、励まし応援し続けて下さ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 卒業生 田辺紀生博士に深く感謝いたします。

本研究において、多くの有益な御助言、御意見を下さっただけでなく、日々の研究生活において支えになって下さ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 卒業生 渡り英俊博士、執行美智子博士、金原嘉之博士、谷江良崇博士、小林諒氏、加々美（工藤）凧紗氏、小暮智里氏、小谷篤氏、小湊誠也氏、伊藤（山内）唯氏、井関隆介氏、細川治起氏、菊池高広氏、中野葵氏、高橋（南雲）美咲氏、竹田（真継）理子氏、元研究支援員 野本かおり氏、元研究員 アンドレイア トレド氏、元研究生 Mai Farid 氏、ならびに在籍生 井城（長瀬）綸沙氏、近藤麻布氏、須山真聡氏、渋谷省吾氏、永田朋也氏、金田みづほ氏、羽柴圭悟氏、石井雄翔氏、末上亜理沙氏、東山綾花氏、そして同分野・領域に在籍されていた全ての研究員、技術補佐員、及び卒業生の皆様に深く感謝いたします。

最後に、温かく支え、無条件に応援して下さいました両親に、心より感謝申し上げます。