

氏名 やん しもん
楊 熙蒙

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博乙第 101 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 15 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 4 項該当

学位論文題目
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)

論文審査委員

(主査) 教授 久米 利明
(副査) 教授 恒枝 宏史
(副査) 教授 東田 千尋 (紹介教員)

**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**

氏名：楊 熙蒙

背景

アルツハイマー病 (AD) では、脳で A β が沈着し神経回路網が破綻することで、記憶障害を始めとした認知機能障害が引き起こされる。しかし、承認薬のコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 受容体拮抗薬は、認知機能障害の進行を遅らせる対症療法にとどまっている。また、原因物質の除去を狙った抗 A β 薬が新薬候補として開発されてきたが、たとえ脳内の A β は大きく減少しても認知機能の改善はそれに相関しないことが数々の臨床試験で示されている。この理由は、AD 発症よりも 20-30 年も前の無症状期から A β が蓄積し、それに伴って神経回路が変性するため、発症後から原因物質を除去するだけでは既に破綻した神経回路の修復は困難だからである。

そこで当研究室では、“破綻した神経回路を再形成する”ことが、AD の根本的治療に必須であると考え研究を進めてきた。神経回路の形成には、神経細胞の軸索が投射先の神経細胞の樹状突起にシナプス結合する必要があるが、特に軸索は遠く離れた部位に向かって長く伸長しなければならない。しかし成体の脳においては、一度変性した軸索は再伸長できないと長年考えられてきたため、治療戦略としてほとんど着目されてこなかった。近年、成体脳の軸索が少なくとも近位に自発的に再伸長することが報告されたものの、遠く離れた投射先に向かって軸索が正しく再伸長するかどうかは不明である。

当研究室ではこれまでに、培養神経細胞において A β で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として、山薬中成分 diosgenin を発見した。しかし、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のシグナル分子を探索した。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、軸索がつながる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 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。

第 1 章：Diosgenin の軸索再伸長及び記憶改善に関わるシグナル分子の探索^{1,2)}

当研究室の先行研究により、diosgenin による軸索再伸長及び記憶改善に関わる、diosgenin の受容体タンパク質として 1,25D₃-MARRS を同定した。本章では、diosgenin による 1,25D₃-MARRS の刺激後に神経細胞内で引き起こされる分子シグナル変化を検討し、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。

アルツハイマー病モデルの 5XFAD マウスに溶媒または diosgenin (0.1 μ mol/kg/day) を、野生型マウスには溶媒を 15 日間経口投与した。その後、大脳皮質からタンパク質を抽出し、二次元電気泳動で 3 群間でのタンパク質の発現量を比較し、発現変化の大きなスポットを MALDI-TOF/MS 解析した。Diosgenin を投与した 5XFAD マウスの大脳皮質中では、Heat shock cognate 70 (HSC70) が減少することがわかった¹⁾。siRNA (300 nM) を用いて培養神経細胞中の HSC70 をノックダウンすると、軸索伸長が促進された¹⁾。

神経細胞中で HSC70 と結合するタンパク質を共免疫沈降法で探索したところ、軸索の骨格タンパク質である α -tubulin が同定された¹⁾。A β を処置した軸索上では α -tubulin が減少し、A β 処置後から diosgenin を処置すると軸索上の α -tubulin 量が増加した結果¹⁾と、HSC70 は結合したタンパク質の分解

を促進することが一般的に知られていることを考え合わせると、diosgenin は HSC70 を減少させることで、HSC70 による α -tubulin の分解を間接的に抑制し、軸索を伸長させるのではないかと考える。

また、A β を処置した培養神経細胞に HSC70 の機能阻害剤 VER-155008 (0.05, 0.5, 5 μ M) を処置すると、軸索が再伸長した²⁾。また、VER-155008 (10 μ mol/kg/day) の 18 日間腹腔内投与により、5XFAD マウスでの物体認知記憶、空間記憶、及びエピソード記憶の障害が回復し、脳内の軸索終末の変性や A β プラーク、リン酸化タウの蓄積も減少した²⁾。

以上より、diosgenin による神経細胞中での HSC70 の発現減少が、軸索再伸長にとって重要な分子シグナルであることが示された。また、HSC70 の阻害が、5XFAD マウスの記憶改善及び脳内の AD 病理の改善に寄与することが初めて明らかとなった。

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^{3,4)}

成熟した成体脳では、軸索の再生は困難であると一般的に考えられてきた。しかし私は、diosgenin 投与によって脳内の軸索がつながるべき正しい脳部位へと長距離にわたって再伸長し、それが神経回路の再形成と記憶改善に寄与しているものと予想した。第 1 章では α -tubulin の関与に言及したが、それだけでは軸索の正しい再投射の機構までは説明できない。そこで本章では、軸索を可視化する手法により、diosgenin が 5XFAD マウスの脳内において、萎縮した軸索を正しい脳部位へと再伸長させるかどうかを評価し、その現象を担う機能分子の動態を解明することを目的とした。

記憶形成に関わる海馬から前頭前野に投射する神経回路に着目した。野生型マウス及び 5XFAD マウスの前頭前野に赤色蛍光の逆行性トレーサー Dextran Texas Red (3000 MW; 25 μ g) を注入後、溶媒または diosgenin を 14 日間経口投与し、同一部位に緑色蛍光の逆行性トレーサー Dextran FITC (3000 MW; 25 μ g) を注入し、さらに 7 日置いた後、脳を摘出した。Diosgenin 投与により、海馬 CA1 及び CA3 において、Dextran Texas Red 陰性かつ Dextran FITC 陽性の神経細胞数が顕著に増加し、5XFAD マウスの海馬から前頭前野に向かう軸索が再伸長することが示された³⁾。

続いて、軸索が再伸長しなかった神経細胞と diosgenin 投与により軸索が正しく再伸長した神経細胞 1 個 1 個をレーザーマイクロダイセクション法にて、海馬切片より単離した。各神経細胞プールより RNA を抽出し、マイクロアレイで遺伝子の発現量変化を網羅的に解析した。その結果、軸索が再伸長した神経細胞中で発現量が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) を同定した³⁾。

神経細胞特異的に SPARC を過剰発現させる AAV9 ベクター (1×10^{10} GC/ μ l) を 5XFAD マウスの海馬両側に注入した。SPARC の過剰発現が確認された注入 21 日目以降において、物体認知記憶及び空間認知記憶障害が改善し、海馬から前頭前野に投射する軸索の再伸長も促進された³⁾。また、DREADD システムを用いて、SPARC の過剰発現により 5XFAD マウスの海馬から前頭前野に軸索を再投射した神経細胞特異的に、その興奮性活動を抑制すると、SPARC 過剰発現によっていったん示された記憶改善作用が消失した³⁾。さらに、軸索再伸長中の軸索では、特に軸索膜上で SPARC が増加すること、軸索に沿うように細胞外 I 型 collagen が並ぶこと、軸索が萎縮しても I 型 collagen は残ること、SPARC は細胞外 I 型 collagen をたどるように相互作用することで、元々伸びていた方向に再び軸索を伸長させることを明らかにした³⁾。

Galectin-1 についても SPARC と同様に、AAV9 ベクターを用いて 5XFAD マウスの海馬神経細胞に過剰発現すると、マウスの物体認知記憶及び空間認知記憶障害が回復し、海馬から前頭前野に向かう軸索の再伸長が促進された⁴⁾。海馬神経細胞において、Galectin-1 は軸索の成長円錐膜上で高発現していたことから、Galectin-1 はその軸索がつながるべき脳部位より分泌される何らかの軸索誘導因子を感知する受容体様に働く可能性を考えた。そこで、海馬神経細胞の軸索投射先である前頭前野神経細胞からは分泌され、投射先ではない小脳神経細胞からは分泌されないタンパク質を銀染色で網羅的に探索したところ、Secernin-1 が同定された⁴⁾。Galectin-1 を過剰発現した海馬神経細胞の成長円錐膜側のみ遊離型 Secernin-1 を処置すると、軸索長が増加した。また、遊離型 Secernin-1 と成長円錐膜上の Galectin-1 の共局在を蛍光免疫染色で、直接結合を共免疫沈降法で確認した⁴⁾。

以上より、diosgeninが5XFADマウス脳内の萎縮した軸索を、遠く離れた投射先へと再伸長させることを見出した。また、SPARCと1型collagen、Galectin-1とSecernin-1がそれぞれ相互作用することが、本現象の基盤となっていることを初めて明らかにした。さらに、海馬から前頭前野に軸索が再伸長することが、記憶障害回復の直接的要因であることが機能学的に証明された。

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^{5,6,7)}

Diosgeninの基礎研究を社会実装するにあたり、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。本章ではまず正常マウスに対する山薬エキスの記憶亢進作用を検討し、diosgeninが脳に作用できる山薬エキスの条件を検討した。続いて、山薬エキスを用いて、健常人の認知機能に対する効果を臨床研究で評価した。

山薬エキスは、*Dioscorea batatas*を熱水抽出した「常法山薬エキス」と、*D. batatas*の含水エタノールエキスを酸加水分解しdiosgenin含量を16%に高めた「diosgenin高濃度山薬エキス」を用いた。正常ddYマウスに溶媒（オリーブオイル）または各山薬エキス（100 mg/kg）を7日間経口投与すると、diosgenin高濃度山薬エキス投与群では物体認知記憶が亢進したが、常法山薬エキス投与群では無効であった⁵⁾。エキス中のdiosgenin含量をLC-MS/MSで測定すると、常法山薬エキス中にはdiosgeninが検出されなかった。また、diosgenin高濃度山薬エキス投与後ではdiosgeninが血漿、脳どちらにも移行したが、常法山薬エキス投与ではdiosgeninはいずれにも移行しなかった⁵⁾。よって、diosgeninを脳に作用させるには、熱水抽出エキスではなく、diosgenin含量を高めたエキスを用いることが必須であることと、山薬エキス中のdiosgenin以外の成分は記憶亢進には関与しないことが示された。また、diosgenin高濃度山薬エキスの溶媒をオリーブオイルではなく、水に溶解して正常ddYマウスに7日間経口投与しても、記憶亢進作用が見られず、diosgeninの脳移行性も低かった^{6,7)}。

これらの知見に基づき、diosgenin高濃度山薬エキスをオリーブオイルに溶解した独自開発製剤（特許権利化）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した。20-81歳の被験者28名をランダムに2群に分け、プラセボまたはdiosgenin高濃度山薬エキスを12週間服用する二重盲検クロスオーバー試験を行った。その結果、プラセボ群と比較してdiosgenin高濃度山薬エキス群では、認知機能が亢進した⁷⁾。

結論

本研究により、ADモデルマウス脳内において、萎縮した軸索がつながるべき投射先に向かって再伸長する現象と、それを引き起こす薬物diosgeninの有用性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証明した。一方、山薬エキスとしてdiosgeninを脳に作用させるための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。以上より、diosgeninやdiosgenin含有山薬エキスは、ADに対する新しい根本的治療薬になりうるものと期待される。

参考文献

- 1) **Yang X**, Tohda C. *Scientific Reports* (2018) 8, 11707.
- 2) **Yang X**, Tohda C. *Frontiers in Pharmacology* (2018) 9, 48.
- 3) **Yang X**, Tohda C. *Molecular Psychiatry* (2023) in press.
- 4) **Yang X**, Tohda C. *Molecular Neurobiology* (2023) 60, 1250-1266.
- 5) **Yang X**, Nomoto K, Tohda C. *Journal of Natural Medicines* (2021) 75, 207-216.
- 6) Tohda C, **Yang X**, Nomoto K. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety* (2020) 27, 102-105.
- 7) Tohda C, **Yang X**, Matsui M, Inada Y, Kadomoto E, Nakada S, Watari H, Shibahara N. *Nutrients* (2017) 9, 1160.

学位論文審査の要旨

<p>報告番号</p>	<p>富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号</p>	<p>氏 名</p>	<p>楊 熙蒙</p>
<p>審査委員</p>	<p>職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授</p>	<p>氏 名 久米 利明 恒枝 宏史 東田 千尋</p>	
<p>(論文題目) (英語の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること。英語(訳)は, 最初の文字のみを大文字で表記し, 他は小文字で表記すること(ただし, 学名等を除く。) 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)</p>		<p>(判定) 合格</p>	
<p>(論文審査の要旨) (2頁以内) アルツハイマー病 (AD) では、脳でアミロイドβタンパク質 (Aβ) が沈着し神経回路網が破綻することで、記憶障害など認知機能障害が惹起される。申請者は本研究において“破綻した神経回路を再形成する”ことが、ADの根本的治療に必須であると考え研究を進めた。これまでにAβで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として、山薬中成分diosgeninを発見したが、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、diosgeninの軸索再伸長及び記憶改善に関わる機能分子を探索し、次いで5XFADマウス脳内における長距離かつ方向特異的な軸索再伸長作用を評価し、軸索がつながる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、さらにdiosgenin高濃度山薬エキスの健常人の認知機能に対する効果を評価した。</p> <p>第1章 : Diosgeninの軸索再伸長及び記憶改善に関わるシグナル分子の探索 申請者は本章において、diosgeninの受容体タンパク質である1,25D₃-MARRSの刺激後の分子シグナル変化を検討し、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。5XFADマウスにdiosgeninを経口投与したところ、diosgeninを投与群の大脳皮質では、Heat shock cognate 70 (HSC70)の発現が減少した。HSC70をノックダウンすると、軸索伸長が促進された。HSC70と結合するタンパク質を探索したところ、α-tubulinが同定された。また、Aβ処置細胞にHSC70の機能阻害剤VER-155008を処置すると、軸索が再伸長した。また、VER-155008の腹腔内投与により、5XFADマウスでの認知記憶障害が回復し、脳内の軸索終末の変性やAβプラーク、リン酸化タウの蓄積も減少した。以上より、diosgeninによる神経細胞中でのHSC70の発現減少が、軸索再伸長にとって重要な分子シグナルであることが示された。また、HSC70の阻害が、5XFADマウスの記憶改善及び脳内のAD病理の改善に寄与することが明らかとなった。</p> <p>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 申請者は本章において、軸索を可視化することで、diosgeninが5XFADマウスの脳内において、萎縮した軸索を正しい脳部位へと再伸長させるかを評価し、その現象を担う機能分子の動態を解明することを目的とし、記憶形成に関わる海馬から前頭前野に投射する神経回路に着目した。5XFADマウスの前頭前野に赤色蛍光の逆行性トレーサーDextran Texas Redを注入後、diosgeninを経口投与し、同一部位に逆行性トレーサーDextran FITCを注入し、さらに7日後、脳を摘出した。Diosgenin投与により、海馬CA1及びCA3において、Dextran Texas Red陰性かつDextran FITC陽性の</p>			

神経細胞数が顕著に増加し、5XFADマウスの海馬から前頭前野に向かう軸索が再伸長することが示された。続いて、軸索が再伸長した、あるいはしなかった神経細胞をレーザーマイクロダイセクション法にて、海馬切片より単離し、遺伝子の発現量変化を解析し、軸索が再伸長した神経細胞中で発現増加した、SPARC (Secreted protein acidic rich in cysteine) 及びGalectin-1 (lectin, galactose binding soluble 1) を同定した。SPARCならびにGalectin-1を過剰発現させるAAV9ベクターを5XFADマウスの海馬両側に注入した。これらの過剰発現により認知記憶障害が改善した。

以上より、申請者はdiosgeninが5XFADマウス脳内の萎縮した軸索を、遠く離れた投射先へと再伸長させることを見出した。また、SPARCと1型collagen、Galectin-1とSecernin-1がそれぞれ相互作用することが、本現象の基盤となっていることを明らかにした。さらに、海馬から前頭前野に軸索が再伸長することが、記憶障害回復の直接的要因であることが機能学的に証明された。

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

申請者は本章において、まず山薬エキスの記憶亢進作用を検討し、diosgeninが脳に作用できる山薬エキスの条件を検討した。山薬エキスは、diosgeninを脳に作用させるには、熱水抽出ではなく油溶媒に溶解すること、diosgenin含量を高めたエキスを用いることが必須であることと、山薬エキス中のdiosgenin以外の成分は記憶亢進には関与しないことが示された。これらの知見に基づき、diosgenin高濃度山薬エキスをオリーブオイルに溶解した独自開発製剤 (特許権利化) 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した。被験者28名をランダムに2群に分け、プラセボまたはdiosgenin高濃度山薬エキスを12週間服用する二重盲検クロスオーバー試験を行い、diosgenin高濃度山薬エキス群では、認知機能が亢進することを明らかにした。

申請者は本研究により、ADモデルマウス脳内において、萎縮した軸索がつながるべき投射先に向かって再伸長する現象と、それを引き起こす薬物diosgeninの有用性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。ついで、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証明した。さらに、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。以上より、diosgeninやdiosgenin含有山薬エキスは、ADに対する新しい根本的治療薬になりうるものと期待される。

主査及び副査は、申請者 楊 熙蒙氏に面接試験を行うとともに論文内容を綿密に審査し、本論文が博士 (薬科学) を授けるに十分に値すると判断した。

(学位論文のもとになる論文 著者名,論文題目,掲載誌名,巻,最初の頁と最後の頁,年を記載)

1. [Yang X](#), Tohda C. Diosgenin restores A β -induced axonal degeneration by reducing the expression of heat shock cognate 70 (HSC70). *Sci Rep* 8 :11707, 2018
2. [Yang X](#), Tohda C. Heat Shock Cognate 70 Inhibitor, VER-155008, reduces memory deficits and axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol* 9:48, 2018
3. [Yang X](#), Tohda C. Diosgenin restores memory function via SPARC-driven axonal growth from the hippocampus to the PFC in Alzheimer's disease model mice. *Molecular Psychiatry*, in press
4. [Yang X](#), Tohda C. Axonal regeneration mediated by a novel axonal guidance pair, Galectin-1 and Secernin-1. *Mol Neurobiol* 60:1250-1266, 2023
5. [Yang X](#), Nomoto K, Tohda C. Diosgenin content is a novel criterion to assess memory enhancement effect of yam extracts. *J Nat Med* 75: 207-216, 2021
6. Tohda C, [Yang X](#), Nomoto K. Transported amount of diosgenin to the brain is differed by a solvent fat. *Journal of Food Chemistry and Safety* 27: 102-105, 2020
7. Tohda C, [Yang X](#), Matsui M, Inada Y, Kadomoto E, Nakada S, Watari H, Shibahara N. Diosgenin-rich Yam extract enhances cognitive function: A placebo-controlled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults. *Nutrients* 9:1160, 2017