

認知機能低下予防におけるトウゲシバと  
その含有成分の機能性に関する研究

大庭 卓也



## 目次

序論	1 頁
第 1 章 アセチルコリン受容体アンタゴニスト (スコポラミン) 誘発認知機能 障害モデルに対するトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の作用	9 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 2 章 酸化ストレスに対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びその含有成分 の作用	28 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
第 3 章 NMDA 受容体アンタゴニスト (MK-801) 誘発認知機能障害に対する トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の作用	50 頁
第 1 節 緒言	
第 2 節 実験材料及び方法	
第 3 節 実験成績	
第 4 節 考察	
総括及び結論	67 頁
謝辞	70 頁
引用文献	71 頁
略語一覧表	85 頁



## 序論

認知症とは、世界保健機関 (WHO) による国際疾病分類第 10 版 (ICD-10) において、「通常、慢性あるいは進行性の脳疾患によって生じ、記憶、思考、見当識、理解、計算、学習、言語、判断など多数の高次脳機能障害からなる症候群」と定義されている(1)。WHO の発表によると、2018 年時点で世界の認知症患者数は約 5,000 万人に上り、毎年約 1,000 万人が認知症を発症するとされている (2)。わが国では、2012 年時点で 65 歳以上の認知症患者数が 462 万人 (高

齢者人口の約 15%) であることが厚生労働省から発表された (3)。さらに、その患者数は 2025 年に 730 万人 (高齢者人口の約 20%) にまで増加すると推計されている(Fig.1)。ま

た、2016 年の国民生活基礎調査によると、65

歳以上の要介護者における介護が必要になった主な原因について、認知症が最も割合が高く、18.7% (男性 15.2%、女性 20.5%) となっている (4)。今後更なる高齢化社会の進展が予想されるわが国において、認知症患者数の増加とともに、医療費、介護費のような社会的負担の増加が予想される。したがって、認知症の患者数増加を抑制することは、認知症の社会的負担の削減にもつながると考えられる。

認知症はその原因により、いくつかの種類に分類される。現在広く知られて

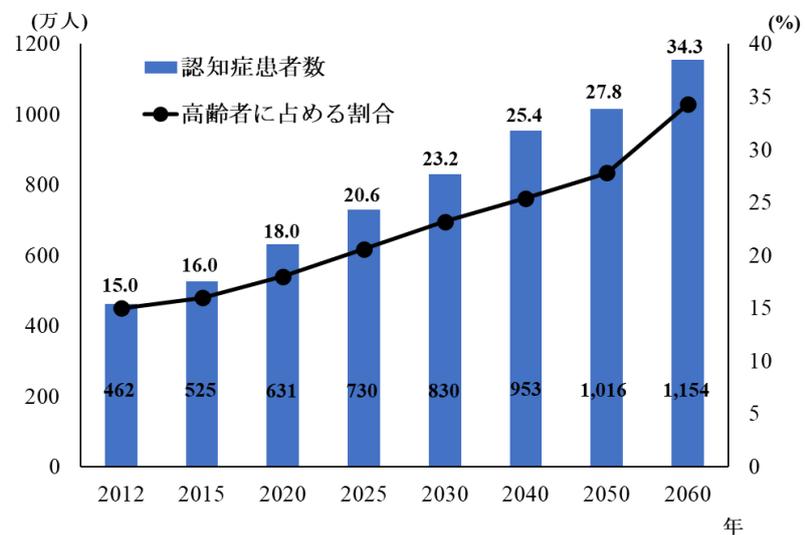


Fig. 1 Changes in patients and prevalence of dementia  
社会保障審議会介護保険部会 (第 78 回) 参考資料を基に作成

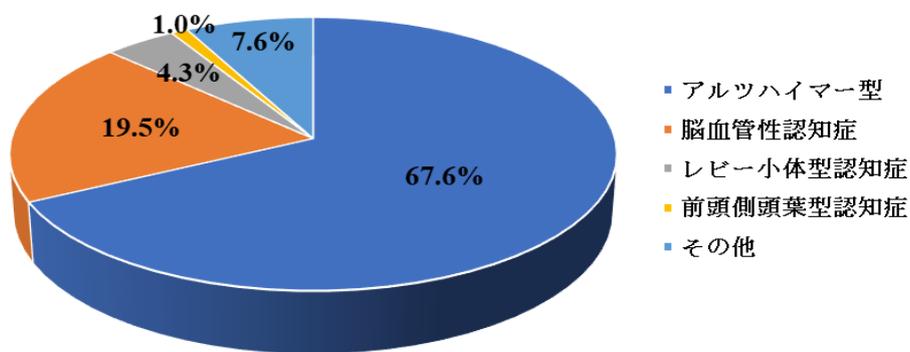
いる認知症は、アルツハイマー型認知症 [アルツハイマー病 (alzheimer's disease: AD)]、レビー小体型認知症 (lewy body dementia: LBD)、前頭側頭型認知

**Table. 1 Features of dementia**

種類	特徴
アルツハイマー型認知症 (AD)	初期段階では短期記憶が障害され、徐々に進行する 後期では実行機能が障害される
レビー小体型認知症 (LBD)	変動性の認知機能障害 自発的パーキンソン
前頭側頭型認知症 (FTD)	ADよりも若い (40-75歳) 段階で発症 性格の変化と行動障害
血管性認知症 (VaD)	脳への血流遮断、減少により引き起こされる。 血管の障害部位、度合いにより症状が大きく異なる

Duong, Silvia et al., *Canadian Pharmacists Journal.*, 2017 より作成

症 (frontotemporal dementia: FTD)、血管性認知症 (vascular dementia: VaD) の 4 種類である (5,6)。それぞれの認知症の症状、特徴を Table1 に示す。これらの



**Fig. 2 Types of dementia**

社会保障審議会介護保険部会 (第 78 回) 参考資料を基に作成

認知症のなかでも、AD は認知症の主要な原因であり、約 70%を占める (Fig. 2)。AD では海馬・大脳皮質の神経細胞脱落に伴う脳の萎縮がみられる。さらに、アミロイド前駆タンパク質 (amyloid precursor protein: APP) が切断されることにより生成するアミロイド  $\beta$  (amyloid beta: A $\beta$ ) を主要構成成分とする老人斑

の形成、リン酸化されたタウタンパクが神経細胞内に蓄積する神経原線維変化を特徴とする。ADの原因は完全には解明されていないが、これまでに下記のような仮説が提唱されてきた。

## 1. コリン仮説

AD患者の大脳皮質でアセチルコリン (acetylcholine: ACh) 合成酵素であるアセチルコリントランスフェラーゼ (choline acetyltransferase: ChAT) や ACh 分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase: AChE) 活性が低下していることが発見され、AD患者の大脳皮質 ChAT 活性と認知機能スコアが相関することが報告されている (7,8)。また、前脳基底部には大脳新皮質や海馬に投射する ACh 作動性神経経路が存在するが、ADの前脳基底部で ACh 作動性神経の顕著な減少が認められることが報告されている (9)。さらに、ACh が結合するニコチン性 ACh 受容体 (nAChR) 数の減少も報告されている (10)。AChE 阻害薬は ACh の分解を抑制し、シナプス間隙の ACh を上昇させ ACh 神経系の伝達を促進する (11)。一方、アトロピンやスコポラミンによる脳内 ACh 神経系伝達を遮断することにより、学習や記憶行動が抑制されたことから、ADの主要な病態の1つとして ACh 神経系の障害があるとするコリン仮説が提唱された (12,13)。現在 AD の治療薬として用いられているドネペジル、ガランタミン及びリバスチグミンはいずれもコリン仮説に基づく、AChE 阻害薬である。

## 2. グルタミン酸神経毒仮説

グルタミン酸は脳内の主な興奮性神経伝達物質であり、その受容体の1つに N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体がある。NMDA 受容体は、大脳皮質や海

馬に高密度に存在し、記憶に関係する長期増強や神経可塑性において中心的な役割を担っている (14,15)。一方、過剰なグルタミン酸は興奮毒性による神経細胞死を引き起こす。AD では、 $A\beta$  が NMDA 受容体のグルタミン酸結合部位に結合し、NMDA 受容体を介した  $Ca^{2+}$  流入が一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 産生による細胞毒性を誘発している可能性が指摘されている (16)。NMDA 受容体に対する低親和性の非競合性電位依存性アンタゴニストであるメマンチンは、現在 AD 治療薬として使用されている。メマンチンは、生理的な神経興奮により生じる一過性の高濃度のグルタミン酸に対しては NMDA 受容体から遊離し、正常な神経伝達や長期増強 (long-term potentiation: LTP) に影響を与えないが、持続的なグルタミン酸刺激に対しては、その神経興奮毒性に保護的に作用するのではないかと考えられている (17)。

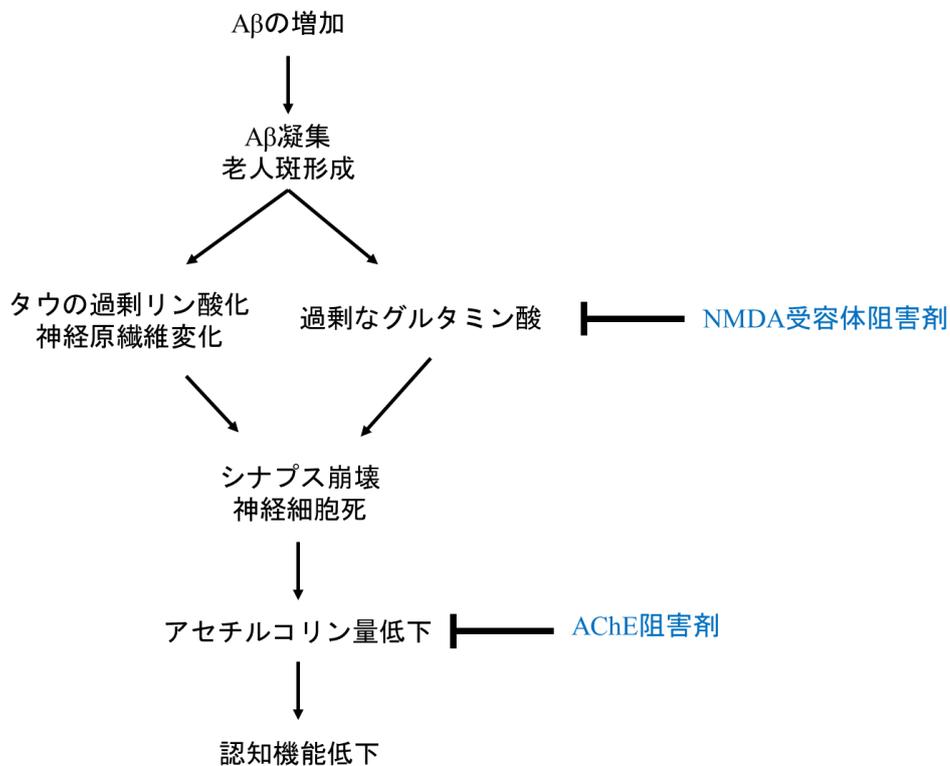


Fig. 3 Amyloid hypothesis and mechanism of therapeutic drug.

### 3. アミロイド仮説

老人斑は神経原線維変化よりも AD に対する疾患特異性が高いこと、 $A\beta$  沈着はタウ蓄積に先行する AD の最初期病変であること、APP の点突然変異により家族性 AD が発症すること、さらに、家族性 AD の原因遺伝子である APP 及び APP の切断を担う  $\gamma$ -セクレターゼの構成要素であるプレセニリンの変異では、共通して  $A\beta_{42}$  の産生あるいは産生比率 ( $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ) が増加することなどが知られている (18–20)。このことから、特に  $A\beta_{42}$  の増加が AD 発症の最上流かつ最重要病変として位置づける仮説である (Fig. 3)。一方で  $A\beta$  沈着は正常加齢によっても認められること、認知機能障害は脳の  $A\beta$  沈着量ではなく神経原線維変化と相関することなどが指摘されていた。また、AD における神経細胞障害は、沈着した  $A\beta$  線維ではなく、可溶性の  $A\beta$  オリゴマー ( $A\beta$  単量体が 2 分子から数十分子結合した重合体) によって惹起される可能性が指摘されていた。2008 年に報告された  $A\beta_{42}$  に対するワクチンの効果について検討されたところ、 $A\beta_{42}$  ワクチンは脳の  $A\beta$  と老人斑の沈着を減少させたが、認知機能は改善されなかった (21)。このことから、2010 年頃には従来の  $A\beta$  沈着仮説を修正した  $A\beta$  オリゴマー仮説が支持されるようになった。 $A\beta$  オリゴマー仮説では、 $A\beta$  の凝集、沈着が先行し、それに続いてタウによる神経細胞障害が出現し、結果的に脳構造の異常・記憶障害・臨床的な機能異常が順次出現するという病態カスケードが提唱されている (Fig. 4) (22)。この仮説に則って、様々な  $A\beta$  抗体の臨床試験が行われた。ほとんどの抗体新薬の開発は中止したが、アデュカヌマブが米国、欧州、日本において、AD による軽度認知機能障害 (mild cognitive impairment: MCI) 及び軽度 AD を対象とする承認申請が行われている。アデュカヌマブ (aducanumab, Biogen, USA) は  $A\beta$  オリゴマー仮説に基づく初めての AD 治療薬として注目を集めている。

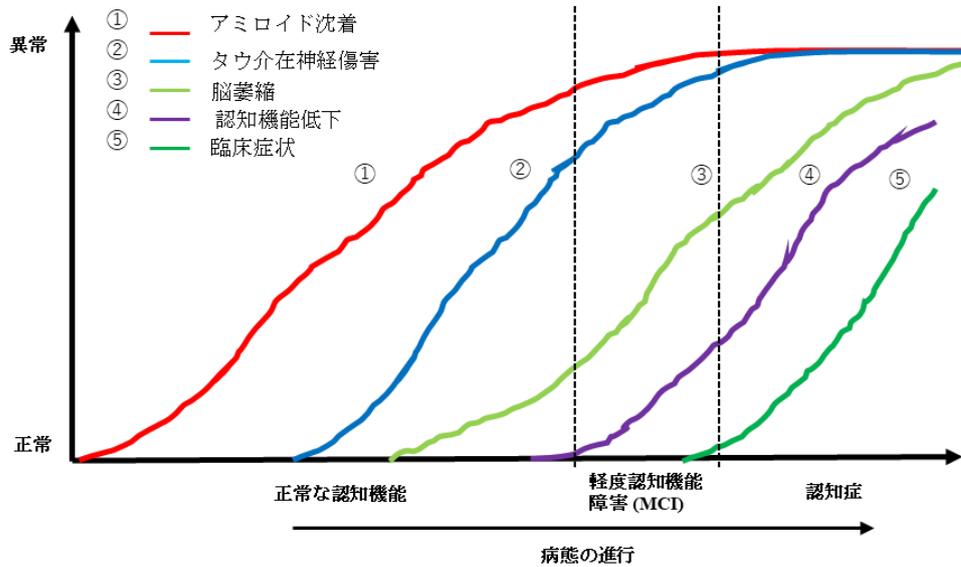


Fig. 4 Time dependent model of pathological conditions in AD.

文献 22 (Jack CR Jr et al. 2010. *Lancet Neurol*)より改変引用

上記のように AD では発症よりも早期の段階から  $A\beta$  の沈着が始まっていると考えられる。したがって、AD の初期段階での脳の状態を把握し、神経細胞へのダメージが少ない初期の段階から予防・治療等の介入を行うことが重要である。近年、核磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging: MRI) や単一光子放射断層撮影 (single photon emission computed tomography: SPECT)、ポジトロン断層撮影 (positron emission tomography: PET) などの画像診断技術を応用して  $A\beta$  の状態を確認することにより AD の病変が把握できるようになった (23-25)。認知機能が正常でありながらアミロイド PET 陽性の状態をプレクリニカル AD (preclinical AD) とし、以下の 3 つのステージに分類される。ステージ 1: 無症状でありながら脳内  $A\beta$  の蓄積がみられる状態、ステージ 2: 神経変性が始まっている状態、ステージ 3: ステージ 2 に MCI がみられる状態である (26)。MCI は年間 10~30%が認知症に進行する一方で、認知機能が正常なレベルに回復する人もいるという報告があることから、MCI の時点で認知機能を維持することが、その後の認知症発症抑制、予防につながると考えられる。しか

しながら、MCIの段階で使用できる薬剤は現在存在しないため、食品やサプリメントなどによる認知症予防が重要と考えられる。

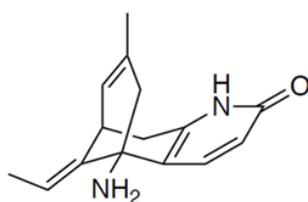
食品による認知症予防として、近年、機能性表示食品制度が注目されている。2020年12月現在、「認知機能」をキーワードとして142件の機能性表示食品

が販売されている。その関与成分の多くが「DHA、EPA」「イチョウ葉フラボノイド配糖体、イチョウ葉テルペンラクトン」であった。これらの成分以外の新たな機能性成分による機能性食品の開発は、認知症予防法の拡充につながると考えられる。認知機能に対する機能性の研究を進める上で、トウゲシバ (*Huperzia serrata*) という植物に着目した (Fig. 5)。トウゲシバはヒゲノカズラ科に属するシダ植物で、中国の伝統



Fig. 5 *Huperzia serrata*

的な生薬として打撲傷、統合失調症、筋挫傷、腫れの治療に用いられてきた (27)。トウゲシバは中国、インドをはじめ、東南アジア、日本国内にも自生が確認されている。森林の日陰など湿った場所に生育し、茎の周囲に葉を円柱状に密集させる形状をとる。平成29年における岐阜県の森林率は81%であり、高知県 (84%) に次ぐ国内第2位であることから、トウゲシバも豊富に自生していると推察される。トウゲシバから単離されたアルカロイドである huperzine A (Fig.6) は、血液脳関門を通過し、脳内で可逆的選択的に AChE を阻害して、アセチルコリンの分解を抑制する (27, 28)。また、huperzine A はげっ歯類やサル memory 障害モデルにおいて AChE 阻害を通して記憶障害を改善することが報告されている (29,30)。また、トウゲシバには lycodine 型、lycopodine 型、



Huperzine A

**Fig. 6 Structures of huperzine A**

fawcettimine 型などに分類される特徴的なアルカロイド、トリテルペノイド、フェノール類、フラボノイドが含まれている (31)。Huperzine A 単独の作用に関する報告は数多く存在するが、トウゲシバの機能性に関する報告は存在せず、さらに、トウゲシバ中の huperzine A 以外に認知症予防に関与する成分の有無についても不明である。

本論文では、トウゲシバ抽出物及びその機能性成分である huperzine A の認知機能障害に対する作用を検討することを目的とした。第 1 章では、トウゲシバエタノール抽出物由来アルカロイド画分 (AEF) 及び huperzine A がコリン作動性神経の調節による認知機能障害に対する作用を検討した。第 2 章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び酸化ストレスに対する作用の検討を行い、トウゲシバ水抽出物 (WHS) の作用に huperzine A 以外の機能性成分の関与を検討した。第 3 章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の NMDA 受容体を介した認知機能に対する作用を検討した。

## 第1章 アセチルコリン受容体アンタゴニスト (スコポラミン) 誘発認知機能障害モデルに対するトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の作用

### 第1節 緒言

序論で述べたように、AD は記憶と認知機能の進行的な障害に特徴づけられる認知症の主要な原因である。なかでも、コリン仮説は AD の原因として最も古くに提唱された仮説であり、神経伝達物質の研究が進展するなかで、AD 患者において ChAT や AChE の活性が低下していることが発見された (7, 8)。さらに、ChAT の活性レベルは、AD の神経病理学的病変の重症度と相関することが報告されている (32)。ChAT や AChE は神経伝達物質である ACh を調節する酵素であり、ACh は新たな記憶を形成するために重要な役割を果たす (33)。ACh によって刺激を受ける基底核内のコリン作動性神経は、大脳皮質や海馬に神経を投射し、記憶と注意機能に関与する (34)。A $\beta$  は、急性の毒性として ACh 放出の低下、細胞の興奮性の増加などの神経伝達の調節に対する作用を有している。さらに、A $\beta$  の長期的な曝露はタウのリン酸化、コリン作動性神経細胞への毒性を発揮し、ChAT 活性及び ACh の低下を誘導する (35)。そのため、AD の治療ターゲットとしてドネペジルやガランタミンなどの AChE 阻害薬が開発・上市されてきた。AChE は ACh をコリンと酢酸に分解する酵素であり、AChE 阻害薬は脳内の ACh 分解を抑制し、その濃度を上昇させることで、コリン作動性神経の機能を調節する。

スコポラミンはトロパンアルカロイドであり、非選択的なムスカリン性アセチルコリン受容体遮断薬である。スコポラミン投与により誘発される認知機能障害は、AD 及び加齢に伴う認知機能の低下がコリン作動性シグナル伝達の低下によるものであるとするコリン仮説が提唱された後、注目を集め、AD 及び加齢に伴う認知機能障害を模倣するモデルとして広く使用されている (36)。さ

らに、植物抽出物や機能性成分の多くで、スコポラミン誘発認知機能障害モデルに対する認知機能改善作用が報告されている (37–40)。

また、AD 治療薬として我が国でも使用されているガラントミンは、もともとヒガンバナ科のスノードロップ (*Galanthus nivalis*) から発見された天然物由来の化合物である (41)。また、リバスチグミンはマメ科のカラバルマメ (*Physostigma venenosum*) から発見されたフィゾスチグミンの類縁体であり、天然物由来の生理活性物質が有効成分あるいはリード化合物となっている (42)。上記の様に、植物由来の天然化合物には AChE を阻害する化合物が存在し、特にアルカロイド類は強力な AChE 阻害作用を有することから AD 治療候補物質につながる可能性が示唆されている (43)。

トウゲシバから単離された化合物である huperzine A は、AChE の活性部位の開口部に直接結合することで AChE 阻害作用を示す (27)。Huperzine A は、スコポラミン誘発認知機能障害のみならず、認知機能障害を有する老齢サルスの認知機能、ラットの低酸素性虚血性脳障害による認知機能障害、肥満誘発性の認知機能障害を改善したことから、種々の認知機能障害に有用であることが示唆されている(30,41–43)。また、トウゲシバ以外の同属植物である *H. quadrifariata* 及び *H. reflexa* は AChE 活性阻害作用を有していることが報告されており、*H. squarrosa* はスコポラミン誘発認知機能障害モデルにおいて認知機能改善作用が報告されている(47,48)。しかしながら、トウゲシバ自体の AChE 阻害活性や認知機能に対する作用は明らかにされていない。

本章では、トウゲシバエタノール抽出物由来アルカロイド画分 (AEF) の huperzine A 含有率及び AChE 阻害作用を検討した。また、スコポラミン誘発認知機能障害モデルマウスに対するトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の認知機能改善作用についても評価した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

ドネペジル塩酸塩は和光純薬工業 (Osaka, Japan)、huperzine A は LKT Laboratories Inc (Sant Paul, MN, USA)、スコポラミンは Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。TritonX-100 は Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、生理食塩液は Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)、1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water:  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate:  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、塩化ナトリウム (sodium chloride:  $\text{NaCl}$ ) は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、ペントバルビタール (Pentobarbital)、dimethyl sulfoxide (DMSO) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) よりそれぞれ購入した。また、トウゲシバ及び比検試料は、岐阜薬科大学生薬学研究室 (大山雅義教授) より供与して頂いた。

### 2-2 実験方法

#### 2-2-1 実験動物

ICR マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウス (雄性, 6 週齢) は設定温度: 23°C (許容範囲: 20-26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40-70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00-午後 8:00) に維持された岐阜薬科大学の動物飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形試料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) にて飼育した。行動試験はすべて午前 9:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は

岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

#### 2-2-2 トウゲシバエタノール抽出物及びアルカロイド画分 (AEF) の調製

試料の調製には、岐阜県山県市で採取したトウゲシバを使用した。トウゲシバの全草を乾燥後、室温下エタノールで15時間抽出した。濃縮して得られたエキスをエタノール抽出物 (EXT) とした。EXT を塩酸酸性にした精製水に懸濁後酢酸エチルで分液した。水層を除去した後、酢酸エチル層について塩酸酸性精製水による分液を再度行った。2回の分液操作で得られて水層に炭酸ナトリウムを加えて塩基性 (pH 9.0) にした後、クロロホルムで分液し、得られたクロロホルム層を濃縮することでアルカロイド画分 (AEF) を調製した。2-2-4以降の抽出物を用いた実験には AEF を使用した。

#### 2-2-3 トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 中の Huperzine A 定量分析

定量の分析には、Shimadzu (Kyoto, Japan) 6A ポンプ、Shimadzu CTO-10Avp カラムオーブン、Shimadzu SPD-10A 紫外可視分光光度検出器及び SPD-M10Avp UV-VIS ダイオードアレイ検出器で構成された高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatography: HPLC) 装置を使用した。Huperzine A 標準液を 1.0 mg/mL の濃度となるように調製し、1.0 ~ 8.0 µg/mL の範囲における点検量線 ( $y = 16421x + 1553.2$ ,  $R^2 = 0.9964$ )。EXT と AEF は 10 mg/mL の濃度となるようにメタノールに溶解し、試料溶液を調製した。分析条件は以下の通りである。カラム Capcell Pak C18 (MGII, 5 µm, 4.6 mm i.d. × 250 mm, Shiseido, Japan) 流速 1.0 mL/分、カラム温度 40°C、注入量 10 µL、検出器 UV 308 nm、溶媒メタノール/0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸含有精製水 (20:80, アイソクラティック)。

## 2-2-4 トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) のアセチルコリンエステラーゼ

### (AChE) 阻害に対する作用の検討

実験には、6週齢雄性 ICR マウスを使用した。ペントバルビタール麻酔下でマウスを断首し、全脳を摘出した。摘出した全脳は、マイクロチューブの中に入れ、重量を測定後、液体窒素を用いて急速冷凍した。全脳はホモジナイズに使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。全脳のホモジナイズは脳重量の4倍の0.05 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を添加した後、ホモジナイザー (Psychotron, Microtec Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて氷冷下で粉碎及び均一化した。その後、3,500 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で10分間遠心した。遠心分離後の上清を回収し、AChE 酵素溶液として使用した。AChE 酵素溶液は使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。AChE 活性測定は、Amplite™ Colorimetric Acetylcholinesterase Assay Kit (AAT Bioquest®, CA, USA) を使用して行った。被験薬であるトウゲシバアルカロイド画分 (AEF)、Huperzine A、ドネペジルは、1%DMSO 含有 phosphate buffered saline (PBS) に溶解させた。50倍に希釈した AChE 酵素溶液と被験薬を9:1の割合で混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で30分間インキュベートした。測定は製品の手順に従って行い、405nm、412nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて測定した。AChE 活性の50%阻害濃度は ( $\text{IC}_{50}$ ) は、以下の数式に従って算出した。

$$\text{IC}_{50} = 10^X \quad X = \log \frac{\frac{A}{B} \times (50-C)}{(D-C)} + \log B$$

A:50%を挟む高い濃度

B:50%を挟む低い濃度

C:Bの濃度における阻害率

D:Aの濃度における阻害率

## 2-2-5 トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) のブチリルコリンエステラーゼ

### (BuChE) 阻害作用の検討

実験には 6 週齢雄性 ICR マウスを使用した。マウスはペントバルビタール麻酔下 (80 mg/kg, i.p.) で開胸し、下大静脈より採血を行った。採血後のサンプルは、3,500 rpm、4°C の条件で、10 分間遠心した。遠心後の上清を回収し、ブチリルコリンエステラーゼ (butyrylcholinesterase: BuChE) 酵素溶液とした。

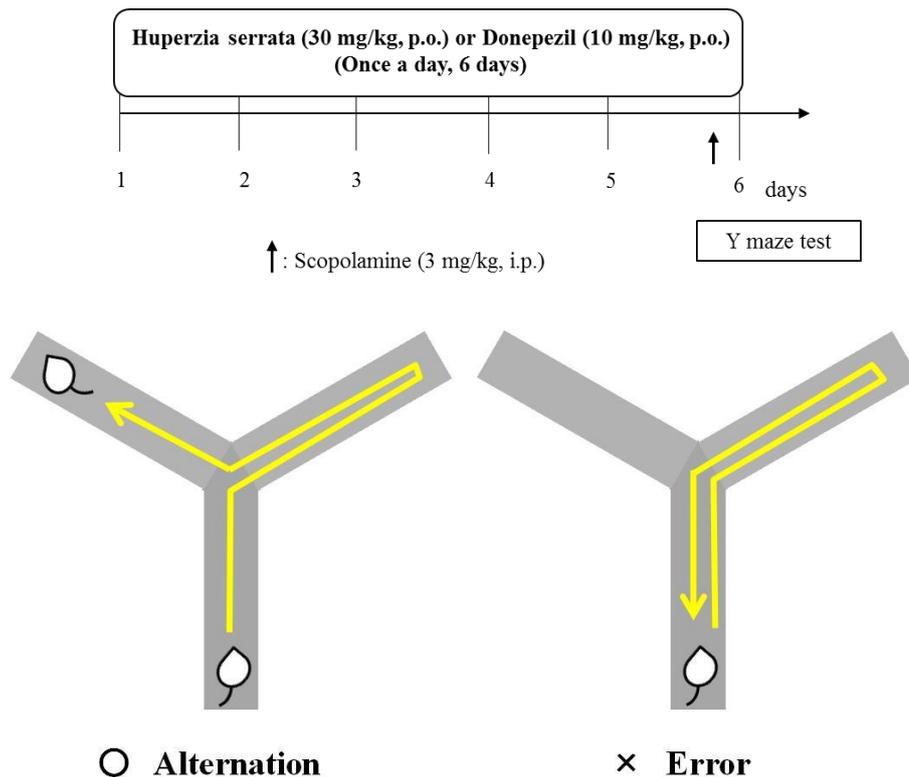
BuChE 酵素溶液は使用するまで -80°C で保存した。BuChE 活性測定は、コリンエステラーゼワコー (Wako, Osaka, Japan) を使用して行った。それぞれの被験薬は、1% DMSO 含有 PBS に溶解させた。5 倍に希釈した BuChE 酵素溶液と、被験薬を 9:1 の割合で混合し、37°C で 30 分間インキュベートした。被験薬、発色試液、基質液は、それぞれ 2.5、200、50  $\mu$ L 加えた。405 nm の吸光度を、マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。

## 2-2-6 Y 字型迷路試験

トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg/day) またはドネペジル (10 mg/kg/day) を 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC) に懸濁し、1 日 1 回、10 mL/kg で経口投与を行った。薬物投与 6 日目に短期記憶の評価として、Y 字型迷路試験を行った。3 つのアーム (長さ 40 cm、幅 10 cm、高さ 12 cm) からなる Y 字型迷路装置を用いて、実験を行った。試験開始の 1 時間前に、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) またはドネペジルを投与した。薬物投与 30 分後、スコポラミン (3 mg/kg) の腹腔内投与により認知機能障害を惹起した。対照群にはスコポラミンの代わりに生理食塩液 (10 mL/kg) を腹腔内投与した。試験において、マウスは 3 本のアームのうち、1 つのアームを選択して配置され、アーム

交替行動の数を観察した。マウスが異なる3つのアームに順番に侵入したとき、交替行動を行ったとみなした。マウスの行動を8分間ビデオカメラによって記録し、以下の数式に従ってアーム交替率を算出した。

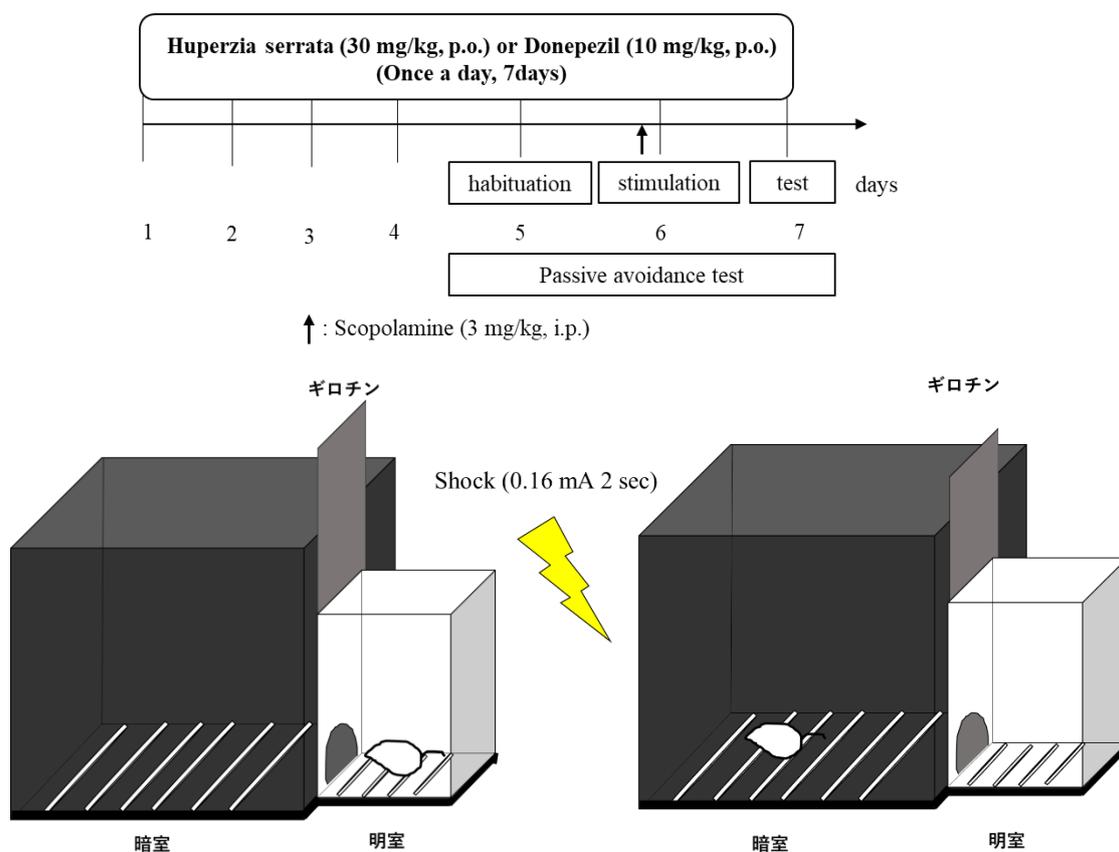
$$\text{Alteration (\%)} = (\text{アーム交替行動数} / \text{総侵入回数} - 2) \times 100$$



**Fig. 7 Behavioral test's outline and illustration of Y-maze.**

### 2-2-7 受動回避試験

トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg/day) またはドネペジル (10 mg/kg/day) を、0.5% CMC に懸濁し、1日1回、10 mL/kg で経口投与を行った。薬物投与5日目から7日目に、学習記憶の評価として、受動回避試験を行った。受動回避試験の装置は、明るいチャンバー (縦15.5 × 横9.6 × 高さ18 cm) と、暗いチャンバー (縦32 × 横32 × 高さ27 cm) からなる。2つのチャン



**Fig. 8 Behavioral test's outline and illustration of passive avoidance test**

バーの間は、スライド式のギロチンドアで仕切られている。5日目に、マウスの装置への馴化試験を行った。明るいチャンバーにマウスを置き、30秒経過後、ギロチンドアを開けた。マウスの後肢が暗いチャンバーに入った後、ギロチンドアを閉め、30秒間馴化させた後、マウスをチャンバーから取り出した。馴化の24時間後に、訓練試験を行った。この試験においては、マウスが暗いチャンバーに侵入した後、装置のグリッドから電気刺激 (0.16 mA, 2 秒間) を与え、恐怖記憶を形成させた。訓練試験の24時間後、保持試行を行った。この試行においては、ギロチンドアが開いてから、マウスが明るいチャンバーから暗いチャンバーに侵入するまでの時間を逃走潜時 (Latency) として計測した。最大の潜時を600秒まで計測した。受動回避試験において、試験開始1時間前にトウゲシバ抽出物またはドネペジルを投与した。薬物投与30分後、スコポ

ラミン (3 mg/kg) の腹腔内投与により認知機能障害を惹起した。

#### 2-2-8 オープンフィールド試験

試験はオープンフィールド装置 (縦 30 × 横 30 × 高さ 22 cm) を用いて行った。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg/day) またはドネペジル (10 mg/kg/day) 投与 8 日目にオープンフィールド試験を行った。マウスを 20 分間、装置の中で自由に行動させ、ビデオに記録した。映像は Etho Vision XT (Noldus, Wageningen, Netherland) を用いて解析を行い、総移動距離を測定した。試験開始 1 時間前に、トウゲシバ抽出物またはドネペジルを投与し、薬物投与 30 分後、スコポラミン (3 mg/kg) の腹腔内投与を行った。

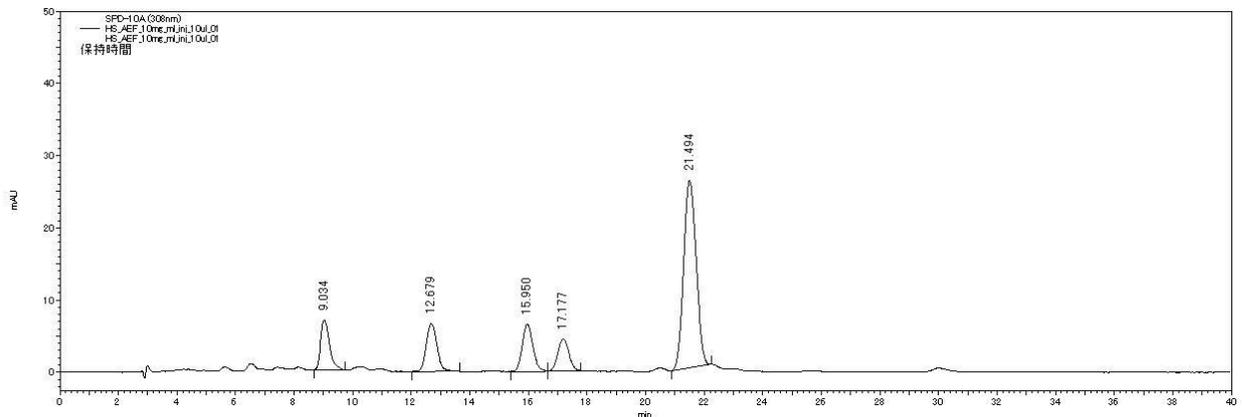
#### 2-2-9 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的な比較は、JSTAT (Vector) を用いて Student's *t*-test あるいは Dunett's test により行った。危険率が 5% 未満を有意差ありとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の huperzine A 含有率

AEF の HPLC チャートから 5 つのピーク (保持時間 9.034、12.679、15.950、17.717、21.494 min) が検出された (Fig. 9)。これらのピークの内、保持時間 21.494 min の最も高いピークが huperzine A であった。Huperzine A の検量線を作製し、AEF 中の huperzine A 含有率を算出したところ、 $0.500 \pm 0.003\%$ であった。



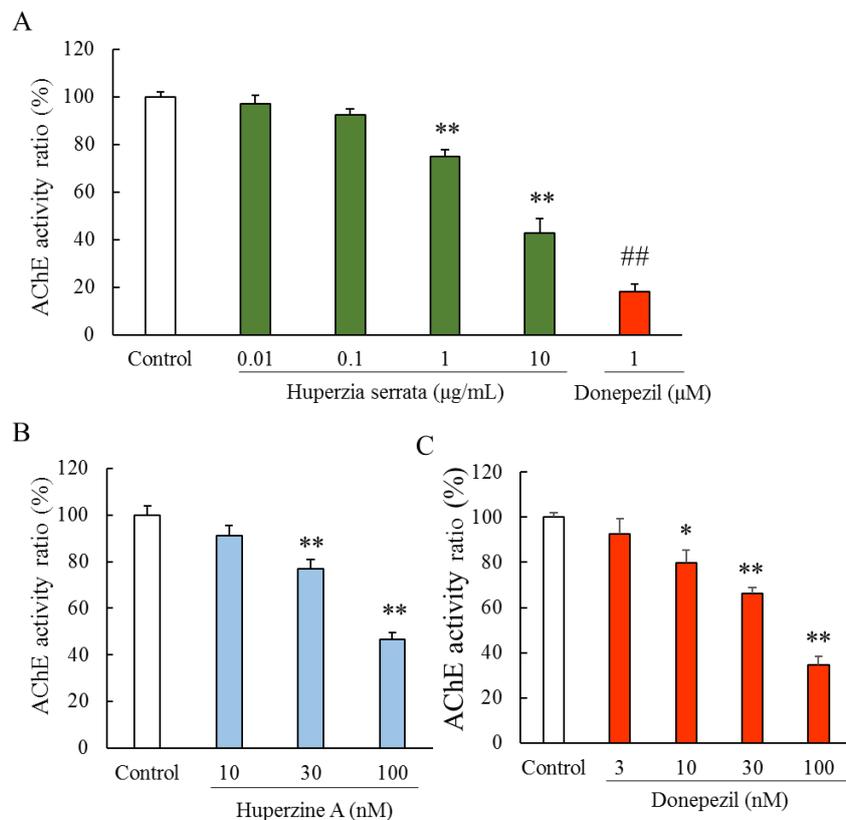
**Fig. 9 Quantitative Analysis of Huperzine A Content in *Huperzia serrata***

(A) A standard alkaloidal enriched fraction (AEF) sample chromatogram of *Huperzia serrata*. The huperzine A retention time was 21.494 min.

### 3-2 トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) のアセチルコリンエステラーゼ

#### (AChE) 阻害作用の評価

トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) は AChE 活性を濃度依存的に阻害し、その作用は 1 ~ 10  $\mu\text{g/mL}$  の用量において有意であった (Fig. 10A)。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の主成分である huperzine A、陽性対照薬であるドネペジルも AChE を阻害した。Huperzine A は 30、100 nM において、ドネペジルは 10、30、100 nM において有意に AChE を阻害した (Fig. 10B, 10C)。50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) はトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) が 5.96  $\mu\text{g/mL}$  (95% C.I. 4.05 ~ 7.88  $\mu\text{g/mL}$ )、huperzine A が 87.2 nM (95% C.I. 69.4 ~ 105.0 nM)、ドネペジルが 55.6 nM (95% C.I. 46.5 ~ 64.7 nM)であった。



**Fig. 10 AEF of *Huperzia serrata* and Huperzine A showed an inhibitory effect against acetylcholinesterase (AChE) activity.**

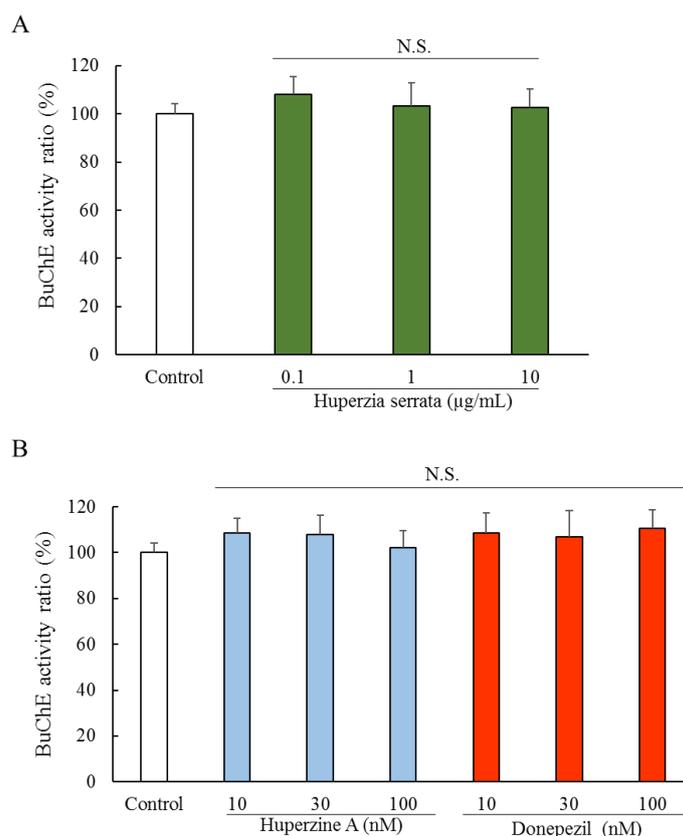
Each graphs show the activity of acetylcholinesterase (AChE) after treatment with (A) AEF of *Huperzia serrata*, (B) Huperzine A, and (C) Donepezil. The AChE inhibitory activity of control was considered as 100 %. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 3 to 5). Donepezil is positive control. ##;  $p < 0.01$  vs. control (Student's *t*-test). \*\*,  $p < 0.01$ , \*,  $p < 0.05$  vs. Control (Dunnett's test).

### 3-3 トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) のブチリルコリンエステラーゼ

#### (BuChE) 阻害作用の評価

トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の AChE 阻害作用の選択性を調べるために、BuChE に対する作用を検討した。この試験においては、AChE 阻害作用の検討に用いた濃度と同様の濃度で、試験を行った。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) は何れの濃度においても、BuChE 阻害作用を示さなかった (Fig.

11A)。同様に、huperzine A 及びドネペジルも BuChE を阻害しなかった (Fig. 11B)。これらの結果から、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF)、huperzine A 及びドネペジルは、AChE に対して高い選択性を有することが示唆された。

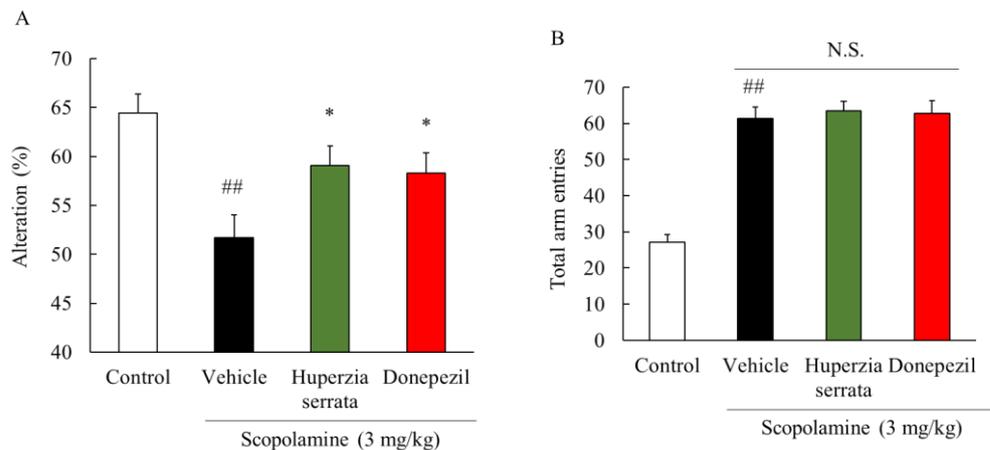


**Fig. 11 AEF of *Huperzia serrata* had no effect against butyrylcholinesterase (BuChE) activity.**

Each graphs show the activity of butyrylcholinesterase (BuChE) after treatment with (A) AEF of *Huperzia serrata*, and (B) Huperzine A and Donepezil. The BuChE inhibitory activity of control was considered as 100 %. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM (n = 4).

### 3-4 Y字型迷路試験におけるトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の効果

これまでの検討でトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) に AChE 阻害作用が認められたため、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) が認知機能障害に与える影響を検討した。薬物投与 6 日目にスコポラミン誘発記憶障害モデルを用いて、Y字型迷路試験を行った。Y字型迷路試験は、空間作業記憶 (短期記憶) を評価する試験系である。スコポラミンは対照群と比較して、有意にアーム交替率が減少した。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg, p.o.) 及びドネペジル (10 mg/kg, p.o.) は、スコポラミンによる記憶障害を有意に抑制した (Fig. 12A)。また、8 分間のアーム選択数はスコポラミンの投与により、有意に上昇したことから認知機能の低下が抑制されたと考えられる。一方、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及びドネペジルの投与はアーム選択数に影響を及ぼさなかったことから、自発活動量の変化に AChE 阻害作用は関与しないと考えられる (Fig. 12B)。

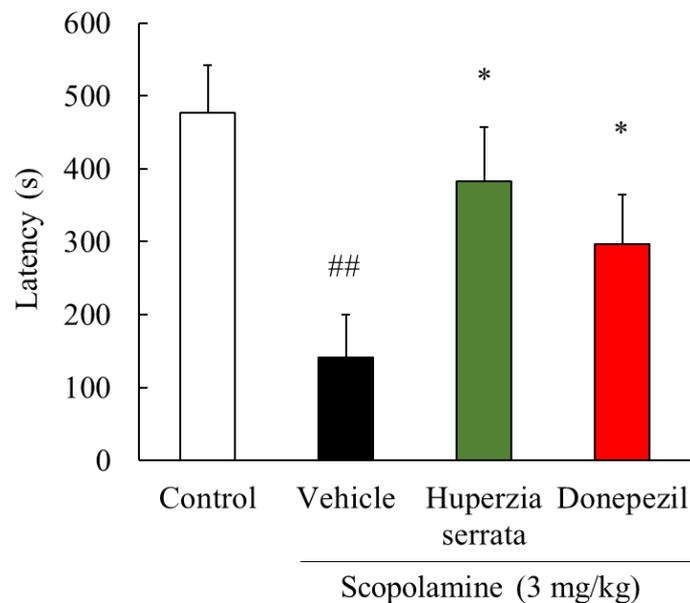


**Fig. 12 The effect of the AEF of *Huperzia Serrata* on the short-term memory in scopolamine-induced cognitive impairment mice using Y maze test.**

The effect of AEF of *Huperzia serrata* to the short-term memory against scopolamine-induced cognitive impairment mice. Donepezil is positive control. (A) Correct arm alteration, (B) Total arm entries in 8 minutes. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 9 to 10). ##; p < 0.01 vs. Control mice. \*; p < 0.05 vs. vehicle mice (Student's *t*-test).

### 3-5 受動回避試験におけるトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の効果

認知機能の評価として、受動回避試験を行った。受動回避試験は、恐怖記憶 (学習記憶) を評価する試験系である。受動回避試験は、薬物投与 5 日目から 7 日目に行った。7 日目の保持試行において、スコポラミンは、対照群と比較して暗いチャンバーへ侵入するまでの時間を有意に短縮させた。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg, p.o.) 及びドネペジル (10 mg/kg, p.o.) は、この侵入時間の短縮を有意に抑制し、受動回避試験において認知機能の低下を抑制した (Fig. 13)。

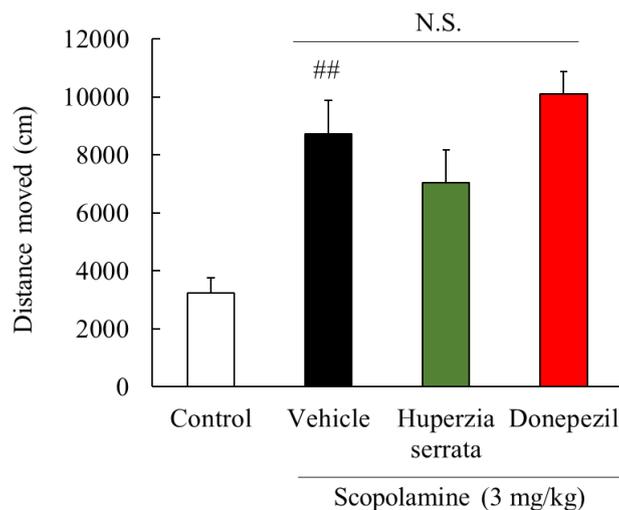


**Fig. 13 The effect of the AEF of *Huperzia Serrata* on the memory in scopolamine-induced cognitive impairment mice using passive avoidance test.**

The effect of AEF of *Huperzia serrata* to the learning and memory against scopolamine-induced cognitive impairment mice. Donepezil is positive control. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 9 or 10). ##; p < 0.01 vs. Control mice. \*\*; p < 0.01, \*; p < 0.05 vs. vehicle mice (Student's *t*-test).

### 3-6 オープンフィールド試験におけるトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の効果

トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の自発活動量に及ぼす影響を検討するために、オープンフィールド試験を行った。スコポラミンは、対照群と比較して有意に自発活動量を増加させた。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg, p.o.) 及びドネペジル (10 mg/kg, p.o.) の投与は、スコポラミン投与による自発活動量の増加に対して明らかな影響を与えなかった (Fig.14)。これらの結果から、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の記憶改善作用に、自発活動量に対する影響はないことが示唆された。



**Fig. 14 The AEF extract of *Huperzia serrata* did not affect to the locomotor activity of scopolamine administrated mice.**

Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. (n = 9 or 10). ###; p < 0.01 vs. Control mice (Student's *t*-test).

#### 第4節 考察

本研究では、岐阜県産トウゲシバ (*Huperzia serrata*) エタノール抽出物より調整した AEF の AChE に対する作用を検討した。Huperzine A はトウゲシバのみならず、コスギラン (*Huperzia selago*, *Lycopodium selago*) にも含まれるアルカロイドであり、その含有量は 0.04 ~ 0.16% 程度である(49,50)。中国産トウゲシバにおいてもその含有量が報告されているが、huperzine A 含有量は 0.02% 未満と報告されている一方 (27)、本研究で使用した岐阜県産トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の huperzine A 含有率は 0.5% であった。植物の構成成分、成分含有量は、採集する産地、時期によって異なることから、本研究に使用した岐阜県産トウゲシバは huperzine A に富む植物資源であると考えられる。

過去の報告において、ドネペジル及び huperzine A は濃度依存的に AChE 阻害作用を示すことが報告されている (51,52)。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) も同様に濃度依存的な AChE 阻害作用を示した。これらの結果は、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の AChE に対する作用の一部に、huperzine A の効果に関わっていることが示唆された。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) の AChE に対する IC<sub>50</sub> 濃度 [5.96 µg/mL (95% C.I. 4.05 ~ 7.88 µg/mL)] は、含有量から算出した huperzine A 濃度に換算すると約 123 nM となり、huperzine A 単独の IC<sub>50</sub> 濃度 (87.17 nM) の約 1.5 倍となる。Huperzine A は 2 つの光学異性体が存在し、(-)-huperzine A は (+)-huperzine A よりも AChE に対する親和性が約 35 倍と高く、より強力に AChE を阻害するという報告がある (53)。抽出物中の異性体の存在比率は不明であるが、抽出物中に (+)-huperzine A が存在していることが、huperzine A 単独との IC<sub>50</sub> の差として表れている可能性が考えられる。

BuChE はコリンエステラーゼの一種で、AChE と同様アセチルコリンを分解する。本研究において、huperzine A とドネペジルは AChE 阻害作用を示す濃度では、BuChE を阻害しなかった。HuperzineA は AChE 阻害よりもはるかに高い濃度において BuChE を阻害することが知られている (29)。それ故に、本研究においても huperzine A は AChE 選択的に阻害作用を示した。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) も同様に、AChE 阻害作用を示した濃度では BuChE を阻害しなかった。これらの結果から、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) は、AChE に高い選択性を有することが示唆された。

スコポラミン誘発認知機能障害モデルマウスは、コリン作動性神経を介した記憶低下の観点から、認知症、AD の実験的動物モデルとして広く使用されている (36)。Y 字型迷路試験におけるアーム交替行動は、短期記憶や作業記憶の指標として用いられる (54,55)。受動回避試験は、記憶の評価を行うために行われ、長期記憶や学習記憶、恐怖記憶の指標とされている (56)。認知症においては、初期の段階から短期記憶、作業記憶が失われ、症状が進行するにつれて長期記憶、エピソード記憶が失われる。したがって、Y 字型迷路試験は認知症初期、受動回避試験は認知症進行後の認知機能を反映する試験であると考えられる。スコポラミンの投与は、これらの試験において正しいアーム交替行動、暗室侵入時間の低下による記憶障害を誘発した。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及びドネペジル は、どちらの行動試験においてもスコポラミンにより引き起こされた記憶障害を軽減した。これらの結果は、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) が AChE 阻害によるコリン作動性経路の活性化を通して、スコポラミン誘発認知機能障害モデルマウスの記憶機能を改善することを示唆している。また Y 字型迷路試験においてスコポラミンは総アーム侵入数を上昇させたが、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及びドネペジルは、総アーム侵入

数に影響を及ぼさなかった。Y字型迷路試験における総アーム侵入数は自発活動の代用評価としても使用される。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及びドネペジルは、自発活動ではなく認知機能にのみ影響を及ぼしたと考えられる。AChE 阻害薬であるタクリンはスコポラミンによる自発活動を低下させるが、より AChE 阻害作用の強い bis(7)-タクリンは自発活動に影響しないことから、自発活動に対する作用はコリン作動性神経の調節の影響は少ないと考えられる (57)。また、ドパミン神経系の調節により、スコポラミン投与による自発活動が変化することから、スコポラミン誘発認知機能障害モデルの自発活動量は、ドパミン神経系が影響を受けていると考えられる (58)。

本研究において、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) (30 mg/kg, p.o.) 及びドネペジル (10 mg/kg, p.o.) はスコポラミン誘発認知機能障害モデルに対して、同程度の認知機能改善効果を示した。トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 30 mg/kg は huperzine A に換算すると 140 µg/kg に相当し、ラットの低酸素性虚血性脳障害による認知機能障害及び肥満誘発性の認知機能障害を改善した投与量と類似している (45,46)。Huperzine A は AChE 阻害作用のみならず、ノルアドレナリン、ドパミン放出作用も有している。さらに、huperzine A はドネペジルと比較して脳内での AChE 阻害活性が約 8 倍と高く、ACh 放出に対する作用も約 11 倍であることも、ドネペジルと同等の認知機能改善効果を有していると考えられる (27)。

スコポラミンのような抗コリン薬は、オープンフィールド試験において自発活動量を増加させ、過活動をもたらすことが報告されている (59,60)。Y字型迷路試験における総アーム侵入数と同様に、スコポラミンはマウスの自発活動量を増加させ、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及びドネペジルは自発活動量に影響を及ぼさなかった。小脳に依存した学習記憶は、自発運動の増加とと

もに増強されることが報告されているが (61)、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及びドネペジルはマウスの行動に影響を及ぼすことなく記憶を改善したことから、作業記憶、恐怖記憶の形成には自発活動量は影響しないことが考えられる。

以上、本章では岐阜県産トウゲシバに **huperzine A** が含まれていることを確認し、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) が AChE 阻害作用を有していることを初めて明らかにした。さらに、スコポラミン誘発認知機能障害モデルマウスの認知機能を改善した。これらの結果から、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) はコリン作動性神経の調節に関与し、認知症や、AD などの記憶能力が低下する疾患の予防に有用である可能性が示された。次章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) の酸化ストレスに対する作用の検討を行い、**huperzine A** 以外の機能性成分の関与についても検討した。

## 第2章 酸化ストレスに対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びその含有成分の作用

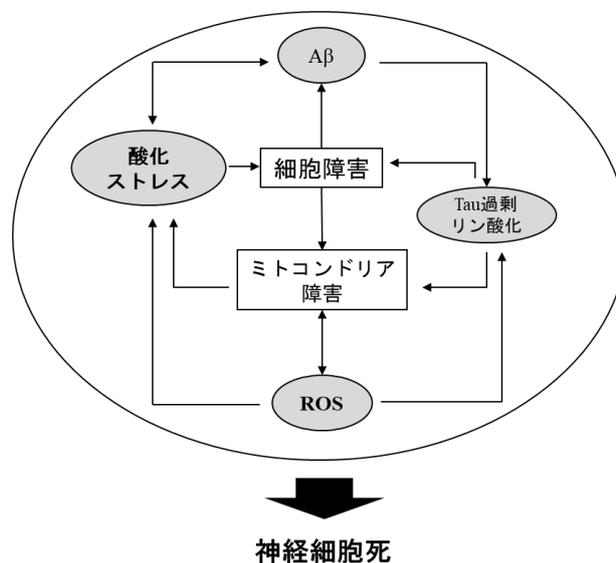
### 第1節 緒言

AD は加齢とともに発症頻度が上昇するが、加齢に伴って上昇することが知られているのが酸化ストレスである。酸化ストレスは AD のみならず、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis; ALS) などの他の神経変性疾患の神経細胞死においても関与が示唆されている (62,63)。酸化ストレスは「酸化反応により引き起こされる生体にとって有害な作用」と定義され、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の産生と細胞の抗酸化能の不均衡により発生する。過剰な ROS は糖、脂質、タンパク質などを酸化し、酸化ストレスを誘導する (64)。ROS を介した酸化ストレスの発生は AD の促進的な要因となることが示唆されている (65,66)。A $\beta$  は ROS 産生を増加させ、その ROS の増加は A $\beta$  の生成を亢進し蓄積をさらに加速させる (67–69)。実際に AD 患者の剖検脳や脳脊髄液では、核酸、タンパク質、脂質の酸化修飾産物や終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) などの ROS との反応で生成される物質が増加している (4)。また、このような酸化ストレスマーカーの増加は、MCI 患者でも確認されている (70,71)。AD において、酸化ストレスの上昇は A $\beta$  の豊富な領域で観察されること、認知機能の低下よりも早期の段階から A $\beta$

レスは「酸化反応により引き起こされる生体にとって有害な作用」と定義され、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の産生と細胞の抗酸化能の不均衡により発生する。過剰な ROS は糖、脂質、タンパク質などを酸化し、酸化ストレスを誘導する

(64)。ROS を介した酸化ストレスの発生は AD の促進的な要因となることが示唆されている (65,66)。A $\beta$  は ROS 産生を増加させ、その ROS の

増加は A $\beta$  の生成を亢進し蓄積をさらに加速させる (67–69)。実際に AD 患者の剖検脳や脳脊髄液では、核酸、タンパク質、脂質の酸化修飾産物や終末糖化産物 (advanced glycation end products; AGEs) などの ROS との反応で生成される物質が増加している (4)。また、このような酸化ストレスマーカーの増加は、MCI 患者でも確認されている (70,71)。AD において、酸化ストレスの上昇は A $\beta$  の豊富な領域で観察されること、認知機能の低下よりも早期の段階から A $\beta$



**Fig. 15 Relationships of oxidative stress and A $\beta$ .**  
文献 64 (Maes, O. C et al. 2011. *Stud. Exp. Model*)  
より改変引用

が蓄積することを踏まえると、AD 発症、認知機能の低下よりもさらに早期で酸化ストレスが上昇していることが示唆される。そのため、酸化ストレスの軽減は A $\beta$  の蓄積、神経細胞死、認知機能の低下を予防する重要な手段になると考えられる。

抗酸化物質による酸化ストレスの抑制は、AD において神経細胞死の抑制、認知機能障害の改善に関与する。ビタミン E、クルクミン、レスベラトロールなどは、AD の培養細胞モデル、動物モデルにおいて神経保護作用、認知機能改善作用が報告されている (72–77)。また、認知機能に関する機能性表示食品の成分であるイチョウ葉エキスも抗酸化作用を有することが報告されている (78)。さらに近年、抗酸化サプリメントとして販売されている Twendee X (Coenzyme Q10、アミノ酸、ビタミンを構成成分とする) が認知症予防に有効であることが報告された (79)。この報告は抗酸化物質がヒトの疾患予防に有効であることを初めて示した報告であり、認知症予防の戦略として臨床的に意義があると考え、トウゲシバに関する本研究においても酸化ストレスに着目した。

トウゲシバには多くの活性を有するアルカロイドが含まれているが、トウゲシバの他の成分とその作用についてはほとんど知られていない。本章ではトウゲシバの huperzine A 以外の成分も探索するために、1 章とは異なる熱水によるトウゲシバの抽出 (トウゲシバ水抽出) を行った。トウゲシバ水抽出物 (WHS) を用いて、酸化ストレスに対する保護作用を検討した。さらに、認知機能障害の改善に酸化ストレスが寄与するかについても検討した。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

ドネペジル塩酸塩、Caffeic acid、*trans*-Ferulic acid は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)、過酸化水素 (hydrogen peroxid: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate: SDS)、ブタノール、ピリジン、酢酸 (acetic acid) は Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、 $\beta$ -Amyloid Peptide (1-42) (A $\beta$ <sub>1-42</sub>)、チオバルビツール酸は Sigma Aldrich、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は Nacalai Tesque、TritonX-100 は Bio Rad Laboratories、Huperzine A は LKT Laboratories Inc (MN, USA)、スコポラミンは Sigma Aldrich (MO, USA) より購入した。TritonX-100 は Bio Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、生理食塩液は Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water: Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>・12H<sub>2</sub>O)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate: Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>・2H<sub>2</sub>O)、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl) は Kishida Chemical (Osaka, Japan)、L-glutamic acid、ペントバルビタール (pentobarbital)、dimethyl sulfoxide (DMSO) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) よりそれぞれ購入した。また、トウゲシバ水抽出物 (WHS) は、アピ株式会社 (岐阜市) より供与して頂いた。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O を MilliQ に溶解し、調製した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

ICR マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウス (雄性, 6 週齢) は設定温度: 23°C (許容範囲: 20 ~ 26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40 ~ 70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00 ~ 午後 8:00) に維持された岐阜薬科大学の動物

飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横 17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形試料 (CE-2; CLEA Japan, Tokyo, Japan) にて飼育した。行動試験はすべて午前 9:00 から午後 6:00 の間に行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に承認申請を行い、許可を受けた上で実施した。

### 2-2-2 細胞培養

マウス由来海馬細胞 HT-22 細胞は岐阜大学 平田洋子教授より譲渡されたものを使用した。HT-22 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した DMEM を用いて培養した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。また、2~3 日おきにトリプシン処理により継代培養を行った。

### 2-2-3 トウゲシバ水抽出物 (WHS) の調製及び HPLC 分析

抽出物の調製には、岐阜県山県市で採取したトウゲシバを使用した。トウゲシバ全草を乾燥後、熱水 (90°C) で 3 時間抽出し、水抽出物を調製した。水抽出物に 5 倍量 (w/w) の超純水を加えたものを被検試料として、HPLC 分析を行った。HPLC に使用した装置及び測定条件は下記の通りである。

装置 : ACQUITY UPLC H-Class (Waters, Milford, MA, USA)、分離カラム :

ACQUITY BEH-C<sub>18</sub> column (2.1×100 mm)、溶出条件 ; 流速 0.3 mL/min、カラム温度 45°C、注入量 10 µL、検出 310 nm、移動相 : 溶媒 A (0.1%ギ酸含有精製水)、溶媒 B (0.1%ギ酸含有アセトニトリル)、グラジエント (溶媒 B): 3% @ 0 分 → 30% @ 15 分 → 97% @ 18 分

また、ピーク同定のために同様の条件で、huperzine A、caffeic acid、ferulic acid を分析した。

#### 2-2-4 細胞死評価

##### 2-2-4-1 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 誘発細胞死

HT-22 細胞を  $1.5 \times 10^3$  cells/well の密度で 96 well プレートに播種した。37°C で 24 時間培養後、培地を A $\beta$ <sub>1-42</sub> (5  $\mu$ M) 含有 2% FBS 培地に交換した。A $\beta$ <sub>1-42</sub> (5  $\mu$ M) 含有 2% FBS 培地は、DMSO に溶解させた A $\beta$ <sub>1-42</sub> を 2% FBS 培地で希釈し、A $\beta$ <sub>1-42</sub> 終濃度を 5  $\mu$ M とした。その後 1% DMSO 含有 PBS、30-300  $\mu$ g/mL トウゲシバ水抽出物 (WHS)、0.1 ~ 1  $\mu$ M huperzine A、1 ~ 100  $\mu$ M caffeic acid または 1 ~ 100  $\mu$ M ferulic acid を各 well に 10  $\mu$ L ずつ添加し、37°C で 48 時間培養した。細胞死は Hoechst dye 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 及びヨウ化プロピジウム (propidium iodide; PI, Molecular Probes) による蛍光染色法を用いて評価した。Hoechst 33342 により全細胞を染色し、PI により死細胞を染色した。

##### 2-2-4-2 過酸化水素及びグルタミン酸誘発細胞死

HT-22 細胞を  $3.0 \times 10^3$  cells/well の密度で 96 well プレートに播種した。37°C で 24 時間培養後、培地を 1% FBS 培地に交換した。その後 1% DMSO 含有 PBS、30-300  $\mu$ g/mL トウゲシバ水抽出物 (WHS)、0.1 ~ 1  $\mu$ M huperzine A、1 ~ 100  $\mu$ M caffeic acid または 1 ~ 100  $\mu$ M ferulic acid を各 well に 10  $\mu$ L ずつ添加した。37°C で 1 時間培養後、過酸化水素 (hydrogen peroxide: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (100  $\mu$ M) またはグルタミン酸 (2 mM) を添加し、37°C で 24 時間培養した。細胞死評価は 2-2-3-1 と同様の手順で行った。画像の撮影は、倒立落射蛍光顕微鏡 (IX70; Olympus. Co., Tokyo, Japan) または Lionheart (BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA) を使用した。各細胞数の計測は画像処理ソフトウェア (Image-J, version 1.33f; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) または Gen 5

(version 3.03) を使用した。

#### 2-2-5 活性酸素種産生評価

HT-22 細胞を 2-2-4-2 と同様の手順で培養後、5-(and 6)-chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CMH<sub>2</sub>DCFDA) (10 μM) (励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm) を添加し、Varioskan flash 2.4 マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を使用して、蛍光を測定した。蛍光測定後、37°C で 1 時間静置した後再度蛍光測定を行った。蛍光測定後に培地を交換し、Hoechst 33342 を添加し、核染色を行った。

#### 2-2-6 トウゲシバ抽出物のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害に対する検討

第 1 章 2-2-4 の手順に従って行った。

#### 2-2-7 Y 字型迷路試験

トウゲシバ水抽出物 (WHS) (50, 100 mg/kg/day) またはドネペジル (5 mg/kg/day) を蒸留水に溶解し、1 日 1 回、10 mL/kg で経口投与を行った。薬物投与 14 日目に短期記憶の評価として、Y 字型迷路試験を行った。手順は第 1 章 2-2-6 に従った。

#### 2-2-8 受動回避試験

トウゲシバ水抽出物 (WHS) (50, 100 mg/kg/day) またはドネペジル (5 mg/kg/day) を蒸留水に溶解し、1 日 1 回、10 mL/kg で経口投与を行った。薬物投与 13 日目から 15 日目に、学習記憶の評価として、受動回避試験を行った。

手順は第 1 章 2-2-7 に従った。

#### 2-2-9 脂質過酸化試験

受動回避試験終了後、マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、マイクロチューブの中に入れ、重量を測定後、液体窒素を用いて急速冷凍した。脳はホモジナイズに使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。脳のホモジナイズは脳重量の 10 倍の 1.15% KCl 溶液を添加した後、ホモジナイザーを用いて氷冷下で粉碎及び均一化した。その後、3,000 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心した。遠心分離後の上清を回収し、試験溶液とした。試験溶液 200  $\mu\text{L}$ 、酢酸緩衝液 (pH 3.6) 200  $\mu\text{L}$ 、0.8% チオバルビツール酸 200 $\mu\text{L}$ 、8.1% SDS 40  $\mu\text{L}$  を混合し、 $100^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応させた。反応後、氷冷下でブタノール/ピリジン (15:1) 混合溶液 400  $\mu\text{L}$  を加え、転倒混和し 4,000 rpm、室温で 10 分間遠心した。遠心分離後の上清の 532 nm における吸光度を測定した。

#### 2-2-10 統計学的解析

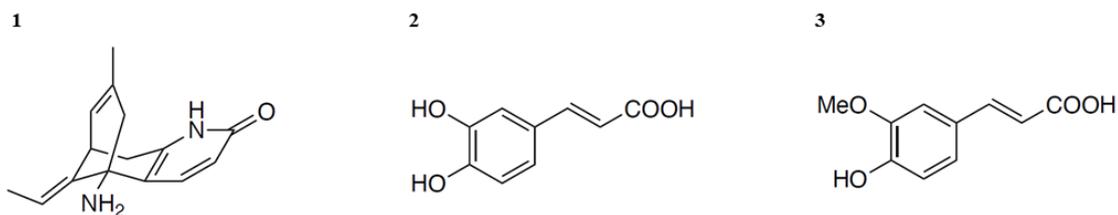
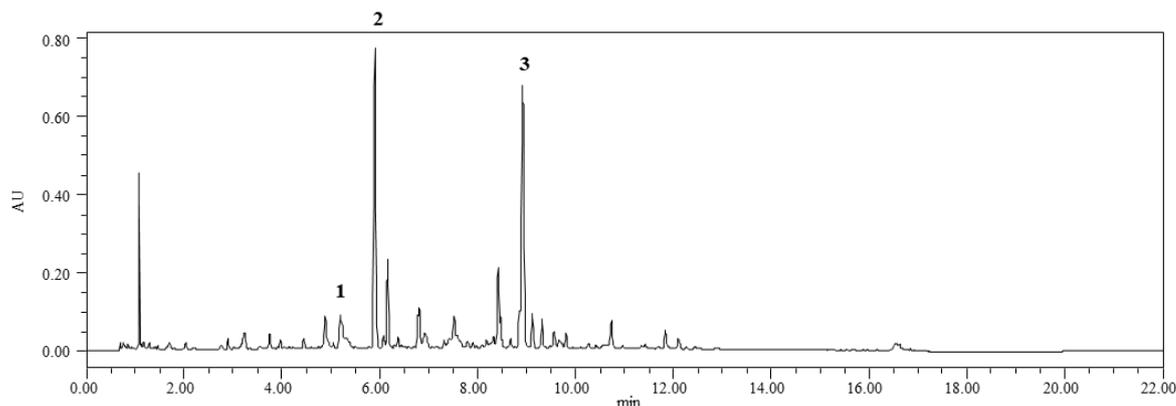
実験成績は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test あるいは Dunett's test により行った。危険率が 5% 未満を有意差ありとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 トウゲシバ水抽出物 (WHS) HPLC 分析及び評価成分の決定

トウゲシバ水抽出物 (WHS) の HPLC クロマトグラムを示す (Fig. 13)。天然物標品とトウゲシバ水抽出物 (WHS) を重ね打ちすることにより含有成分の同定を試み、ピーク 1 (保持時間 5.27 min) を huperzine A、ピーク 2 (保持時間 5.90

min) を caffeic acid、ピーク 3 (保持時間 8.91 min) を ferulic acid と同定した。尚、検量線から huperzine A の含有率は 0.065% であることが判った。以降この 3 成分を含有成分として評価した。

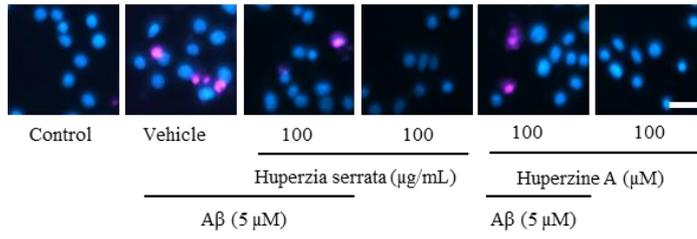
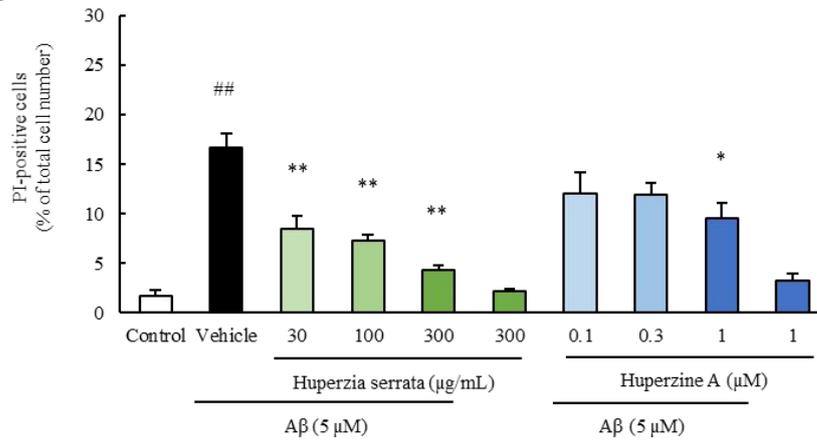
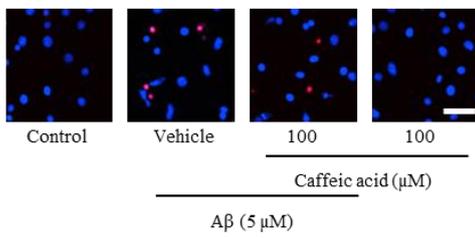
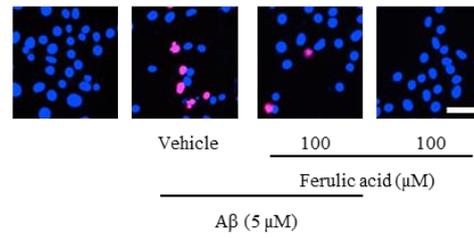
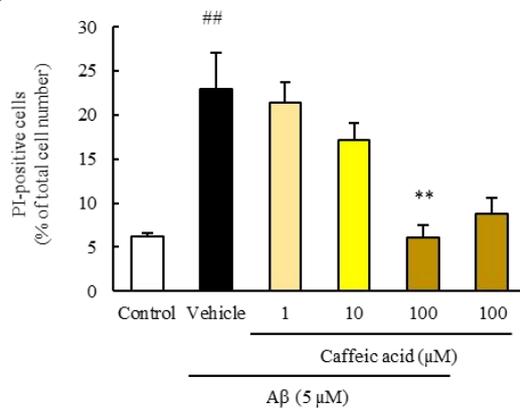
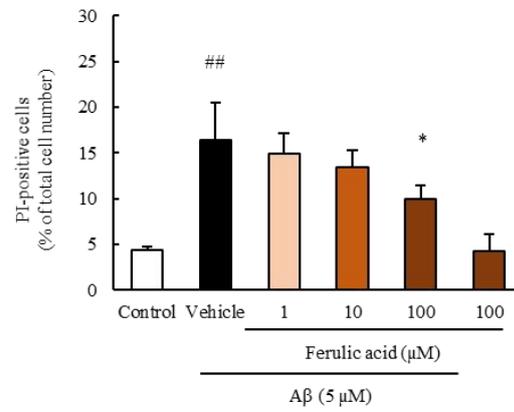


**Fig. 13** *Huperzia serrata* and its components

HPLC chromatogram of *Huperzia serrata* extract samples at 310 nm. Peaks: 1, huperzine A; 2, caffeic acid; 3, ferulic acid.

### 3-2 A $\beta$ 誘発細胞死に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び含有成分の作用

AD において A $\beta$  は神経細胞の脱落に深く関与している。そこで HT-22 細胞を用いて、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びその含有成分の A $\beta$  誘発細胞障害に対する作用を検討した。A $\beta$  (5  $\mu$ M) の処置は、PI 陽性死細胞の比率を大幅に増加させた。トウゲシバ抽出物 (30 ~ 300  $\mu$ g/mL)、huperzine A (1  $\mu$ M)、caffeic acid (100  $\mu$ M)、ferulic acid (100  $\mu$ M) は、A $\beta$  誘発細胞死を有意に抑制した (Fig. 14)。

**A****B****C****E****D****F**

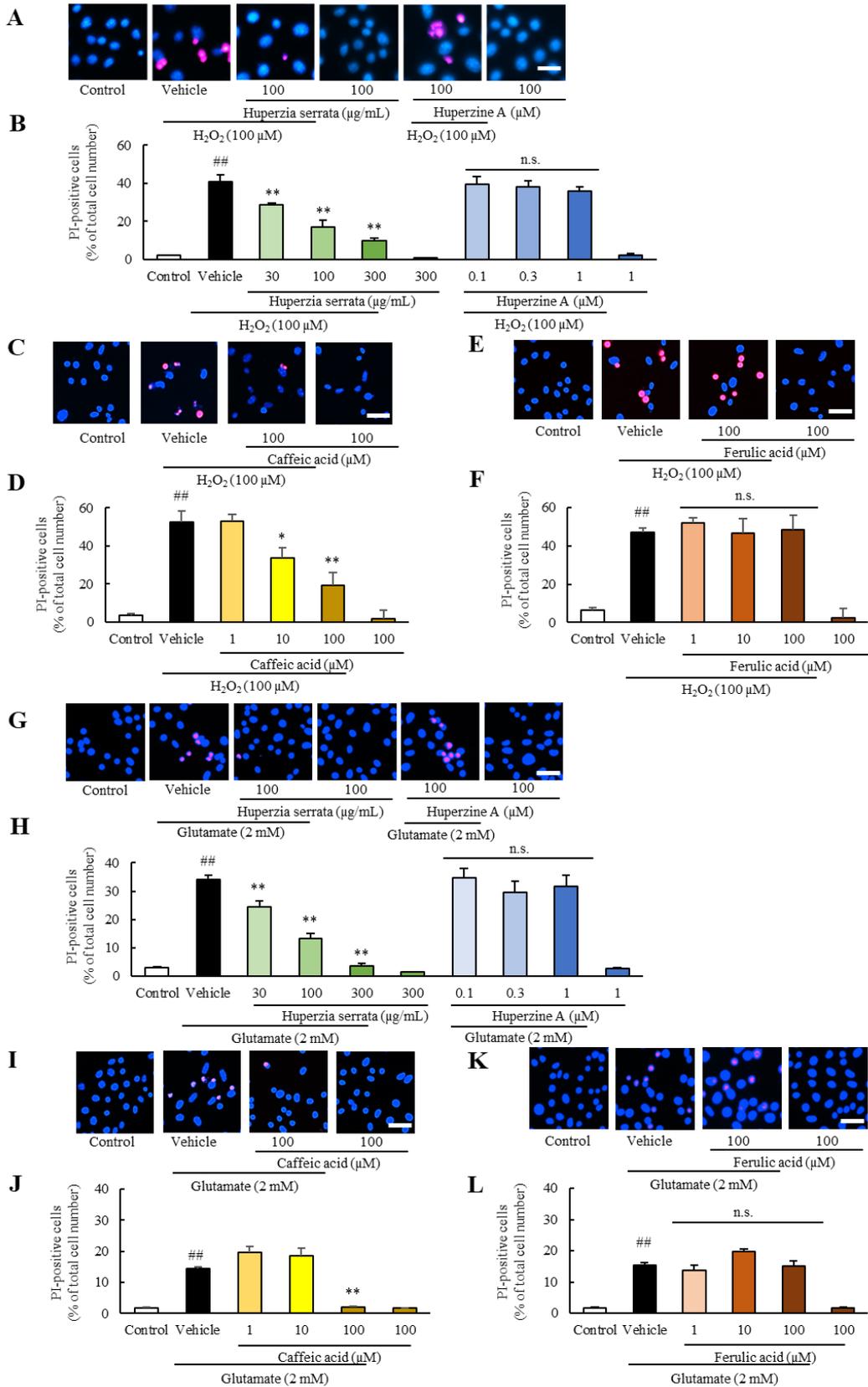
Continued on the next page

**Fig. 14 Water extract of *Huperzia serrata* and its components protect HT22 cells against A $\beta$ -induced cell death.**

The number of Hoechst 33342- or propidium iodide- (PI) positive cells were counted, and the cell death rate was expressed as the percentage of PI-positive cells to Hoechst 33342-positive cells. HT22 cells were treated with vehicle, with or without water extract of *Huperzia serrata* and its components, followed by treatment with A $\beta$ 1-42 (5  $\mu$ M) or vehicle for 48 h. (A), (C), (E) Representative fluorescence micrographs of Hoechst33342 (blue) and propidium iodide (PI: red) staining of HT22 cells. (B) Water extract of *Huperzia serrata* and huperzine A, (D) caffeic acid, and (F) ferulic acid. <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  vs Control (Student's *t*-test). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  vs Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 5).

3-3 過酸化水素及びグルタミン酸誘発細胞死に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び含有成分の作用

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> やグルタミン酸は酸化ストレスにより細胞死を誘導するため、これらの薬剤を用いて、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び含有成分の酸化的障害に対する効果を検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) 添加により誘導された細胞死に対して、トウゲシバ水抽出物 (WHS) (30 ~ 300  $\mu$ g/mL)、caffeic acid (10, 100  $\mu$ M) は有意に細胞死率の上昇を抑制した。一方、huperzine A、ferulic acid は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発細胞死に対して作用を示さなかった (Fig. 15 A~F)。同様に、グルタミン酸 (2 mM) 添加により誘導された細胞死に対しても、トウゲシバ水抽出物 (WHS) (30 ~ 300  $\mu$ g/mL)、caffeic acid (100  $\mu$ M) は有意に細胞死率の上昇を抑制した。しかしながら、huperzine A、ferulic acid は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘発細胞死に対して作用を示さなかった (Fig. 15 G~L)。

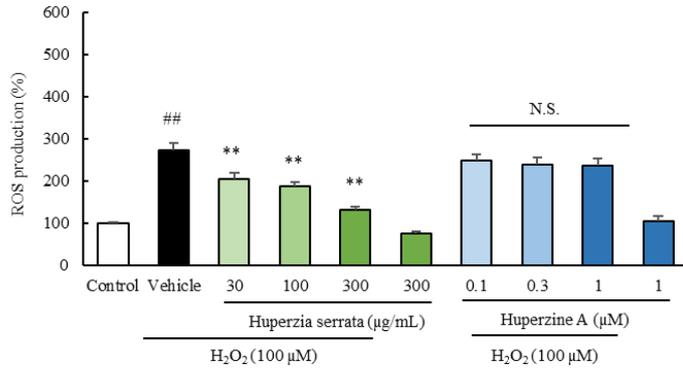
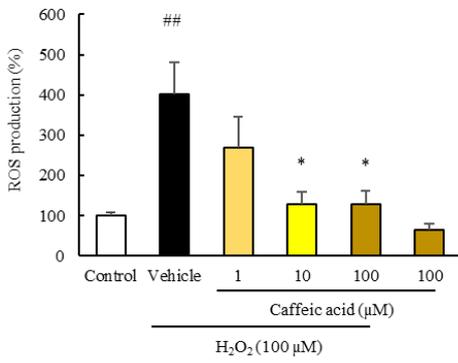
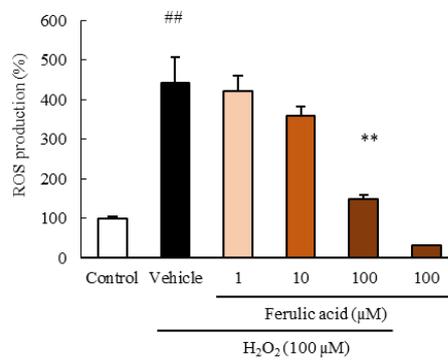
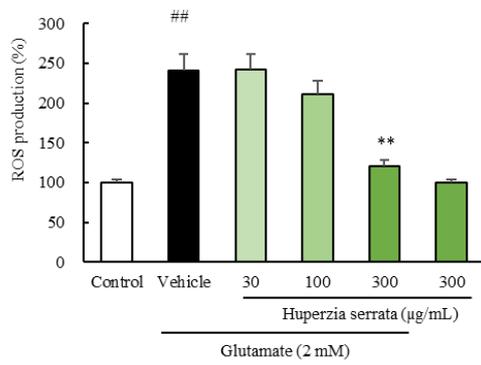
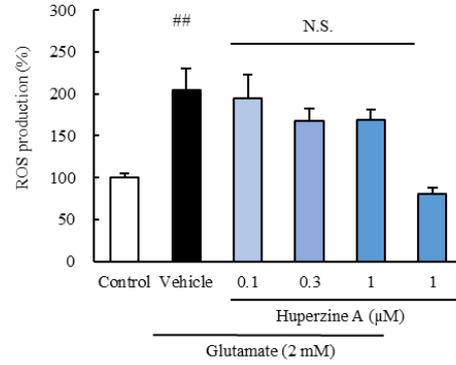
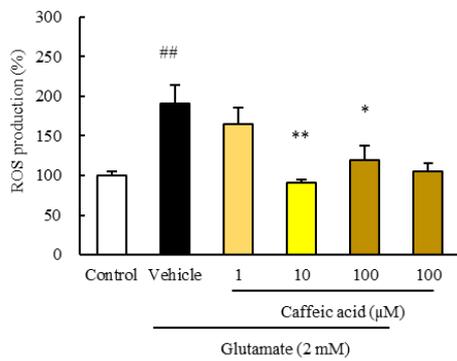
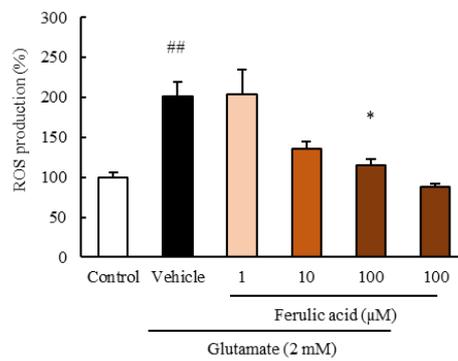


Continued on the next page

**Fig. 15 Effects of water extract of *Huperzia serrata* and its components on HT22 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and glutamate-induced cell death.**

The number of Hoechst 33342- or propidium iodide- (PI) positive cells were counted, and the cell death rate was expressed as the percentage of PI-positive cells to Hoechst 33342-positive cells. HT22 cells were treated with vehicle, with or without water extract of *Huperzia serrata* and its components, followed by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM), glutamate (2 mM), or vehicle for 24 h. (A), (C), (E), (G), (I), (K) Representative fluorescence micrographs of Hoechst33342 (blue) and propidium iodide (PI: red) staining of HT22 cells. (B), (H) Water extract of *Huperzia serrata* and huperzine A; (D), (J) caffeic acid or (F), (L) ferulic acid. <sup>##</sup>, p < 0.01 vs Control (Student's *t*-test). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 vs Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean ± S.E.M. (n = 5 or 6).

3-4 活性酸素種産生に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び含有成分の作用  
ROS の産生は酸化ストレスによる細胞死の直接的な原因となるため、CM-H<sub>2</sub>DCFDA を用いた細胞内 ROS の評価を行った。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (30 ~ 300 μg/mL)、caffeic acid (10, 100 μM)、ferulic acid (100 μM) は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) 添加による細胞内 ROS 量の上昇を有意に抑制した (Fig. 16 A ~ C)。同様に、トウゲシバ水抽出物 (WHS) (300 μg/mL)、caffeic acid (10, 100 μM)、ferulic acid (100 μM) は、グルタミン酸 (2 mM) 添加により上昇した細胞内 ROS 量を有意に減少させた (Fig. 16 D ~ G)。一方で、huperzine A はいずれの濃度においても細胞内 ROS 量に影響を及ぼさなかった。

**A****B****C****D****E****F****G**

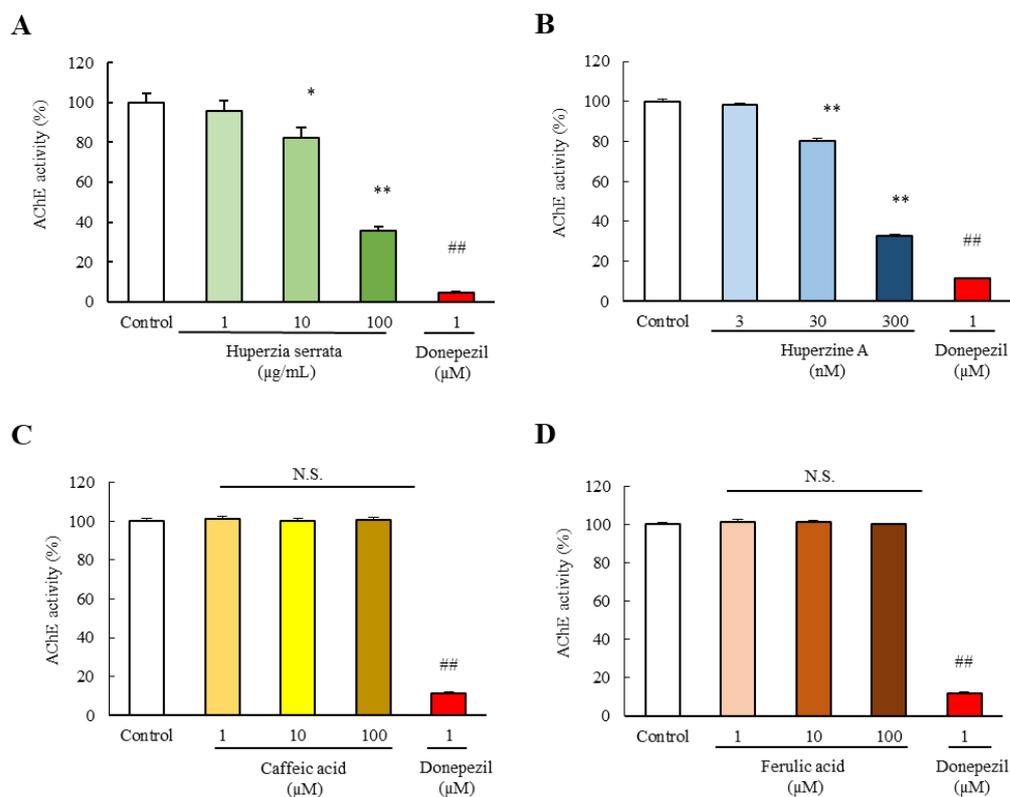
Continued on the next page

**Fig. 16 Effects of water extract of *Huperzia serrata* and its components on ROS production in HT22 cells during oxidative stress.**

ROS production was measured by CM-H2DCFDA kit assay at 24 h. HT22 cells were treated with vehicle, with or without water extract of *Huperzia serrata* and its components, followed by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM), glutamate (2 mM), or vehicle for 24 h. (A), (D) Water extract of *Huperzia serrata* (A), (E) huperzine A (B), (F) caffeic acid, (C), (G) ferulic acid. <sup>##</sup>, p < 0.01 vs Control (Student's *t*-test). \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01 vs Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean ± S.E.M. (n = 6).

3-5 AChE 活性に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び含有成分の作用

1 章 3-2 でトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及び huperzine A が濃度依存的に AChE 活性を阻害することを明らかにした。本章で着目した huperzine A 以外の含有成分における AChE 活性への影響を検討した。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (10, 100 μg/mL) 及び huperzine A (30, 300 nM) は濃度依存的な AChE 活性阻害作用を示した (Fig. 17 A, B)。一方、caffeic acid、ferulic acid は AChE 活性阻害作用を示さなかった (Fig. 17 C, D)。対照薬として使用したドネペジルは、いずれの試験においても AChE 活性阻害作用を示した。

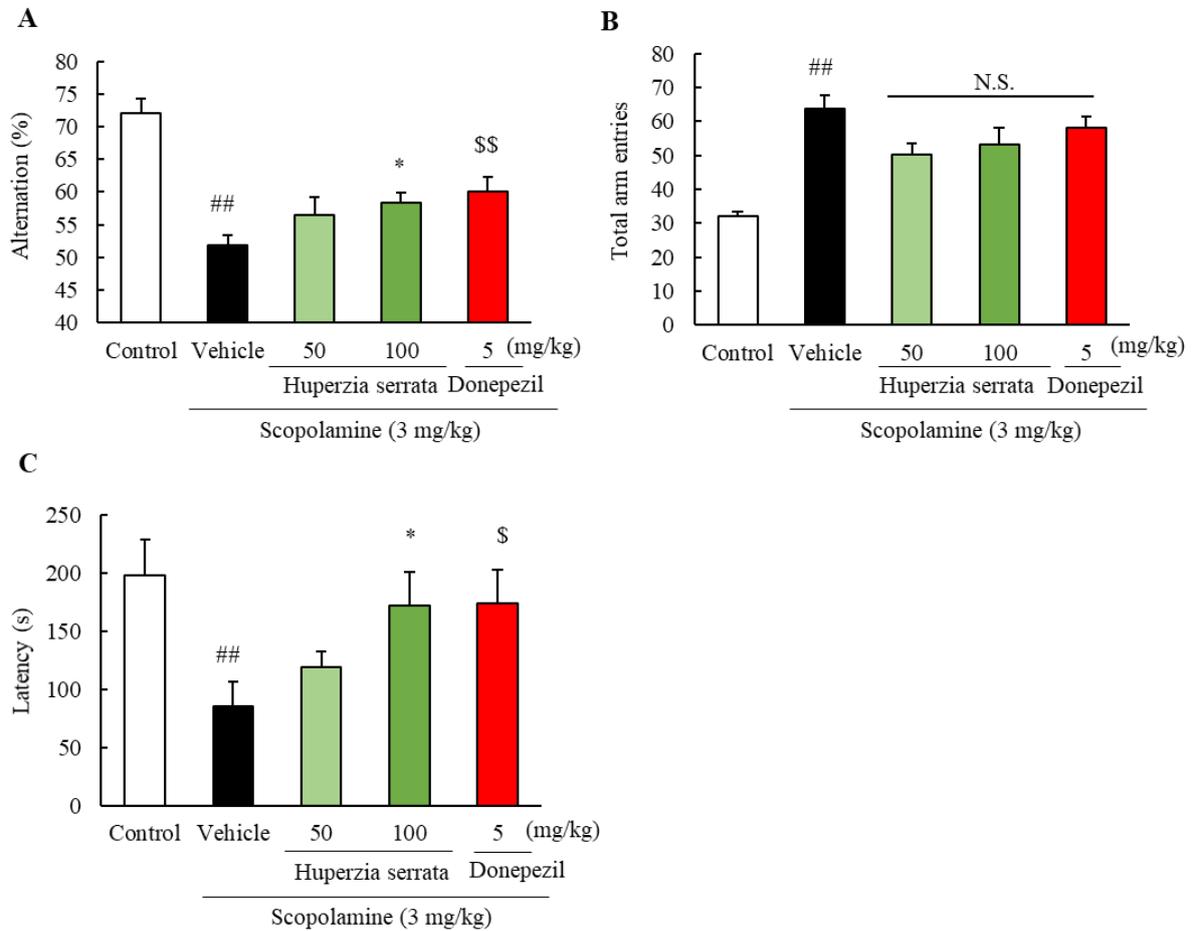


**Fig. 17 Effects of water extract of *Huperzia serrata* and its components on the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity.**

Each graph shows AChE activity after treatment with (A) Water extract of *Huperzia serrata*, (B) huperzine A, (C) caffeic acid, and (D) ferulic acid. AChE activity observed in the control was considered 100%. ##,  $p < 0.01$  versus control (Student's *t*-test). \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  vs Control (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4$ ).

### 3-6 認知機能障害に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) の作用

酸化ストレスと認知機能障害の関連を検討するため、1章と同様にスコポラミン誘発認知機能障害モデルマウスに対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) の作用を検討した。スコポラミンは抗コリン作用のみならず、グルタチオンの低下により酸化ストレスを誘導する薬剤であることが知られている (80)。スコポラミン (3 mg/kg, i.p.) は作業記憶を評価する Y 字型迷路試験において、マウスの交替行動率を有意に減少させ、総アーム侵入数を有意に増加させた。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (100 mg/kg, p.o.) 及びドネペジル (5 mg/kg, p.o.) の投与により、マウスの交替行動率は有意に改善された。一方、それらの薬剤は総アーム侵入数には影響を及ぼさなかった (Fig. 18 A, B)。恐怖記憶を評価する受動回避試験において、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びドネペジルはスコポラミンにより低下した暗室への侵入時間を有意に上昇させた (Fig. 18 C)。

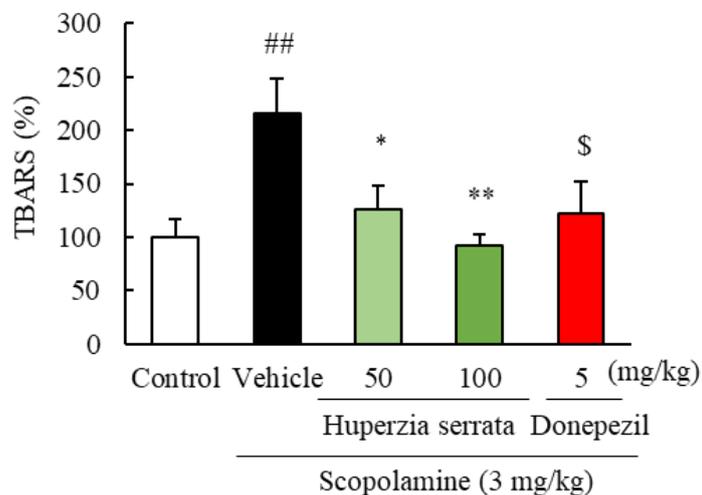


**Fig. 18 Effects of water extract of *Huperzia Serrata* on cognitive function in scopolamine-induced cognitive-impaired mice using Y-maze and passive avoidance tests.**

Water extract of *Huperzia serrata* (50, 100 mg/kg/day) or donepezil (5 mg/kg/day) was administered orally once a day for 15 days. On day 14, the Y-maze test was performed. On days 13 to 15, the passive avoidance test was performed. Effects of water extract of *Huperzia serrata* on (A) short-term and (B) fear-learning memory in scopolamine-induced cognitive-impaired mice. <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  vs Control; <sup>\$</sup>,  $p < 0.05$ ; <sup>\$\$</sup>,  $p < 0.01$  vs Vehicle (Student's *t*-test); <sup>\*</sup>,  $p < 0.05$  versus Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10-16$ ).

### 3-7 脂質過酸化に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) の作用

脳の脂質過酸化は、脳内における酸化ストレスの発生と関連付けられるため、トウゲシバ水抽出物 (WHS) の脂質過酸化に対する作用を検討した。スコポラミン (3 mg/kg, i.p.) の処置を受けたマウスは、脳の脂質過酸化度 (TBARS) が有意に上昇した。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (50, 100 mg/kg, p.o.) 及びドネペジル (5 mg/kg, p.o.) の投与により、TBARS の上昇が有意に抑制された (Fig. 19)。



**Fig. 19 The effect of water extract of *Huperzia serrata* on lipid peroxidation in murine brains.**

Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ratio is shown as an indicator of lipid peroxidation. Water extract of *Huperzia serrata* administration decreased lipid peroxidation induced by scopolamine administration. The TBARS ratio observed in the control was considered 100%. ###,  $p < 0.01$  versus control; §,  $p < 0.05$  versus vehicle (Student's  $t$ -test); \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  vs Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 10-12$ ).

#### 第4節 考察

本章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びその含有成分の A $\beta$  または酸化ストレスによる細胞障害に対する作用を検討した。本章で用いたトウゲシバ抽出物は、熱水を用いて抽出したものを使用した。エタノール抽出物から調製したアルカロイド画分においては、huperzine A の含有率は約 0.5%であったが、熱水抽出物では多くの成分が混在するため huperzine A 含有率は約 0.07%に下がった。トウゲシバには多くのアルカロイドが含まれていることは分かっているが、他の含有成分とその作用に関する知見はほとんどない。本章ではトウゲシバの huperzine A 以外の成分も探索するために、第 1 章とは異なる水抽出物を用いて検討を行った。その結果、トウゲシバ水抽出物 (WHS) には caffeic acid 及び ferulic acid を含有することが明らかになった。A $\beta$  はオリゴマー化することで、細胞毒性を獲得し、HT-22 細胞に対しても細胞死を誘発する (81)。A $\beta$  の凝集を抑制する化合物、例えばクルクミンは A $\beta$  凝集抑制作用を介して、神経細胞障害を減弱する(82)。含有成分として検討した huperzine A、caffeic acid 及び ferulic acid は、A $\beta$  凝集抑制作用を有することが報告されている (83–85) ため、この作用により細胞死の誘導を抑制したと考えられる。Huperzine A の含有量は約 0.07%であるため、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は huperzine A 約 1  $\mu\text{M}$  に相当する。Caffeic acid 及び ferulic acid は定性のみ行ったため、正確な含有量は不明である。トウゲシバと同様、シダ植物であるヒカゲノカズラ (*Lycopodium clavatum*) は ferulic acid 含有量が約 0.5%であったという報告があり (86)、トウゲシバにも同程度の ferulic acid が含有されていると仮定すると、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  は ferulic acid 約 10  $\mu\text{M}$  に相当すると考えられる。Caffeic acid 及び ferulic acid のピークの大きさが類似していることから、caffeic acid 及び ferulic acid の含有量も同程度であると考えられる。トウゲ

シバ水抽出物 (WHS) は含有成分単独よりも強力に細胞死を抑制しており、含有成分が相加的に作用していると考えられる。

A $\beta$  の凝集による毒性の発現には、ROS 産生も関与し、抗酸化剤により A $\beta$  の細胞毒性は軽減される (87,88)。細胞内での ROS の増加・蓄積は酸化ストレスによる細胞死を誘導する。そこで、酸化ストレスにより細胞死を誘導する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及びグルタミン酸を使用して、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びその含有成分の細胞死抑制作用を検討した。HT-22 細胞に対する過剰なグルタミン酸の負荷は、シスチン/グルタミン酸トランスポーターの機能を抑制して細胞内のシスチン欠乏、グルタミン酸の蓄積を誘導する (89)。シスチンの欠乏により、内在性抗酸化物質であるグルタチオンが減少し、ROS の除去能力が低下することで細胞死が誘導される。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はヒドロキシルラジカルなどの他の ROS に変換され、酸化ストレスによる細胞死を誘導する (90)。トウゲシバ水抽出物 (WHS) は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及びグルタミン酸により誘導された細胞死及び ROS 産生の上昇を抑制した。さらに含有成分として検討した huperzine A、caffeic acid、ferulic acid の内、caffeic acid のみが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及びグルタミン酸による細胞死、ROS 産生を抑制した。この結果から、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 中の caffeic acid が酸化ストレスによる細胞死に対して主要な作用を示していることが示唆された。一方、ferulic acid は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及びグルタミン酸による細胞死に影響せず、ROS 産生のみ抑制した。Ferulic acid は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞障害に対して、抑制作用が弱いことが報告されている (91)。また、抗酸化活性の強さは caffeic acid の方が ferulic acid よりも強いことから (92)、ferulic acid (100  $\mu$ M) は細胞死を抑制できるほどの抗酸化活性に到達していない可能性が考えられる。Ferulic acid は、formononetin や calycosin と相加的にラジカル補足能力、細胞保護作用を上昇させる (91) ことから、抽出物中の他の成分と相加的に作用することで、酸化ス

トレスによる細胞死を抑制した可能性が考えられる。

前章でトウゲシバアルカロイド画分 (AEF) と huperzine A は濃度依存的に AChE 活性を抑制することを明らかにした。また、ポリフェノール、フラボノイドのような抗酸化物質においても AChE 活性を抑制することが報告されている (93–95)。そのためトウゲシバ水抽出物 (WHS)、huperzine A に加え、caffeic acid 及び ferulic acid の AChE 活性を測定した。AChE 活性阻害作用はトウゲシバ水抽出物 (WHS)、huperzine A にのみ認められ、caffeic acid 及び ferulic acid には認められなかった。Caffeic acid 及び ferulic acid は、AChE 阻害作用を有することが報告されている (96–98)。しかしながら、これらの報告ではモデルマウスに薬剤を作用させた場合の結果であり、AChE と直接作用することは確認されていない。今回用いた手法では、薬剤と AChE が直接作用することを確認できる。今回の結果から、huperzine A は AChE に直接作用するが、caffeic acid 及び ferulic acid は AChE に直接作用しないことが明らかとなった。

スコポラミン誘発認知機能障害モデルは、AD 患者で観察される記憶障害を模するモデルの一つとして使用されている。ACh による神経伝達はニコチン性 ACh 受容体、ムスカリン受容体に大別されるが、どちらの受容体も学習、記憶に関与する受容体であることが知られている (99)。スコポラミンはムスカリン受容体を遮断することで、アセチルコリン神経伝達異常による認知機能障害を誘発するが、近年スコポラミンが脳内で抗酸化酵素 (グルタチオン、SOD) を低下させ、酸化ストレスを誘導することが報告されている (80,100,101)。さらに、アスコルビン酸などの抗酸化物質はスコポラミン誘発認知機能障害モデルの認知機能を部分的に改善する (102–104)。これらのことから、スコポラミンによる認知機能障害のメカニズムの一部に酸化ストレスの関与が考えられる。

脂質過酸化は酸化ストレスの一種であり、ROS の連鎖反応を引き起こす。脂

質は細胞膜の構成成分として、細胞膜の完全性を維持する作用があり、脂質の酸化は細胞膜の組成、構造、流動性を変化させる (105)。トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びドネペジルは、前章と同様に Y 字型迷路試験、受動回避試験におけるマウスの認知機能を改善した。さらに、スコポラミンは脳内における脂質過酸化を誘導した。一方、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びドネペジルは脂質過酸化の上昇を抑制した。ACh 受容体の一つである  $\alpha$ -7 ニコチン性 ACh 受容体 ( $\alpha$ 7nAChR) は受容体の活性化を介して、抗酸化経路の一つである Nrf2 経路を活性化し、抗酸化酵素 HO-1 を誘導することが知られている (106,107)。そのため、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びドネペジルは、 $\alpha$ 7nAChR を刺激し抗酸化酵素を誘導し、脂質過酸化を抑制している可能性が考えられる。

以上第二章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及びその含有成分は酸化ストレスによる細胞障害に対しても有効であり、認知機能障害の抑制メカニズムの一つとして酸化ストレスの軽減が関与することが明らかとなった。Huperzine A は AChE 阻害作用に加えて NMDA 受容体阻害作用も有することから、次章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の NMDA 受容体を介した認知機能に対する作用について検討した。

### 第3章 NMDA 受容体アンタゴニスト (MK-801) 誘発認知機能障害に対する トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の作用

#### 第1節 緒言

第1章及び第2章において、トウゲシバエタノール及び水抽出物のコリン作動性神経調節を介した認知機能障害改善作用を明らかにした。一方、NMDA 受容体阻害薬であるメマンチンが AD 治療薬として使用されているように、AD 病態ではグルタミン酸シグナル伝達の異常も関与している。グルタミン酸は、中枢神経系の中で最も豊富なアミノ酸の一種であり、神経伝達物質として学習、記憶の形成に重要な役割を果たす。しかしながら、過剰なグルタミン酸の存在下では興奮毒性による神経毒性作用を示すことも報告されている (108)。グルタミン酸は、イオンチャネル型グルタミン酸受容体を介して興奮性シナプス神経伝達を行い、イオンチャネル型グルタミン酸受容体には NMDA 受容体、 $\alpha$ -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソキサゾール (AMPA) 受容体、カイニン酸受容体の3種類が存在する (109)。過剰なグルタミン酸の存在下で引き起こされるシナプス機能障害、認知機能障害、興奮毒性は、 $\text{Ca}^{2+}$ への応答性が変化することが原因であると考えられている (110,111)。また、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の中でも、NMDA 受容体は  $\text{Ca}^{2+}$ の透過性が高いため、過剰なグルタミン酸による障害は主に NMDA 受容体を介していると考えられる (112)。

NMDA 受容体は、 $\text{Ca}^{2+}$ の透過性の高さに加え  $\text{Mg}^{2+}$ 遮断の除去による電位依存性活性化、遅いリガンド依存性動態などの特徴を有し、シナプスの機能と可塑性に必要な役割を果たす (113)。シナプス可塑性は長期増強 (long-term potentiation; LTP)、長期抑圧 (long-term depression; LTD) によるシナプス伝達効率の変化に起因し、これらの現象は、恐怖条件付け、匂い学習などの学習と相

関することが報告されている (114,115)。また、LTP は NMDA 受容体の発現を上昇させる一方、NMDA 受容体サブユニットの欠損マウスの LTP、学記記憶は低下することから (116,117)、NMDA 受容体は認知機能を調節する役割を有していると考えられる。

臨床的認知症尺度 (clinical dementia rating : CDR) において、MCI に相当する CDR0.5 の時点から脳脊髄液中グルタミン酸濃度が上昇していることが報告されている(118)。さらに、NMDA による神経伝達の障害や、NMDA 受容体サブユニットの減少が AD 患者において報告されている (119,120)。そのため、認知症予防においては、グルタミン酸シグナル伝達により認知機能に影響する NMDA 受容体に対するアプローチも有効であると考えられる。

MK-801 (dizocilpine) は非競合的 NMDA 受容体阻害薬であり、NMDA 受容体に高い親和性を有している。MK-801 により誘発される行動の変化は、認知症及び統合失調症に関連する認知機能障害のモデル動物として使用されている (121)。MK-801 などの高親和性 NMDA 受容体阻害薬は、神経細胞の保護作用を示す一方、グルタミン酸神経活動を過剰に抑制して LTP 及びシナプス可塑性を障害し、学習記憶形成を阻害することが知られている (122)。また、NMDA 受容体阻害による、グルタミン酸放出増強作用を有しており (123,124)、MK-801 はグルタミン酸シグナル伝達を乱すことで認知機能障害を誘発すると考えられている。

第 1 章ではトウゲシバアルカロイド画分 (AEF)、huperzine A の AChE 阻害作用に着目したが、huperzine A は AChE 阻害作用に加え、NMDA 受容体阻害作用を併せ持つことが報告されている (125,126)。Huperzine A はペンチレンテトラゾール、NMDA 誘発のてんかん発作、カイニン酸誘発のてんかん発作、認知機能障害を改善した報告 (127-129) はあるが、NMDA 受容体を介した認知機能

改善作用は報告されていない。また、第2章での検討から、抗酸化作用を有する化合物をより含有しているトウゲシバ水抽出物 (WHS) が、機能性素材として有用であると考えた。そこで、本章ではトウゲシバ水抽出物 (WHS) とその構成成分である huperzine A の MK-801 誘発認知機能障害に対する作用及び MK-801 によるグルタミン酸シグナル経路の変化に対する作用を検討することを目的とした。

## 第2節 実験材料及び方法

### 2-1 実験材料

本実験に用いた薬物及び試薬は、以下の通りである。

Huperzine A は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan)、Sample Buffer Solution (2ME+) (x4)、イムノスター®LD、デオキシコール酸ナトリウム (sodium deoxycholate)、ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate: SDS)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル [SDS polyacrylamide gel] Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は Nacalai Tesque、MK-801、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II、phosphatase inhibitor cocktail III、Igepal CA-630 は Sigma Aldrich (MO, USA) より購入した。Can get signal solution 1、Can get signal solution 2 は東洋紡 (Osaka, Japan)、Tween 20 Solution は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)、生理食塩液は Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd. (Tokyo, Japan)、塩化カリウム (potassium chloride: KCl)、1 mM Tris-HCl (pH 8.0)、リン酸水素二ナトリウム・12水和物 (disodium hydrogenphosphate 12-water:  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (sodium dihydrogenphosphate dehydrate:  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )、塩化ナトリウム (sodium chloride: NaCl) は Kishida Chemical (Osaka,

Japan)、L-glutamic acid は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) よりそれぞれ購入した。  
また、トウゲシバ水抽出物 (WHS) は、アピ株式会社より頂いた。

Phosphate buffered saline (PBS) は、KCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O  
を MilliQ に溶解し、調製した。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 実験動物

ICR マウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。マウス (雄性, 6 週  
齢) は設定温度: 23°C (許容範囲: 20 ~ 26°C)、設定湿度: 55% (許容範囲: 40 ~  
70%)、明暗各 12 時間 (照明: 午前 8:00 ~ 午後 8:00) に維持された岐阜薬科大  
学の動物飼育舎で飼育した。マウスはプラスチック製ケージ (縦 24.5 × 横  
17.5 × 高さ 12.5 cm) を用い、自由給水下に固形試料 (CE-2; CLEA Japan,  
Tokyo, Japan) にて飼育した。行動試験はすべて午前 9:00 から午後 6:00 の間に  
行った。すべての実験は岐阜薬科大学動物飼育・動物実験委員会に承認申請  
を行い、許可を受けた上で実施した。

### 2-2-2 ウェスタンブロット解析

#### 2-2-2-1 試料採取

マウスを断頭し、脳を摘出した。摘出した脳は、氷冷したガラスシャーレの  
上に置き、大脳皮質を切り分けた。組織は、マイクロチューブに入れ、液体窒  
素を用いて急速冷凍した。サンプルはタンパク質抽出時まで -80°C に保存し  
た。タンパク質抽出液には、RIPA buffer [50 mM Tris HCl (pH 8.0)、150 mM  
NaCl、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1% Igepal CA-630] 1 mL

に対し、protease inhibitor cocktail、phosphatase inhibitor cocktail II 及び III をそれぞれ 10  $\mu$ l ずつ混合して用いた。組織は上記のタンパク質抽出液を入れ、ホモジナイザー (Phycostron, Microtec Co., Chiba, Japan) を用いて 30 秒間ホモジナイズした。その後、30 分間氷中に静置させ、10,000 rpm、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質抽出液とした。

#### 2-2-2-2 タンパク質定量

タンパク質定量は BCA protein assay kit を用いて行った。標準曲線の作製のためのサンプルとして、0、12.5、25、50、125、250、500、750、1,000、1,500 及び 2,000  $\mu$ g/ mL の濃度に調製した bovine serum albumin (BSA) を用いた。

Working reagent を添加後、サンプルを 37°C のインキュベーター中で 30 分間反応させ、その後 Varioskan Flash (Thermo Scientific) を用いて 532 nm の吸光度で測定した。タンパク質濃度は、Sample Buffer Solution 及び RIPA buffer を用いて調製し、調製後のサンプルは -80°C に保存した。

#### 2-2-2-3 ウェスタンブロット

タンパク質濃度を調製したサンプルを -80°C から取り出し、氷上で融解させた後 100°C で 5 分間煮沸処理し、室温にて軽くスピンドウンした。SDS ポリアクリルアミドゲルを泳動装置にセットし、容器に泳動用緩衝液 (25 mM Tris、190 mM Glycine、3.5 mM SDS) を入れ、ゲルを取り付けた泳動装置に浸した。泳動装置の中にも泳動用緩衝液を入れた。1 ウェル当たりの添加量は、分子量マーカーを 3  $\mu$ l、各サンプルを 10  $\mu$ L (5  $\mu$ g) とした。サンプルを添加後、ゲル 1 枚当たり 20 mA にて泳動した。泳動後、ゲルを cathode buffer (25 mM Tris、40 mM 6-aminohexanoic acid、20% methanol) に 15 分間浸した。転写膜はメタノー

ルに 30 秒間浸し、超純水に浸した。その後、anode buffer 2 (25 mM Tris、20% methanol) に浸した。陽極側から、anode buffer 1 (0.3 M Tris、20% methanol) に浸したろ紙、anode buffer 2 に浸したろ紙、転写膜、ゲル、2 枚の cathode buffer に浸したろ紙の順に重ね、膜 1 枚当たり 100 mA で 45 分間転写した。転写後、0.05% Tween 20 含有 0.01 M TBS (0.05% Tween TBS) で洗浄し、Blocking -One P に浸して、それぞれ室温で 30 分ブロッキングした。その後再び 0.05% Tween TBS で洗浄し、Can get signal solution 1 で希釈した一次抗体に浸し、4°C で一晚静置させた。その後、転写膜は 0.05% Tween TBS で洗浄し、Can get signal solution 2 で希釈した二次抗体に浸し、室温で 1 時間静置させた。0.05% Tween TBS で洗浄した後、イムノスター® LD に 2 分間浸した。その後、L Amersham Imager 680 (Cytiva, Tokyo, Japan)を用いて検出した。

一次抗体には、rabbit anti-NR2A antibody [1: 1000 dilution; upstate (Dallas, Texas, USA)], rabbit anti-GluR1 antibody [1: 1000 Sigma Aldrich]、mouse anti-PKC $\alpha$  antibody [1: 1000 dilution; abcam (Dallas, Texas, USA)], rabbit anti- Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) antibody [1: 1000 Cell signaling technology]、rabbit anti- p44/42 MAPK (Erk1/2) antibody [1: 1000 Cell signaling technology]、mouse anti- $\beta$ -actin antibody (1: 5,000 dilution; Sigma-Aldrich) を用いた。二次抗体には、HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1: 1,000 dilution; Thermo Scientific)、HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1: 1000 dilution; Thermo Scientific) を用いた。

### 2-2-3 Y 字型迷路試験

メマンチン (5 mg/kg/day)、トウゲシバ水抽出物 (WHS) (300, 1000 mg/kg/day) または huperzine A (0.2, 0.7 mg/kg/day) を蒸留水に溶解し、1 日 1 回、10 mL/kg

で経口投与を行った。薬物投与 7 日目に短期記憶の評価として、Y 字型迷路試験を行った。手順は第 1 章 2-2-6 に従った。また、認知機能障害誘発は MK-801 (0.2 mg/kg, i.p.) の投与により行った。

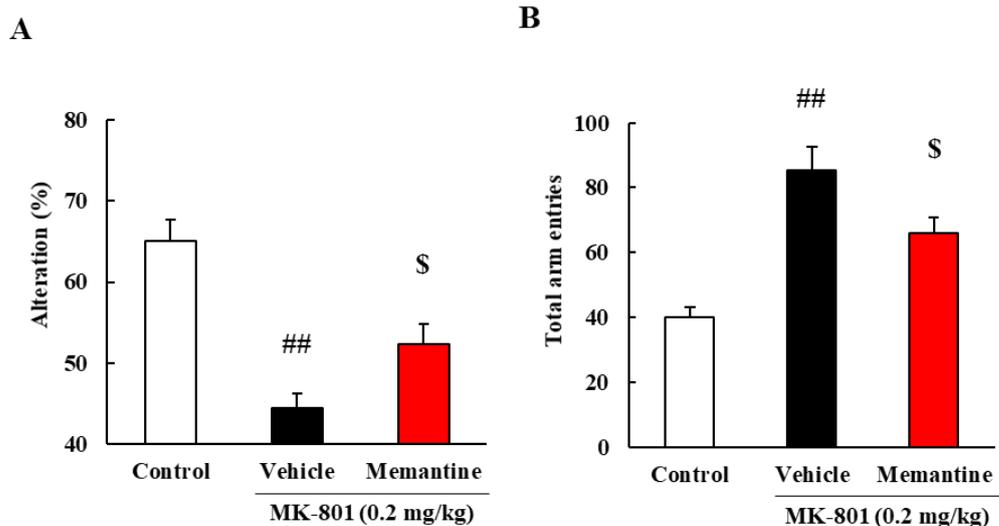
#### 2-2-4 統計学的解析

実験成績は平均値 ± 標準誤差で示した。統計学的な比較は、SPSS (IBM, Armonk, NY, USA) を用いて Student's *t*-test あるいは Dunett's test により行った。危険率が 5% 未満を有意差ありとした。

### 第3節 実験成績

#### 3-1 MK-801 誘発認知機能障害に対するメマンチンの作用

AD 治療薬として使用されているメマンチンは、MK-801 と同様に NMDA 受容体阻害剤であるが、正常なグルタミン酸神経伝達には作用せず過剰なグルタミン酸による認知機能低下を改善することが示唆されている。そこで、初めに MK-801 誘発認知機能障害に対するメマンチンの作用を検討した。MK-801 (0.2 mg/kg, i.p.) は、短期記憶及び作業記憶を評価する Y 字型迷路試験において、マウスの交替行動率を有意に減少させ、総アーム侵入数を有意に増加させた。メマンチン (5 mg/kg, p.o.) の投与により、マウスの交替行動率及び総アーム侵入数は有意に改善された。

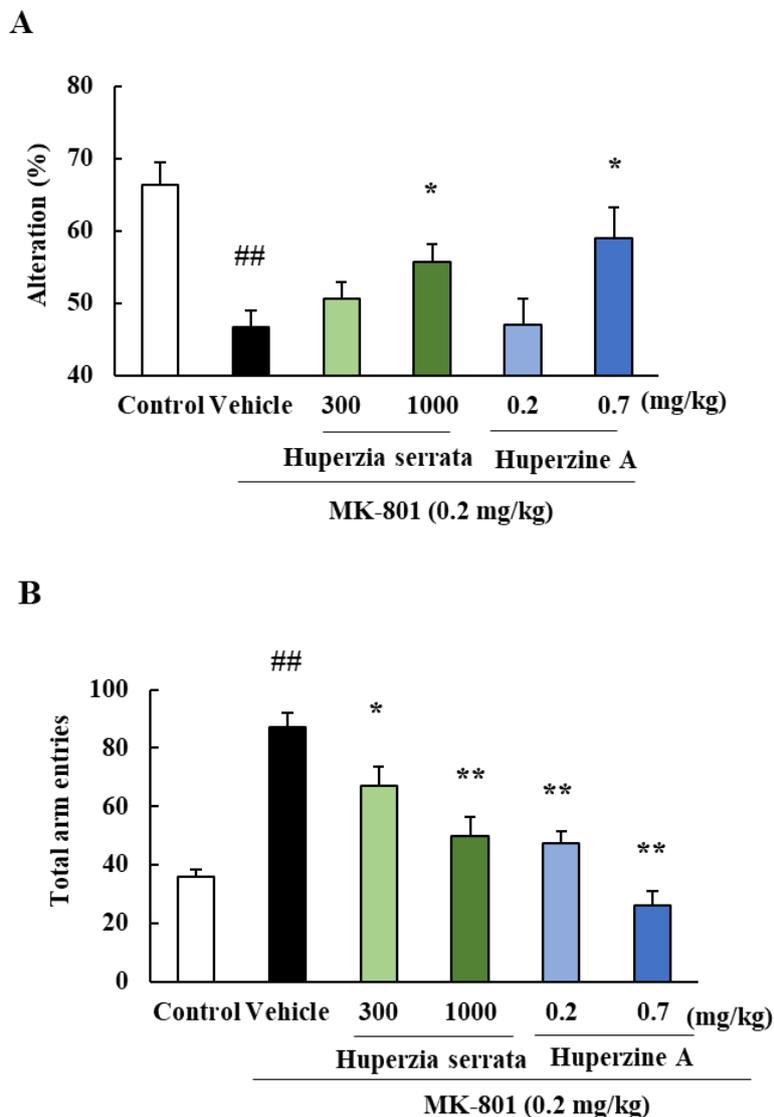


**Fig. 20** The effect of memantine on the short-term memory in MK-801 induced cognitive dysfunction mice using Y maze test.

Memantine (5 mg/kg/day) was administered orally once a day for 7 days. The effect of memantine to the short-term memory against MK-801-induced cognitive impairment mice. On day 7, the Y-maze test was performed. (A) Correct arm alteration, (B) Total arm entries in 8 minutes. ##;  $p < 0.01$  vs Control. \$;  $p < 0.05$  vs Vehicle (Student's *t*-test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n =7-11).

### 3-2 MK-801 誘発認知機能障害に対するトウゲシバ水抽出及び huperzine A の作用

メマンチンによる MK-801 誘発認知機能障害の改善が認められたため、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の NMDA 受容体阻害作用による認知機能障害改善作用を検討した。Fig. 20 と同様に、MK-801 は、短期記憶及び作業記憶を評価する Y 字型迷路試験において、マウスの交代行動率を有意に減少させ、総アーム侵入数を有意に増加させた。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (1000 mg/kg, p.o.) 及び huperzine A (0.7 mg/kg, p.o.) はマウスの交替行動率及び総アーム侵入数を有意に改善した (Fig. 21)。

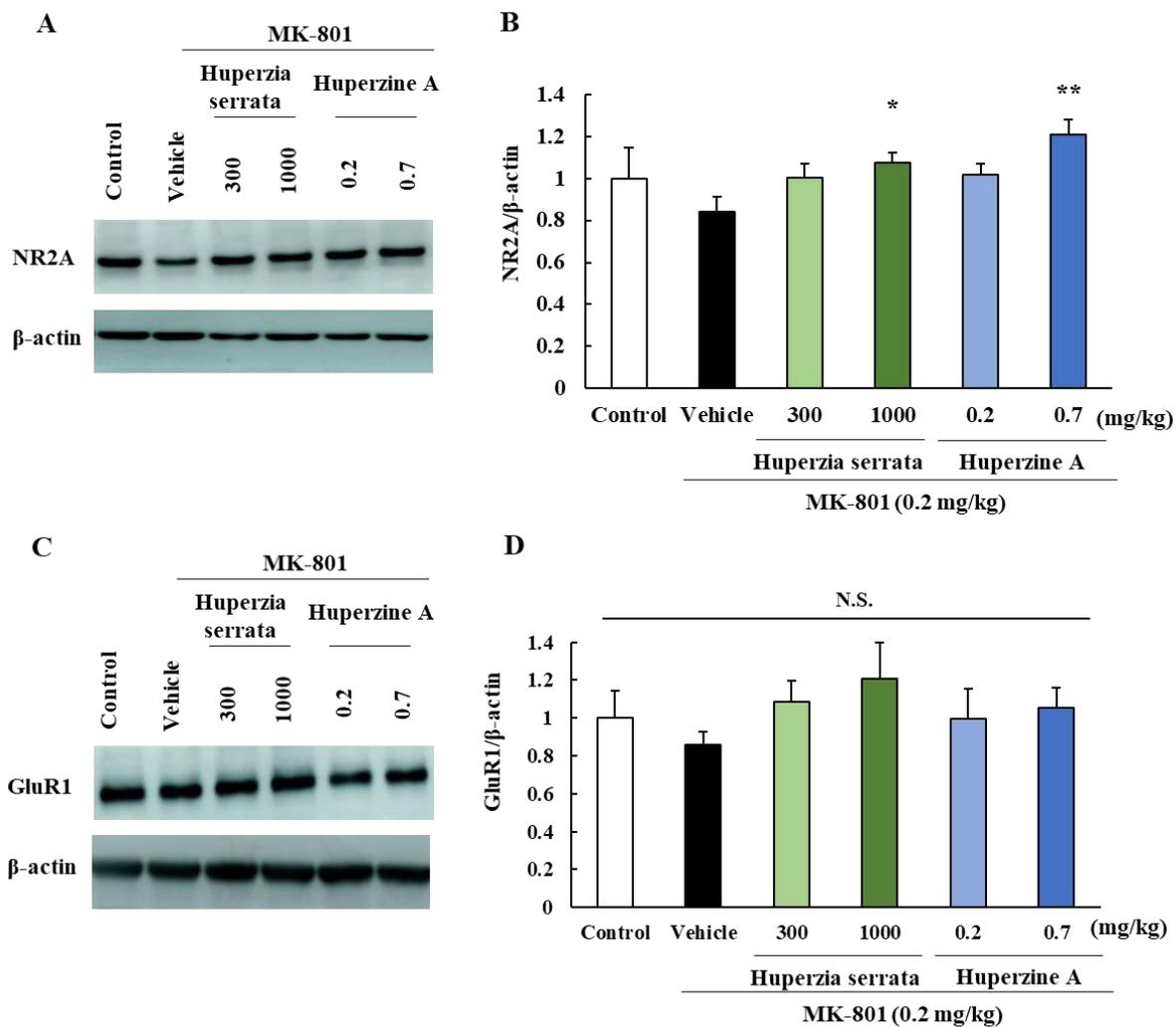


**Fig. 21** The effect of water extract of *Huperzia Serrata* on the short-term memory in MK-801 induced cognitive dysfunction mice using Y maze test.

Water extract of *Huperzia serrata* (300, 1000 mg/kg/day) or huperzine A (0.2, 0.7 mg/kg/day) was administered orally once a day for 7 days. The effect of water extract of *Huperzia Serrata* and huperzine A to the short-term memory against MK-801-induced cognitive impairment mice. On day 7, the Y-maze test was performed. (A) Correct arm alteration, (B) Total arm entries in 8 minutes. ##;  $p < 0.01$  vs. Control. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  vs Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 8-12$ ).

### 3-3 グルタミン酸受容体に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の作用

トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の NMDA 受容体阻害作用を介した認知機能障害改善作用は、グルタミン酸シグナル伝達経路の調節により認められたと考え、グルタミン酸シグナルに関するタンパク発現量を検討した。NMDA 受容体のサブユニットである NR2A の発現量は、MK-801 によりわずかな減少傾向が見られた。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (1000 mg/kg, p.o.) 及び huperzine A (0.7 mg/kg, p.o.) は、MK-801 投与マウスの NR2A 発現量を有意に上昇させた (Fig. 22 A, B)。一方、AMPA 受容体のサブユニットである GluR1 の発現量には影響を及ぼさなかった (Fig. 22C, D)。

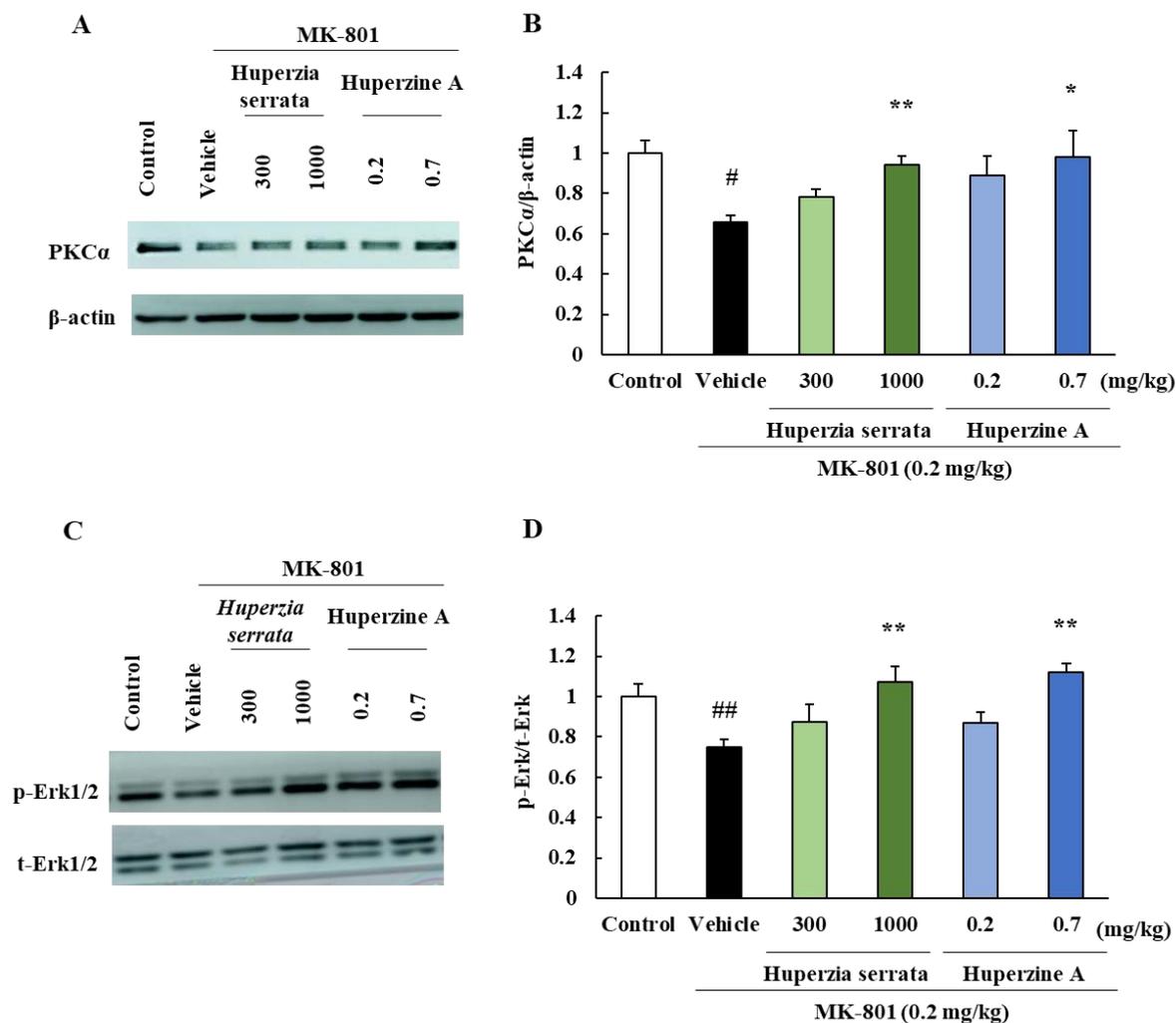


**Fig. 22.** The effects of water extract of *Huperzina serrata* and huperzine A on expression levels of glutaminergic receptors.

(A), (C) The expression levels of NR2A, GluR1 and  $\beta$ -actin were evaluated in the western blot analysis of mice cortex after behavioral test. The expression levels of (B) NR2A and (D) GluR 1 were expressed by normalizing against  $\beta$ -actin. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  vs Vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. (n = 4 - 6).

### 3-3 グルタミン酸シグナル伝達に対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の作用

グルタミン酸は  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を介して細胞内シグナルを活性化させることにより、シナプス可塑性を調節する。 $\text{Ca}^{2+}$  により活性化される経路の 1 つとして、プロテインキナーゼ C (Protein kinase C; PKC) – MAPK 経路が存在し、認知機能障害改善のメカニズムとして PKC-MAPK 経路に関するタンパク発現量を検討した。PKC ファミリーの 1 種である  $\text{PKC}\alpha$  の発現量及び MAPK に属する Extracellular Signal-regulated Kinase1/2 (ERK1/2) のリン酸化は、MK-801 により有意に減少した。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (1000 mg/kg, p.o.) 及び huperzine A (0.7 mg/kg, p.o.) は、 $\text{PKC}\alpha$  の発現量及び ERK1/2 リン酸化のタンパク質の発現減少を抑制した (Fig. 23)。



**Fig. 23. The effects of water extract of *Huperzia serrata* and huperzine A on expression levels of glutaminergic signaling.**

(A), (C) The expression levels of PKC $\alpha$ , pErk1/2, tErk1/2, and  $\beta$ -actin were evaluated in the western blot analysis of mice cortex after behavioral test. The expression levels of (B) PKC $\alpha$  were expressed by normalizing against  $\beta$ -actin. The phosphorylation levels of (D) ERK1/2, are also shown. <sup>#</sup>,  $p < 0.05$ ; <sup>##</sup>,  $p < 0.01$  vs Control (Student's *t*-test). <sup>\*</sup>,  $p < 0.05$ ; <sup>\*\*</sup>,  $p < 0.01$  vs vehicle (Dunnett's test). Each column and bar represent the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 4 - 6$ ).

#### 第4節 考察

本章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の NMDA 受容体を介した認知機能障害抑制作用を検討した。メマンチン及び MK-801 はともに非競合的 NMDA 受容体阻害薬であり、どちらの薬剤も虚血や酸化ストレスに対する神経保護作用が報告されている (130,131)。一方、正常なラットにそれぞれの薬剤を投与した場合、メマンチンは認知機能に影響を及ぼさないのに対し、MK-801 は認知機能障害を誘発する (132)。さらに、MK-801 がグルタミン酸放出増強作用を有しているため、AD におけるグルタミン酸過剰状態を反映したモデルとして、MK-801 誘発認知機能障害モデルを本章では使用した。MK-801 による認知機能障害は、AD 治療薬であるメマンチンの投与により改善された。メマンチンは MK-801 による NMDA 受容体電流を回復させる (133) ことから、メマンチンの認知機能障害抑制機構に  $\text{Ca}^{2+}$  の流入及びグルタミン酸シグナル伝達の正常化が寄与すると考えられる。また、グルタミン酸及びドパミンの過剰放出は活動量を増加させることが知られており (134,135)、MK-801 は Y 字型迷路試験におけるマウスの総アーム侵入数を増加させた。メマンチンと MK-801 は NMDA 受容体の結合部位が同一であることから、メマンチンは MK-801 による過剰グルタミン酸放出を抑制し、総アーム侵入数を減少させたと考えられる。これらの結果から、MK-801 はメマンチンなどの NMDA 受容体阻害薬による認知機能改善作用を検討する上で有用な動物モデルであると言える。

トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は、Y 字型迷路試験において、共に MK-801 誘発認知機能障害モデルマウスの認知機能を改善した。本章で用いたトウゲシバ水抽出物 (WHS) は、第 2 章で使用した抽出物と同様であり、抽出物中の huperzine A 含有率は約 0.07% である。そのためトウゲシバ水抽出物

(WHS) 1000 mg/kg 中の huperzine A は約 0.7 mg/kg に相当する。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (1000 mg/kg) 及び huperzine A (0.7 mg/kg) が同様に認知機能障害を改善したことから、トウゲシバ水抽出物 (WHS) の認知機能改善作用は主に huperzine A の作用によるものであると考えられる。また、メマンチンの結果と同様に、認知機能改善作用が認められたトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の投与量において、総アーム侵入数の減少が認められたことから、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の MK-801 誘発認知機能障害モデルに対する作用は NMDA 受容体阻害作用が関与していると推察できる。

Huperzine A は、AChE に対しては(-)-huperzine Aの方が強力な活性阻害作用を示すが、NMDA 受容体に対する阻害活性は両異性体間でほぼ同等であることが報告されている (125)。したがって、MK-801 誘発認知機能障害に対する(-)-huperzine A と(+)-huperzine A の改善作用に差はないと考えられる。さらに、抗酸化剤である *N*-acetylcysteine (NAC) は、老齢ラットの NMDA 受容体の機能低下改善作用及び MK-801 繰り返し投与による酸化ストレス及び細胞死抑制作用が報告されている (136,137)。本章では MK-801 を単回投与しているため、認知機能障害は主に NMDA 受容体の機能低下によるものであると考えられる。トウゲシバ水抽出物 (WHS) の caffeic acid 及び ferulic acid も、NAC と同様に NMDA 受容体の機能低下改善による MK-801 誘発認知機能障害抑制作用に関与している可能性がある。一方、トウゲシバ水抽出物 (WHS) (300 mg/kg, p.o.) 及び huperzine A (0.2 mg/kg, p.o.) は、認知機能を改善しなかったが、総アーム侵入数の減少が確認された。これは huperzine A の GABA 受容体に対する作用が関与している可能性が考えられる。quercetin は GABA 作動性神経伝達を減少させ、神経の興奮-抑制バランスを調節することで、MK-801 により誘発される過活動を低下させることが報告されている (138)。Huperzine A では、GABA 受容

体障害薬であるペンチレンテトラゾール誘発のけいれんを抑制する報告がある (128) ことから、huperzine A が GABA 作動性神経伝達の調節により、MK-801 誘発の過活動を減少させた可能性が考えられる。

NMDA 受容体を介したグルタミン酸神経伝達は、神経栄養因子などを介して神経可塑性を調節し、学習、記憶形成に関与する (125)。NMDA 受容体には NR1 サブユニット、NR2 サブユニットが存在し、NR2 サブユニットにはさらに NR2A、NR2B、NR2C、NR2D サブユニットに分類される。NR2A 欠損マウスは NMDA 刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  流入が減少し、NMDA 受容体の機能が低下することが示唆されている (139)。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (1000 mg/kg, p.o.) 及び huperzine A (0.7 mg/kg, p.o.) は MK-801 投与マウスの NR2A 発現量を上昇させたため、NMDA 受容体の機能を上昇させ、細胞内  $Ca^{2+}$  流入を改善した可能性が考えられる。また、MK-801 投与は NR2A の発現量に影響を及ぼさなかった。より高濃度 (1.0 mg/kg) の MK-801 では NR2A の発現量低下は報告されているが (140)、MK-801 (0.2 mg/kg) は NMDA 受容体サブユニットの発現量に影響せず、NMDA 受容体の機能を調節している可能性が考えられる。一方、AMPA 型受容体サブユニットの 1 つである GluR1 の発現量は変化しなかった。AMPA 受容体も  $Ca^{2+}$  を透過するが、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は NMDA 受容体を介した  $Ca^{2+}$  流入、シグナル伝達に関与していると考えられる。

グルタミン酸の NMDA 受容体への結合により、NMDA 受容体が開口し、細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が誘導される。細胞内に流入した  $Ca^{2+}$  はセカンドメッセンジャーとして働き、学習、記憶形成に重要な LTP を誘導する (141)。LTP 誘導の際に Erk1/2 がリン酸化され、Erk1/2 のリン酸化を抑制すると LTP の誘導が阻害される (142)。また、Erk 阻害剤により学習記憶の形成が阻害されることから

(143)、Erk のリン酸化はグルタミン酸シグナル伝達によるシナプス可塑性、認知機能に関与していると考えられる。PKC はタンパク質リン酸化酵素の 1 種であり、Ca<sup>2+</sup>により活性化される。海馬において、PKC は Ras/Raf/MEK/Erk 経路を介した Erk のリン酸化を調節することが知られている (144)。さらに、Erk と同様に PKC 阻害剤は LTP の誘導を阻害することから (145)、PKC-Erk 経路がグルタミン酸シグナル伝達による認知機能を調節していると考えられる。MK-801 投与により PKC $\alpha$  の発現量及び Erk1/2 のリン酸化が減少したことから、MK-801 誘発認知機能障害は PKC-Erk 経路の活性化が低下したことで誘導されたと考えられる。トウゲシバ水抽出物 (WHS) (1000 mg/kg, p.o.) 及び huperzine A (0.7 mg/kg, p.o.) は、MK-801 投与マウスの PKC $\alpha$  発現量及び Erk1/2 のリン酸化を上昇させたことから、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は NMDA 受容体の機能を上昇させ、細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入を改善した結果、PKC-Erk 経路の活性化を改善し、認知機能障害を抑制したと考えられる。

以上、第三章では、トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A が NMDA 受容体を介したグルタミン酸シグナル伝達経路を調節することによって、MK-801 誘発認知機能障害を抑制することを明らかにした。

## 総括及び結論

トウゲシバはヒゲノカズラ科に属するシダ植物であり、トウゲシバの含有成分の1つである **huperzine A** は認知機能に対する研究が数多く行われてきた。しかし、トウゲシバの機能性については不明であった。そこで、認知機能障害に対するトウゲシバの機能性を明らかにすることを目的として、アセチルコリン受容体アンタゴニスト (スコポラミン) 誘発認知機能障害モデルに対する作用を検討した。さらに、**huperzine A** 以外の機能性成分の関与を明らかにすることを目的として、酸化ストレスに対する各種成分の作用について調べた。また、トウゲシバ及び **huperzine A** の NMDA 受容体を介した認知機能に対する作用を明らかにするために、NMDA 受容体アンタゴニスト (MK-801) 誘発認知機能障害モデルを用いて検討した。

第1章では、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) を用いて、スコポラミン誘発認知機能障害モデルに対する作用を検討した。

- 1) トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及び **huperzine A** は、AChE 活性阻害作用を示した。
- 2) トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) 及び **huperzine A** は、BuChE 活性を阻害しなかった。
- 3) トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) は、スコポラミン誘発認知機能障害モデルの作業記憶及び恐怖記憶悪化を抑制した。
- 4) トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) は、スコポラミン誘発の活動量増加に対して影響を及ぼさなかった。

第 2 章では、huperzine A 以外の機能性成分の関与を検討するために、トウゲシバ水抽出物 (WHS) を用いて酸化ストレスに対する検討を行った。

- 1) トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び各成分 huperzine A、caffeic acid、ferulic acid は、A $\beta$  誘発細胞死を抑制した。
- 2) トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び caffeic acid は、酸化ストレス誘発細胞死を抑制した。
- 3) トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は、AChE 活性阻害作用を示した。
- 4) トウゲシバ水抽出物 (WHS) は、スコポラミン誘発認知機能障害モデルの作業記憶及び恐怖記憶悪化を抑制した。
- 5) トウゲシバ水抽出物 (WHS) は、スコポラミンによる脂質過酸化を抑制した。

第 3 章では、huperzine A で明らかとなっていた NMDA 受容体阻害作用に着目して、MK-801 誘発認知機能障害モデルに対するトウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A の作用を検討した。

- 1) トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は、MK-801 誘発認知機能障害モデルの作業記憶悪化を抑制した。
- 2) トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は、NMDA 受容体サブユニット NR2A の発現量を増加させた。
- 3) トウゲシバ水抽出物 (WHS) 及び huperzine A は、グルタミン酸シグナル伝達に参与するタンパク発現量の変化を抑制した。

本研究において、トウゲシバがコリン作動性神経に作用して認知機能障害を改善する可能性が示唆された。また、トウゲシバの認知機能改善作用に酸化ストレスの抑制が関与することが明らかとなった。さらに、トウゲシバが NMDA 受容体の機能を調節してグルタミン酸神経伝達及び認知機能障害を抑制する可能性が示唆された。

以上、トウゲシバは、既存の AD 治療薬ドネペジル及びメマンチンの有する作用機序である、AChE 活性阻害作用及び NMDA 受容体阻害作用両方の作用機序を有することを明らかにした。このことから、トウゲシバは認知症の予防治療に有効な機能性表示食品としての可能性を有しているのかもしれない。

## 謝辞

本稿を終えるに臨み、本研究の遂行にあたり終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室教授 原英彰博士に深甚なる謝意を表します。

本研究に際して終始御懇切なる御助言を賜りました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室准教授 嶋澤雅光博士、同講師 中村信介博士、岐阜薬科大学 バイオメディカルリサーチ寄附講座特任助教 大津航博士に深謝致します。また、御協力と御助言を頂きました岐阜薬科大学 生体機能解析学大講座 薬効解析学研究室諸氏に心から感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり有益なる御助言を賜りました岐阜薬科大学 機能分子学大講座 薬理学研究室教授 檜井栄一博士、岐阜薬科大学 機能分子学大講座 生薬学研究室教授 大山雅義博士並びに岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 薬物治療学研究室講師 栗田尚佳博士に心から感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、トウゲシバアルカロイド画分 (AEF) を提供頂きました岐阜薬科大学 機能分子学大講座 生薬学研究室教授 大山雅義博士、同准教授 阿部尚仁博士並びにトウゲシバ水抽出物 (WHS) を提供頂きましたアピ株式会社に心から感謝の意を表します。

本研究は、日本薬学会長井記念薬学研究奨励金及び戦略的基盤技術高度化支援事業 (サポイン事業) 7200005011503 の助成を受けたものです。

## 引用文献

1. 日本神経学会. (2017) 第1章 認知症全般: 疫学, 定義, 用語. 認知症疾患診療ガイドライン 2-17. [https://www.neurology-jp.org/guidelinem/deg1/deg1\\_2017\\_01.pdf](https://www.neurology-jp.org/guidelinem/deg1/deg1_2017_01.pdf) (2020年 8月20日)
2. WHO. (2018) Towards a dementia plan: a WHO guide. *World Heal. Organ.* <http://www.who.int/iris/handle/10665/272642> (2020年 8月20日)
3. 認知症施策の総合的な推進について (参考資料) 令和元年6月20日 厚生労働省老健局. <https://www.mhlw.go.jp/content/12300000/000519620.pdf> (2020年 8月20日)
4. 平成28年版高齢社会白書 (概要版). [https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2016/gaiyou/pdf/1s2s\\_3.pdf](https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2016/gaiyou/pdf/1s2s_3.pdf) (2020年 8月21日)
5. Duong, S., Patel, T., and Chang, F. (2017) Dementia: What pharmacists need to know. *Can. Pharm. J.* **150**, 118–129.
6. Whatmough, C. E. (2019) Dementia. *Handb. Med. Neuropsychol. Appl. Cogn. Neurosci. Second Ed.* **84**, 375–395.
7. Rønneberg, A., Nordgarden, H., Skaare, A. B., and Willumsen, T. (2019) The Editor recommends this issue's article to the reader. *Int. J. Paediatr. Dent.* **29**, 683.
8. Perry, E. K., Gibson, P. H., Blessed, G., Perry, R. H., and Tomlinson, B. E. (1977) Neurotransmitter enzyme abnormalities in senile dementia. Choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in necropsy brain tissue. *J. Neurol. Sci.* **34**, 247–265.
9. Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., and Delon, M. R. (1982) Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. **215**, 1237–9.
10. Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M., and Kameyama, M. (1986) Changes in Nicotinic and Muscarinic Cholinergic Receptors in Alzheimer-Type Dementia. *J. Neurochem.* **46**, 288–293.
11. Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., and Wilcock, G. K. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **66**, 137–147.
12. Simpson, K. H., Smith, R. J., and Davies, L. F. (1987) Comparison of the effects of atropine and glycopyrrolate on cognitive function following general anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* **59**, 966–969.
13. Beatty, W. W., Butters, N., and Janowsky, D. S. (1986) Patterns of memory failure after scopolamine treatment: Implications for cholinergic hypotheses of dementia. *Behav. Neural Biol.* **45**, 196–211.

14. Tsien, J. Z., Huerta, P. T., and Tonegawa, S. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**, 1327–1338.
15. Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., and Tsien, J. Z. (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*. **290**, 1170–1174.
16. Le, W. D., Colom, L. V., Xie, W. Jie, Smith, R. G., Alexianu, M., and Appel, S. H. (1995) Cell death induced by  $\beta$ -amyloid 1-40 in MES 23.5 hybrid clone: the role of nitric oxide and NMDA-gated channel activation leading to apoptosis. *Brain Res.* **686**, 49–60.
17. Danysz, W., and Parsons, C. G. (2003) The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatic and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: Preclinical evidence. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* **18**. S23-32
18. Kamino, K., Orr, H. T., Payami, H., Wijsman, E. M., Alonso, M. E., Pulst, S. M., Anderson, L., O'dahl, S., Nemens, E., White, J. A., Sadovnick, A. D., Ball, M. J., Kaye, J., Warren, A., McInnis, M., Antonarakis, S. E., Korenberg, J. R., Sharma, V., and Schellenberg, G. D. (1992) Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 998–1014.
19. Borchelt, D. R., and Thinakaran, G. (1996) Familial Alzheimer's Disease—Linked Presenilin 1 Variants Elevate A $\beta$ 1–42/1–40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron* **17**, 1005–1013.
20. Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* **8**, 595–608.
21. Holmes, C., Boche, D., Wilkinson, D., Yadegarfar, G., Hopkins, V., Bayer, A., Jones, R. W., Bullock, R., Love, S., Neal, J. W., Zotova, E., and Nicoll, J. A. (2008) Long-term effects of A $\beta$ 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet* **372**, 216–223.
22. Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Shaw, L. M., Aisen, P. S., Weiner, M. W., Petersen, R. C., and Trojanowski, J. Q. (2010) Hypothetical Pathological Cascade in Alzheimer's Disease. *Lancet Neurol.* **9**, 1–20.
23. Jack, C. R., Bernstein, M. A., Fox, N. C., Thompson, P., Alexander, G., Harvey, D., Borowski, B., Britson, P. J., Whitwell, J. L., Ward, C., Dale, A. M., Felmlee, J. P., Gunter, J. L., Hill, D. L. G., Killiany, R., Schuff, N., Fox-Bosetti, S., Lin, C., Studholme, C., DeCarli, C. S., Krueger, G., Ward, H. A., Metzger, G. J., Scott, K. T., Mallozzi, R., Blezek, D., Levy, J., Debbins, J. P., Fleisher, A. S.,

- Albert, M., Green, R., Bartzokis, G., Glover, G., Mugler, J., and Weiner, M. W. (2008) The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI): MRI methods. *J. Magn. Reson. Imaging* **27**, 685–691.
24. Kogure, D., Matsuda, H., Ohnishi, T., Asada, T., Masatake, U., Kunihiro, T., Nakano, S., and Takasaki, M. (2000) Longitudinal evaluation of early Alzheimer's disease using brain perfusion SPECT. *J. Nucl. Med.* **41**, 1155–1162.
25. Nordberg, A. (2004) PET imaging of amyloid in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **3**, 519–527.
26. Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Broich, K., Cavado, E., Crutch, S., Duyckaerts, C., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Gouw, A. A., Habert, M., Holtzman, D. M., Kivipelto, M., Lista, S., Rabinovici, G. D., Rowe, C., Salloway, S., Schneider, L. S., Sperling, R., Carrillo, M. C., Cummings, J., Jr, C. R. J., Campus, N., and Devine, M. (2016) Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement* **12**, 292–323.
27. Ferreira, A., Rodrigues, M., Fortuna, A., Falcão, A., and Alves, G. (2016) Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology. *Phytochem. Rev.* **15**, 51–85.
28. Cheng, D. H., Ren, H., and Tang, X. C. (1997) Huperzine A, a novel promising acetylcholinesterase inhibitor. *Neuroreport* **8**, 97–101.
29. Tang, X. C., and Han, Y. F. (1999) Pharmacological profile of huperzine A, a novel acetylcholinesterase inhibitor from Chinese herb. *CNS Drug Rev.* **5**, 281–300.
30. Ye, J. W., Cai, J. X., Wang, L. M., and Tang, X. C. (1999) Improving effects of huperzine A on spatial working memory in aged monkeys and young adult monkeys with experimental cognitive impairment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 814–819.
31. Jaswinder, K., Rajmeet, S., Gurinder, S., Harpreet, K., Jasvir, K., Manpreet, K., Parminder, S., and Jaspreet, K. (2016) A systematic review on *huperzia serrata*. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* **8**, 1250–1255.
32. Davis, K. L., Mohs, R. C., Marin, D., Purohit, D. P., Perl, D. P., Lantz, M., Austin, G., and Haroutunian, V. (1999) Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* **281**, 1401–1406.
33. Hasselmo, M. E. (2009) The Role of Acetylcholine in Learning and Memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 710–715.
34. Mufson, E. J., Counts, S. E., Perez, S. E., and Ginsberg, S. D. (2008) Cholinergic

- system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Expert Rev. Neurother* **8**, 1703–1718.
35. Kar, S., Slowikowski, S. P. M., Westaway, D., and Mount, H. T. J. (2004) Interactions between  $\beta$ -amyloid and central cholinergic neurons: Implications for Alzheimer's disease. *J. Psychiatry Neurosci.* **29**, 427–441.
  36. Klinkenberg, I., and Blokland, A. (2010) The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **34**, 1307–1350.
  37. Saraf, M. K., Prabhakar, S., Khanduja, K. L., and Anand, A. (2011) Bacopa monniera attenuates scopolamine-induced impairment of spatial memory in mice. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2011**. 236186
  38. Mahendra, J. (2019) Effect of Ginkgo Biloba extract against the behavioral changes induced by dementia in Wistar Rats. *IJMSCR* **2**, 293–299.
  39. Zhou, M. M., Xue, Y., Sun, S. H., Wen, M., Li, Z. J., Xu, J., Wang, J. F., Yanagita, T., Wang, Y. M., and Xue, C. H. (2016) Effects of different fatty acids composition of phosphatidylcholine on brain function of dementia mice induced by scopolamine. *Lipids Health Dis.* **15**, 1–10.
  40. Carlos, D. H., Bibiana Roselly, C. R., Angel, U. L., Laura, M. A., Kenya Karina, S. R., Jose Manuel, C. B., Alejandra, C. S., Gabriela, C. C. E., Estefanía, O. R., and Aracely, S. M. (2020) Cognitive improvements in a rat model with polyunsaturated fatty acids EPA and DHA through  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors. *Nutr. Neurosci.* **0**, 1–10.
  41. Tewari, D., Stankiewicz, A. M., Mocan, A., Sah, A. N., Tzvetkov, N. T., Huminiecki, L., Horbanczuk, J. O., and Atanasov, A. G. (2018) Ethnopharmacological approaches for dementia therapy and significance of natural products and herbal drugs. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 1–24.
  42. Barak, D., Ordentlich, A., Stein, D., Yu, Q., Greig, N. H., and Shafferman, A. (2009) Accommodation of physostigmine and its analogs by acetylcholinesterase is dominated by hydrophobic interactions. *Biochem. J.* **417**, 213–222.
  43. Dall'Acqua, S. (2013) Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. *Bot. Targets Ther.* **3**, 19–28.
  44. Ou, L. Y., Tang, X. C., and Cai, J. X. (2001) Effect of huperzine A on working memory in reserpine- or yohimbine-treated monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* **433**, 151–156.
  45. Wang, Z. F., Wang, J., Zhang, H. Y., and Tang, X. C. (2008) Huperzine A exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of transient

- focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* **106**, 1594–1603.
46. Wang, H. ying, Wu, M., Diao, J. ling, Li, J. bin, Sun, Y. xiang, and Xiao, X. qiu. (2020) Huperzine A ameliorates obesity-related cognitive performance impairments involving neuronal insulin signaling pathway in mice. *Acta Pharmacol. Sin.* **41**, 145–153.
  47. Konrath, E. L., Neves, B. M., Passos, C. D. S., Lunardi, P. S., Ortega, M. G., Cabrera, J. L., Gonçalves, C. A., and Henriques, A. T. (2012) Huperzia quadrifariata and Huperzia reflexa alkaloids inhibit acetylcholinesterase activity in vivo in mice brain. *Phytomedicine* **19**, 1321–1324.
  48. Tung, B. T., Hai, N. T., and Thu, D. K. (2017) Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of Huperzia squarrosa (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *J. Ethnopharmacol.* **198**, 24–32.
  49. Ma, X., Tan, C., Zhu, D., Gang, D. R., and Xiao, P. (2007) Huperzine A from Huperzia species-An ethnopharmacological review. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 15–34.
  50. Szypuła, W., Kiss, A., Pietrosiuk, A., Świst, M., Danikiewicz, W., and Olszowska, O. (2011) Determination of huperzine a in Huperzia selago plants from wild population and obtained in in vitro culture by high-performance liquid chromatography using a chaotropic mobile phase. *Acta Chromatogr.* **23**, 339–352.
  51. Myers, T. M., Sun, W., Saxena, A., Doctor, B. P., Bonvillain, A. J., and Clark, M. G. (2010) Systemic administration of the potential countermeasure huperzine reversibly inhibits central and peripheral acetylcholinesterase activity without adverse cognitive-behavioral effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **94**, 477–481.
  52. Kasa, P., Papp, H., Kasa, P., and Torok, I. (2000) Donepezil dose-dependently inhibits acetylcholinesterase activity in various areas and in the presynaptic cholinergic and the postsynaptic cholinergic enzyme-positive structures in the human and rat brain. *Neuroscience* **101**, 89–100.
  53. Saxena, A., Doctor, B. P., Qian, N., Kovach, I. M., Kozikowski, A. P., Pang, Y. P., Vellom, D. C., Radic, Z., Quinn, D., and Taylor, P. (1994) Identification of amino acid residues involved in the binding of Huperzine A to cholinesterases. *Protein Sci.* **3**, 1770–1778.
  54. Mandillo, S., Tucci, V., Hölter, S. M., Meziante, H., Al Banhaabouchi, M., Kallnik, M., Lad, H. V., Nolan, P. M., Ouagazzal, A. M., Coghill, E. L., Gale, K., Golini, E., Jacquot, S., Krezel, W., Parker, A., Riet, F., Schneider, I.,

- Marazziti, D., Auwerx, J., Brown, S. D. M., Chambon, P., Rosenthal, N., Tocchini-Valentini, G., and Wurst, W. (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: A cross-laboratory study. *Physiol. Genomics* **34**, 243–255.
55. Kumar, H., Kim, B. W., Song, S. Y., Kim, J. S., Kim, I. S., Kwon, Y. S., Koppula, S., and Choi, D. K. (2012) Cognitive enhancing effects of alpha asarone in amnesic mice by influencing cholinergic and antioxidant defense mechanisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1518–1522.
56. Oike, Y. (1999) Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein-Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 387–396.
57. Pan, S. Y., Yu, Z. L., Xiang, C. J., Dong, H., Fang, H. Y., and Ko, K. M. (2009) Comparison studies of tacrine and bis(7)-tacrine on the suppression of scopolamine-induced behavioral changes and inhibition of acetylcholinesterase in mice. *Pharmacology* **83**, 294–300.
58. Shannon, H. E., and Peters, S. C. (1990) A comparison of the effects of cholinergic and dopaminergic agents on scopolamine-induced hyperactivity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**, 549–553.
59. Ukai, M., Kobayashi, T., and Kameyama, T. (1994) Characterization of the effects of scopolamine on the habituation of exploratory activity: differential effects of oxotremorine and physostigmine. *Gen. Pharmacol.* **25**, 433–438.
60. Hornick, A., Schwaiger, S., Rollinger, J. M., Vo, N. P., Prast, H., and Stuppner, H. (2008) Extracts and constituents of *Leontopodium alpinum* enhance cholinergic transmission: Brain ACh increasing and memory improving properties. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 236–248.
61. Albergaria, C., Silva, N. T., Pritchett, D. L., and Carey, M. R. (2018) Locomotor activity modulates associative learning in mouse cerebellum. *Nat. Neurosci.* **21**, 725–735.
62. Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., and Yoon, S. (2015) The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp. Neurobiol.* **24**, 325–340.
63. Patten, D. A., Germain, M., Kelly, M. A., and Slack, R. S. (2010) Reactive oxygen species: Stuck in the middle of neurodegeneration. *J. Alzheimer's Dis.* **20**. S357-67
64. Sayre, L., Smith, M., and Perry, G. (2012) Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease. *Curr. Med. Chem.* **8**, 721–738.
65. Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A., and Perry, G. (2007) Causes of

- oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2202–2210.
66. Maes, O. C., Chertkow, H. M., Wang, E., and Schipper, H. M. (2011) Stress Gene Deregulation in Alzheimer Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Stud. Exp. Model.* 251–263.
67. Shelat, P. B., Chalimoniuk, M., Wang, J. H., Strosznajder, J. B., Lee, J. C., Sun, A. Y., Simonyi, A., and Sun, G. Y. (2008) Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A2 in cortical neurons. *J. Neurochem.* **106**, 45–55.
68. Kadowaki, H., Nishitoh, H., Urano, F., Sadamitsu, C., Matsuzawa, A., Takeda, K., Masutani, H., Yodoi, J., Urano, Y., Nagano, T., and Ichijo, H. (2005) Amyloid  $\beta$  induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ.* **12**, 19–24.
69. Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., Hori, O., Hibino, S., Choshi, T., Nakahata, T., Hioki, H., Kaneko, T., Naitoh, M., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Hata, R., Ueno, S. I., Seki, T., Kobayashi, K., Toda, T., Murakami, K., Irie, K., Klein, W. L., Mori, H., Asada, T., Takahashi, R., Iwata, N., Yamanaka, S., and Inoue, H. (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**, 487–496.
70. Keller, J. N., Schmitt, F. A., Scheff, S. W., Ding, Q., Chen, Q., Butterfield, D. A., and Markesbery, W. R. (2005) Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* **64**, 1152–1156.
71. Praticò, D., Clark, C. M., Liun, F., Lee, V. Y. M., and Trojanowski, J. Q. (2002) Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment: A possible predictor of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **59**, 972–976.
72. Behll, C., Davisi, J., Cole, G. M., and Schubert, D. (1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid  $\beta$ protein toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 944–950.
73. Conte, V., Uryu, K., Fujimoto, S., Yao, Y., Rokach, J., Longhi, L., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., McIntosh, T. K., and Praticò, D. (2004) Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. *J. Neurochem.* **90**, 758–764.
74. Reddy, P. H., Manczak, M., Yin, X., Grady, M. C., Mitchell, A., Kandimalla, R.,

- and Kuruva, C. S. (2016) Protective effects of a natural product, curcumin, against amyloid  $\beta$  induced mitochondrial and synaptic toxicities in Alzheimer's disease. *J. Investig. Med.* **64**, 1220–1234.
75. Zhang, L., Fang, Y., Xu, Y., Lian, Y., Xie, N., Wu, T., Zhang, H., Sun, L., Zhang, R., and Wang, Z. (2015) Curcumin improves amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) induced spatial memory deficits through BDNF-ERK signaling pathway. *PLoS One* **10**, e0131525.
  76. Feng, X., Liang, N., Zhu, D., Gao, Q., Peng, L., Dong, H., Yue, Q., Liu, H., Bao, L., Zhang, J., Hao, J., Gao, Y., Yu, X., and Sun, J. (2013) Resveratrol Inhibits  $\beta$ -Amyloid-Induced Neuronal Apoptosis through Regulation of SIRT1-ROCK1 Signaling Pathway. *PLoS One* **8**, e59888.
  77. Chen, Y., Shi, G. W., Liang, Z. M., Sheng, S. Y., Shi, Y. S., Peng, L., Wang, Y. P., Wang, F., and Zhang, X. M. (2019) Resveratrol improves cognition and decreases amyloid plaque formation in Tg6799 mice. *Mol. Med. Rep.* **49**, 3783–3790.
  78. Bastianetto, S., Ramassamy, C., Doré, S., Christen, Y., Poirier, J., and Quirion, R. (2000) The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by  $\beta$ -amyloid. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1882–1890.
  79. Tadokoro, K., Morihara, R., Ohta, Y., Hishikawa, N., Kawano, S., Sasaki, R., Matsumoto, N., Nomura, E., Nakano, Y., Takahashi, Y., Takemoto, M., Yamashita, T., Ueno, S., Wakutani, Y., Takao, Y., Morimoto, N., Kutoku, Y., Sunada, Y., Taomoto, K., Manabe, Y., Deguchi, K., Higashi, Y., Inufusa, H., You, F., Yoshikawa, T., Greiffenclau, M. M. von, and Abe, K. (2019) Clinical Benefits of Antioxidative Supplement Twendee X for Mild Cognitive Impairment: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, and Placebo-Controlled Prospective Interventional Study. *J. Alzheimer's Dis.* **71**, 1063–1069.
  80. El-Sherbiny, D. A., Khalifa, A. E., Attia, A. S., and Eldenshary, E. E. D. S. (2003) Hypericum perforatum extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **76**, 525–533.
  81. Kim, J., Yang, Y., Song, S. S., Na, J. H., Oh, K. J., Jeong, C., Yu, Y. G., and Shin, Y. K. (2014) Beta-amyloid oligomers activate apoptotic BAK pore for cytochrome c release. *Biophys. J.* **107**, 1601–1608.
  82. Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P., Kaye, R., Glabe, C. G., Frautschy, S. A., and Cole, G. M. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid  $\beta$  oligomers and

- fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**, 5892–5901.
83. Lei, Y., Yang, L., Ye, C. Y., Qin, M. Y., Yang, H. Y., Jiang, H. L., Tang, X. C., and Zhang, H. Y. (2015) Involvement of intracellular and mitochondrial A $\beta$  in the ameliorative effects of huperzine A against oligomeric A $\beta$ 42-induced injury in primary rat neurons. *PLoS One* **10**, e0128366.
  84. Chang, W., Huang, D., Lo, Y. M., Tee, Q., Kuo, P., Wu, J. S., Huang, W., and Shen, S. (2019) Protective effect of caffeic acid against alzheimer's disease pathogenesis via modulating cerebral insulin signaling,  $\beta$ -Amyloid Accumulation, and Synaptic Plasticity in Hyperinsulinemic Rats. *J. Agric. Food Chem.* **67**, 7684–7693.
  85. Sgarbossa, A., Giacomazza, D., and Di Carlo, M. (2015) Ferulic acid: A hope for Alzheimer's disease therapy from plants. *Nutrients* **7**, 5764–5782.
  86. Srivastava, S., Singh, A. P., and Singh Rawat, A. K. (2012) A HPTLC method for the identification of ferulic acid from *Lycopodium clavatum*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**, S12–S14.
  87. Medina, S., Martínez, M., and Hernanz, A. (2002) Antioxidants inhibit the human cortical neuron apoptosis induced by hydrogen peroxide, tumor necrosis factor alpha, dopamine and beta-amyloid peptide 1-42. *Free Radic. Res.* **36**, 1179–1184.
  88. Yoshino, Y., Ishisaka, M., Umigai, N., Shimazawa, M., Tsuruma, K., and Hara, H. (2014) Crocetin Prevents Amyloid  $\beta$ 1-42-Induced Cell Death in Murine Hippocampal Cells. *Pharmacol. & Pharm.* **05**, 37–42.
  89. Lewerenz, J., Klein, M., and Methner, A. (2006) Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc<sup>-</sup> protects from oxidative glutamate toxicity. *J. Neurochem.* **98**, 916–925.
  90. Othman, S. Ben, and Yabe, T. (2015) Use of Hydrogen Peroxide and Peroxyl Radicals To Induce Oxidative Stress in Neuronal Cells. *Rev. Agric. Sci.* **3**, 40–45.
  91. Wang, F., Zhao, S., Li, F., Zhang, B., Qu, Y., Sun, T., Luo, T., and Li, D. (2014) Investigation of antioxidant interactions between radix *Astragali* and *Cimicifuga foetida* and identification of synergistic antioxidant compounds. *PLoS One* **9**, e87221.
  92. Chen, J. H., and Ho, C. T. (1997) Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2374–2378.
  93. Kim, H. K., Kim, M., Kim, S., Kim, M., and Chung, J. H. (2004) Effects of green

- tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1977–1979.
94. Jung, M., and Park, M. (2007) Acetylcholinesterase inhibition by flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules* **12**, 2130–2139.
  95. Khan, H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W. S., and Akkol, E. K. (2020) Neuroprotective effects of quercetin in alzheimer’s disease. *Biomolecules* **10**, 59.
  96. Anwar, J., Spanevello, R. M., Thomé, G., Stefanello, N., Schmatz, R., Gutierrez, J., Vieira, J., Baldissarelli, J., Carvalho, F. B., Da Rosa, M. M., Rubin, M. A., Fiorenza, A., Morsch, V. M., and Schetinger, M. R. C. (2012) Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **103**, 386–394.
  97. Vladimir-Knezevic, S., Blazekovic, B., Kindl, M., Vladic, J., Lower-Nedza, A. D., and Brantner, A. H. (2014) Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the lamiaceae family. *Molecules* **19**, 767–782.
  98. Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Hua, L., Han, B., Zhang, Y., Yang, X., Zeng, Z., Bai, H., Yin, H., and Lou, J. (2016) Effects of caffeic acid on learning deficits in a model of Alzheimer’s disease. *Int. J. Mol. Med.* **38**, 869–875.
  99. Andriambelison, E., Huyard, B., Poiraud, E., and Wagner, S. (2014) Methyllycaconitine- and scopolamine-induced cognitive dysfunction: differential reversal effect by cognition-enhancing drugs. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2**, 1–8.
  100. Budzynska, B., Boguszewska-Czubar, A., Kruk-Slomka, M., Skalicka-Wozniak, K., Michalak, A., Musik, I., and Biala, G. (2015) Effects of imperatorin on scopolamine-induced cognitive impairment and oxidative stress in mice. *Psychopharmacology* **232**, 931–942.
  101. Muhammad, T., Ali, T., Ikram, M., Khan, A., Alam, S. I., and Kim, M. O. (2019) Melatonin Rescue Oxidative Stress-Mediated Neuroinflammation/Neurodegeneration and Memory Impairment in Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model. *J. Neuroimmune Pharmacol.* **14**, 278–294.
  102. Harrison, F. E., Hosseini, A. H., Dawes, S. M., Weaver, S., and May, J. M. (2009) Ascorbic acid attenuates scopolamine-induced spatial learning deficits in the water maze. *Behav. Brain Res.* **205**, 550–558.
  103. Sui, Y., Xiao, J., Li, S., Li, X., Xie, B., and Sun, Z. (2015) Combination of Procyanidins Extracted from Lotus Seedpod and *N*-acetyl Cysteine Ameliorates Scopolamine-induced Memory Impairment in Mice. *J. Food Nutr. Res.* **3**, 464–470.

104. Kwon, S. H., Lee, H. K., Kim, J. A., Hong, S. I., Kim, H. C., Jo, T. H., Park, Y. I., Lee, C. K., Kim, Y. Bin, Lee, S. Y., and Jang, C. G. (2010) Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **649**, 210–217.
105. Gaschler, M. M., and Stockwell, B. R. (2017) Lipid peroxidation in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 419–425.
106. Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., León, R., and Lopez, M. G. (2015) Anti-inflammatory role of microglial alpha7 nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem. Pharmacol.* **97**, 463–472.
107. Navarro, E., Buendia, I., Parada, E., León, R., Jansen-Duerr, P., Pircher, H., Egea, J., and Lopez, M. G. (2015) Alpha7 nicotinic receptor activation protects against oxidative stress via heme-oxygenase i induction. *Biochem. Pharmacol.* **97**, 473–481.
108. McEntee, W. J., and Crook, T. H. (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)*. **111**, 391–401.
109. Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., and Dingledine, R. (2010) Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* **62**, 405–496.
110. Mota, S. I., Ferreira, I. L., and Rego, A. C. (2014) Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease - A focus on NMDA receptors. *Neuropharmacology* **76**, 16–26.
111. Tymianski, M., Charlton, M. P., Carlen, P. L., and Tator, C. H. (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* **13**, 2085–2104.
112. Wang, R., and Reddy, H. (2017) Role of Glutamate and NMDA in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's disease* **57**, 1041–1048.
113. Collingridge, G. L., and Singer, W. (1990) Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 290–296.
114. Rogan, M. T., Staubli, U. V., and LeDoux, J. E. (1997) Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature* **390**, 604–607.
115. Roman, F. S., Chaillan, F. A., and Soumireu-Mourat, B. (1993) Long-term potentiation in rat piriform cortex following discrimination learning. *Brain Res.* **601**, 265–272.
116. Grosshans, D. R., Clayton, D. A., Coultrap, S. J., and Browning, M. D. (2002)

- LTP leads to rapid surface expression of NMDA but not AMPA receptors in adult rat CA1. *Nat. Neurosci.* **5**, 27–33.
117. Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., and Mishina, M. (1995) Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor  $\epsilon 1$  subunit. *Nature* **373**, 151–155.
  118. Reis, T., Laks, J., Panizzutti, R., and Ferreira, S. T. (2018) Elevated glutamate and glutamine levels in the cerebrospinal fluid of patients with probable Alzheimer's disease and depression caroline madeira, charles vargas-lopes, I Carlos Otávio Brandão2,6<. *Front. Psychiatry* **9**, 1–8.
  119. Lin, C.-H., Huang, Y.-J., Lin, C.-J., Lane, H.-Y., and Tsai, G. (2014) NMDA Neurotransmission Dysfunction in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 5169–5179.
  120. Bi, H., and Sze, C. I. (2002) N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A and NR2B messenger RNA levels are altered in the hippocampus and entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **200**, 11–18.
  121. van der Staay, F. J., Rutten, K., Erb, C., and Blokland, A. (2011) Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav. Brain Res.* **220**, 215–229.
  122. Parsons, C. G., Danysz, W., and Quack, G. (1999) Memantine is a clinically well tolerated. *Pharmacol. Res.* **38**, 735–767.
  123. López-Gil, X., Babot, Z., Amargós-Bosch, M., Suñol, C., Artigas, F., and Adell, A. (2007) Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* **32**, 2087–2097.
  124. Roenker, N. L., Gudelsky, G., Ahlbrand, R., Bronson, S. L., Kern, J. R., Waterman, H., and Richtand, N. M. (2011) Effect of paliperidone and risperidone on extracellular glutamate in the prefrontal cortex of rats exposed to prenatal immune activation or MK-801. *Neurosci. Lett.* **500**, 167–171.
  125. Zhang, Y. H., Chen, X. Q., Yang, H. H., Jin, G. Y., Bai, D. L., and Hu, G. Y. (2000) Similar potency of the enantiomers of huperzine A in inhibition of [3H]dizocilpine (MK-801) binding in rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **295**, 116–118.
  126. Gordon, R. K., Nigam, S. V., Weitz, J. A., Dave, J. R., Doctor, B. P., and Ved, H. S. (2001) The NMDA receptor ion channel: a site for binding of Huperzine A. *J. Appl. Toxicol.* **21 Suppl 1**, S47–S51.

127. Coleman, B. R., Ratcliffe, R. H., Oguntayo, S. A., Shi, X., Doctor, B. P., Gordon, R. K., and Nambiar, M. P. (2008) [+-]-Huperzine A treatment protects against N-methyl-d-aspartate-induced seizure/status epilepticus in rats. *Chem. Biol. Interact.* **175**, 387–395.
128. Gersner, R., Ekstein, D., Dhamne, S. C., Schachter, S. C., and Rotenberg, A. (2015) Huperzine A prophylaxis against pentylenetetrazole-induced seizures in rats is associated with increased cortical inhibition. *Epilepsy Res.* **117**, 97–103.
129. Mohseni-Moghaddam, P., Sadr, S. S., Roghani, M., Arabzadeh, S., Khamse, S., Zamani, E., Hosseini, M., and Moradi, F. (2019) Huperzine A ameliorates cognitive dysfunction and neuroinflammation in kainic acid-induced epileptic rats by antioxidant activity and NLRP3/caspase-1 pathway inhibition. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **46**, 360–372.
130. Görgülü, A., KInş, T., Çobanoğlu, S., Ünal, F., I zgi, N., Yanik, B., and Küçük, M. (2000) Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir.* **142**, 1287–1292.
131. De Felice, F. G., Velasco, P. T., Lambert, M. P., Viola, K., Fernandez, S. J., Ferreira, S. T., and Klein, W. L. (2007) A $\beta$  oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J. Biol. Chem.* **282**, 11590–11601.
132. Zajackowski, W., Quack, G., and Danysz, W. (1996) Infusion of ( + )-MK-801 and memantine - Contrasting effects on radial maze learning in rats with entorhinal cortex lesion. *Eur. J. Pharmacol.* **296**, 239–246.
133. Sean, M., Bengtson, C. P., Bading, H., Wyllie, D. J. A., and Hardingham, G. E. (2013) Recovery of NMDA receptor currents from MK-801 blockade is accelerated by Mg<sup>2+</sup> and memantine under conditions of agonist exposure. *Neuropharmacology* **74**, 119–125.
134. Pietraszek, M., Michaluk, J., Romańska, I., Wąsik, A., Golembiowska, K., and Antkiewicz-Michaluk, L. (2009) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline antagonizes a rise in brain dopamine metabolism, glutamate release in frontal cortex and locomotor hyperactivity produced by mk-801 but not the disruptions of prepulse inhibition, and impairment of working memory in. *Neurotox. Res.* **16**, 390–407.
135. Adams, B., and Moghaddam, B. (1998) Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J. Neurosci.* **18**, 5545–5554.
136. Haxaire, C., Turpin, F. R., Potier, B., Kervern, M., Sinet, P. M., Barbanel, G.,

- Mothet, J. P., Dutar, P., and Billard, J. M. (2012) Reversal of age-related oxidative stress prevents hippocampal synaptic plasticity deficits by protecting d-serine-dependent NMDA receptor activation. *Aging Cell* **11**, 336–344.
137. Turkmen, R., Akosman, M. S., and Demirel, H. H. (2019) Protective effect of N-acetylcysteine on MK-801-induced testicular oxidative stress in mice. *Biomed. Pharmacother.* **109**, 1988–1993.
138. Fan, H. R., Du, W. F., Zhu, T., Wu, Y. J., Liu, Y. M., Wang, Q., Wang, Q., Gu, X., Shan, X., Deng, S., Zhu, T., Xu, T. Le, Ge, W. H., Li, W. G., and Li, F. (2018) Quercetin Reduces Cortical GABAergic Transmission and Alleviates MK-801-Induced Hyperactivity. *EBioMedicine* **34**, 201–213.
139. Miyamoto, Y., Yamada, K., Noda, Y., Mori, H., Mishina, M., and Nabeshima, T. (2001) Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor  $\epsilon 1$  subunit. *J. Neurosci.* **21**, 750–757.
140. Xi, D., Zhang, W., Wang, H. X., Stradtman, G. G., and Gao, W. J. (2009) Dizocilpine (MK-801) induces distinct changes of N-methyl-d-aspartic acid receptor subunits in parvalbumin-containing interneurons in young adult rat prefrontal cortex. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **12**, 1395–1408.
141. Wang, H., and Peng, R. Y. (2016) Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil. Med. Res.* **3**, 1–7.
142. Schmitt, J. M., Guire, E. S., Saneyoshi, T., and Soderling, T. R. (2005) Calmodulin-dependent kinase kinase/calmodulin kinase I activity gates extracellular-regulated kinase-dependent long-term potentiation. *J. Neurosci.* **25**, 1281–1290.
143. Govindarajan, A., Kelleher, R. J., and Tonegawa, S. (2006) A clustered plasticity model of long-term memory engrams. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 575–583.
144. Roberson, E. D., English, J. D., Adams, J. P., Selcher, J. C., Kondratik, C., and Sweatt, J. D. (1999) The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* **19**, 4337–4348.
145. Reymann, K. G., Brdemann, R., Kase, H., and Matthies, H. (1988) Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **461**, 388–392.

略語一覧表

A $\beta$	:	amyloid beta
ACh	:	acetylcholine
AChE	:	acetylcholinesterase
AD	:	alzheimer's disease
AGEs	:	advanced glycation end products
APP	:	amyloid precursor protein
BuChE	:	butyrylcholinesterase
CDR	:	clinical dementia rating
ChAT	:	choline acetyltransferase
CMC	:	carboxymethyl cellulose
CMH <sub>2</sub> DCFDA	:	5-(and 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
ERK1/2	:	extracellular signal-regulated kinase1/2
FBS	:	fetal bovine serum
FTD	:	frontotemporal dementia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	hydrogen peroxide
HPLC	:	high performance liquid chromatography
LBD	:	lewy body dementia
LTD	:	long-term depression
LTP	:	long-term potentiation
MCI	:	mild cognitive impairment
MRI	:	magnetic resonance imaging
NAC	:	n-acetylcysteine
NMDA	:	n-methyl-D-aspartate
NO	:	nitric oxide
PBS	:	phosphate buffered saline
PET	:	positron emission tomography
PKC	:	protein kinase C
PI	:	propidium iodide
SPECT	:	single photon emission computed tomography:
ROS	:	reactive oxygen species
VaD	:	vascular dementia