

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590936

研究課題名（和文） アルツハイマー病の画期的アポモルフィン治療法開発

研究課題名（英文） Development of apomorphine therapy for Alzheimer disease

研究代表者

大八木 保政 (OHYAGI YASUMASA)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30301336

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病(AD)は最も高頻度の老年期認知症であるが、現在の市販薬の認知機能改善効果は限定的で、記憶改善や神経細胞変性を抑止する新規治療薬の開発が進められている。我々は、早期より神経細胞内に蓄積するアミロイドβ42 (Aβ42)を治療標的とする新規 AD 治療薬候補としてアポモルフィン(APO)を同定した。本研究課題では、培養細胞、AD モデルマウス(3xTg-AD)、AD 患者剖検脳を用いて、1) 早期より神経細胞内に蓄積する Aβ42 は毒性ターン構造 Aβ42 オリゴマーが主体であること、2) 毒性ターン構造 Aβ42 オリゴマーの蓄積は小胞体ストレスと関連が深いこと、3) APO 治療は毒性ターン構造 Aβ42 の分解を促進すること、4) AD モデルマウスに対する APO 治療はタウ蛋白の過剰リン酸化を抑制するリチウムよりも記憶改善効果が高いこと、5) 現在抗パーキンソン薬として市販されているアポカイン®も少量注射で AD モデルマウスの記憶力改善に有効であること、6) APO の AD 治療効果は単純なドパミン受容体刺激効果とは別であること、7) APO は細胞内インスリン分解酵素(IDE)活性を上昇させること、8) APO の分子作用機序の一つとしてインスリン抵抗性の抑制があり、それが IDE 活性上昇につながる可能性、などをあきらかにした。今後は、AD モデルマウスの脳のインスリン抵抗性上昇とそれに対する APO 治療の抑制効果を検討し、脳の糖尿病としての AD に対する新規治療薬剤の開発を目指していく。

研究成果の概要（英文）：

Alzheimer's disease (AD) is the most frequent dementia in the elderly. However, the currently approved drugs' effects on cognitive function are only slight, and novel drugs that improve memory function and inhibit neurodegeneration are being developed. We have found apomorphine (APO) to be a novel drug that targets amyloid-β42 (Aβ42) accumulating early in the neurons. In the present research theme, using cultured cells, AD mouse model (3xTg-AD) and brain tissues of AD patients, we have demonstrated 1) that the majority of Aβ42 accumulating in the neurons is the Aβ42 oligomer with toxic turn formation; 2) that accumulation of the toxic turn Aβ42 oligomer is associated with endoplasmic reticulum stress; 3) that APO treatment promotes degradation of the toxic turn Aβ42 oligomer; 4) APO treatment is more effective for the AD mouse model than lithium treatment which inhibits hyper-phosphorylation of tau protein; 5) that Apokyn®, a drug of APO for Parkinson's disease patients, is effective enough at low dose for memory function of the AD mouse model; 6) that the anti-AD effects of APO is not simply due to stimulation of dopamine receptors; 7) that APO elevates the activity of Insulin-degrading enzyme (IDE) in the cultured cells; and 8) that one of the molecular mechanisms of APO effects may be inhibition of the insulin resistance leading to elevation of the IDE activity. In the future, we will study about elevation of the insulin resistance in the brains of the AD mouse model and effects of APO treatment on the insulin resistance, and develop new drugs for the brain diabetes in AD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

1. 研究開始当初の背景

- (1) アルツハイマー病(AD)は代表的な老年期認知症であり、特に高齢化が進展している我が国では急増している。現在承認されているコリンエステラーゼ阻害剤の認知機能改善効果は限定的で、また神経細胞変性・脱落の抑止や神経再生などの根本治療薬とは成り得ていないため、根本的治療薬・進行抑止薬の開発は極めて重要な課題である。
- (2) AD に特徴的な脳内のアミロイドβ蛋白(Aβ)の蓄積は認知症発症に 10~20 年先行し、初期はシナプス障害による記憶力・認知機能低下、進行期には大量のニューロン死に至るとされる。生理的に分泌される Aβ の 90% は Aβ40 であるが、病的に凝集しやすいのは Aβ42 であり、特に Aβ42オリゴマー凝集体がシナプス障害やニューロン死を促進すると考えられている。そのため、多くの研究機関・企業が Aβ産生抑制、オリゴマーの凝集阻害や分解促進する薬剤の研究開発を行っている。また、Aβワクチンや抗体による免疫学的治療も細胞外 Aβの凝集抑制および分解促進作用が知られている。それらの新規薬剤に関して近年多数の臨床試験が進行中であるが、最近の臨床試験の結果からは画期的な治療効果が見出せなかった。
- (3) 一方、我々はこれまで、「神経細胞内」に蓄積する Aβ42 の p53 発現増強を介したアポトーシスの促進作用、家族性 AD 変異 PS1 による細胞内 Aβ42 蓄積促進によるプロテアソーム抑制と p53 蛋白増加を見出した。従って、神経細胞内の Aβ42 蓄積を改善する薬剤を探索し、パーキン

ソン病治療薬のドパミン受容体アゴニストの一つであるアポモルフィン(APO)が細胞内 Aβの分解を促進、酸化ストレス性アポトーシスを抑止、家族性 AD モデルマウスの 3xTg-AD マウスにおける記憶機能や AD 病理所見を明確に改善することを世界で初めて発見した。

2. 研究の目的

- (1) 神経細胞内の Aβ42 生成・蓄積にかかわる小胞体(ER)・ゴルジ体・エンドソーム系の細胞内輸送系蛋白やERストレスと、Aβ単体、オリゴマー、および特異な毒性ターン構造をとる小分子 Aβオリゴマーの関連性を解析する。
- (2) APO の神経保護作用の分子機序の一つとして、培養細胞内の抗酸化ストレス機構に対する APO の影響を解析する。
- (3) 培養細胞レベルおよび AD マウスレベルで、APO と他のドパミン受容体アゴニストとの有効性を比較する。
- (4) 培養細胞の APO 処理によって特異的に変化する遺伝子発現プロファイルを解析する。
- (5) Aβ分解酵素であるインスリン分解酵素(IDE)の活性に対する APO の影響を解析する。
- (6) 以上の解析を総合して、APO の AD 治療効果における特異的な分子作用機序あるいは治療標的分子を同定する。

3. 研究の方法

- (1) Aβ22-23 で特殊なターン構造をとる Aβは分解抵抗性でラジカル活性が高く、強い

神経毒性が報告されている。我々は、このA $\beta$ 毒性ターン構造を認識する11A1、A $\beta$ 17-24を認識する4G8、A $\beta$ 42endを認識する12F4、そして高分子凝集A $\beta$ オリゴマーを認識するA11などの抗体を用いて、変異プレセニリン1(PS1)をトランスフェクトした培養細胞SH-SY5Y、ADモデルの3xTg-ADマウス(変異APP・PS1・TAU遺伝子導入)、ヒト剖検脳を、免疫染色やウェスタンブロットで検討した。また、ERストレスマーカーのGRP78、細胞内輸送系にかかわるRab4/Rab6に対する抗体で同様の検討を行い、どのA $\beta$ 種とこれらの細胞内異常が関係するかを検討した。

- (2) タウ蛋白の異常リン酸化(p-tau)を誘導するGSK-3活性を抑制する塩化リチウム(LiCl)とAPOの治療効果を3xTg-ADマウスで比較し、また両者を併用することでさらなる治療効果が生じるかを検討した。12ヶ月齢の3xTg-ADマウス各n=8において、非治療、APO単独、LiCl単独、APO+LiClの4群で、APO 5mg/kg、リチウム(LiCl) 250 mg/kgを週1回1ヶ月間の治療を行った。治療前後で、モリス水迷路解析による記憶力の評価を行い、その後屠殺して、脳組織病理を解析した。
- (3) APOは細胞内のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)の活性を上昇させ、酸化ストレスに対して細胞保護効果を発揮する。その作用機序を調べるために、培養SH-SY5Y細胞に低濃度の過酸化水素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>負荷をかけ、それに対してAPO処理、および比較対照としてカベルゴリン(CBG)処理を行い、その時に発現変動する遺伝子群をDNAマイクロアレイで解析した。
- (4) SH-SY5Y細胞およびマウス脳のIDE活性は、InnoZyme Insulysin/IDE Immunocapture Activity Assay Kit (Calbiochem)により、特異基質分解の蛍光強度にて測定した。
- (5) 市販薬の®アポカイン(AKN)を、6ヶ月齢の3xTg-ADマウスに対して、1 mg/kgおよび5 mg/kgで週一回、一ヶ月間皮下注射を行った(各群n=5)。治療前後でモリス水迷路による記憶力の解析を行い、その後屠殺して、ウェスタンブロット解析や免疫染色解析を行った。

#### 4. 研究成果

- (1) 3xTg-ADにおけるA $\beta$ オリゴマー蓄積機構  
3xTg-ADマウスでは、約4ヶ月齢より記憶

障害および神経細胞内のA $\beta$ 42蓄積が生じるとされている。免疫染色では、神経細胞内の11A1陽性A $\beta$ 蓄積が2ヶ月齢より出現し、5ヶ月齢で4G8および12F4陽性となり、7ヶ月齢でA11陽性であった(図1)。従って、A $\beta$ 生成直後あるいはA $\beta$ 生成前のC末断端(CTF)レベルで毒性ターン構造が生じており、その一方、高分子凝集A $\beta$ 42オリゴマーは認知障害発症後に神経細胞内蓄積が進行すると考えられた。

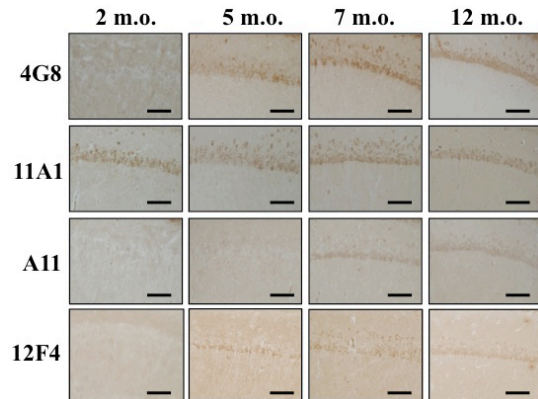


図1 3xTg-ADマウス脳組織(海馬CA1)の抗A $\beta$ 抗体による免疫染色 Bar=100  $\mu$ m

GRP78およびRab4/Rab6の免疫染色およびウェスタンブロットでは、GRP78は2ヶ月齢で、Rab4/Rab6は7ヶ月齢で増加していた。一方、6ヶ月齢からAPO治療開始した3xTg-ADマウス脳組織の神経細胞における11A1染色は低下しており、APOは毒性ターン構造A $\beta$ 42の分解も促進していると考えられた。さらに、変異PS1トランスフェクトSH-SY5Y細胞でも、細胞内で増加しているA $\beta$ 42の主体は毒性ターン構造A $\beta$ 42であり、高分子凝集A $\beta$ 42オリゴマーの蓄積はごく軽度であった。また、AD患者剖検脳でも、生存神経細胞は11A1染色性が強く、同時にGRP78も強陽性であった。

以上の結果より、記憶障害発症前もしくは発症早期より神経細胞内に毒性ターン構造A $\beta$ 42が蓄積し、ERストレスを惹起することで神経細胞の蛋白品質管理機構の障害が生じて、それが記憶障害などの認知症を発症する可能性が考えられる。その後、高分子凝集A $\beta$ 42オリゴマー蓄積により細胞内輸送系障害が促進され、さらに認知症を進行する。従って、APO治療により分解抵抗性の毒性ターン構造A $\beta$ 42の分解促進も期待できる。

- (2) APOのAD治療効果におけるドパミン受容体アゴニストとしての作用について

6ヶ月齢の3xTg-ADに対する皮下注射治療

では、APO とは別のドパミン受容体アゴニストであるプラミペキソール(1 mg/kg)を投与しても、記憶力、脳病理のどちらにおいても効果を認めなかった。また、APO の抗酸化ストレス機序である GPx 活性上昇作用について、ドパミン D1、D2、D3、D4 受容体拮抗薬で、その効果は抑制されなかった。また、DNA マイクロアレイ解析で、APO 処理に発現変動する遺伝子の数は、別のドパミン受容体アゴニストである CBG 処理と比べてはるかに多数であった(後述)。以上より、APO の AD 治療作用や細胞保護作用・抗酸化ストレス作用については、ドパミン受容体刺激作用とは別の細胞内シグナル経路が示唆された。

### (3) LiCl と APO の併用治療の検討

1ヶ月間の APO 治療と LiCl 治療の比較では、APO 単独および APO+LiCl では記憶力の維持・改善が見られたが、LiCl 単独では記憶力低下傾向が見られた。脳組織においても、APO 治療は神経細胞内 A $\beta$  および p-tau 両方の減少を認めたが、LiCl では p-tau のみの減少であった。従って、APO の AD 治療効果は LiCl よりも明確であり、一方、APO+LiCl 併用による相加的な効果はあきらかではなかった。

### (4) APO の抗 AD 作用の分子機序

培養 SH-SY5Y 細胞において、APO 処理の有無により発現レベルが変動する遺伝子群を DNA マイクロアレイにより解析した。その結果、別のドパミン受容体アゴニストである CBG と比べても APO 処理により多数の遺伝子発現が変動しており(表 1)、APO 治療ではドパミン受容体刺激以外の多様な分子機構が推定された。

表 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、APO、CBG 処理で発現変動する遺伝子数 (>0.585=200%以上増加 ; <-0.585=66%以下減少)

(n=3, p<0.05)	> 0.585	< -0.585
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. control	31	17
APO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1054	727
CBG+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	84	85
APO+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> vs. CBG+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	493	458

発現増加遺伝子群では、細胞周期停止、抗酸化ストレス、インスリンシグナリング促進に働く遺伝子が見られ、発現低下遺伝子群では、細胞増殖促進因子や蛋白リン酸化酵素遺伝子などが見られた。従って、APO の抗 AD

作用の一つとして、インスリンシグナリング回復がかかわっている可能性が示唆された。以前より耐糖能異常(糖尿病)と AD の関連性は深く、近年、AD は「III 型糖尿病」や「脳の糖尿病」として注目されている。APO 治療によるインスリンシグナリング促進が IDE 活性上昇および A $\beta$ 42 分解促進にかかわる可能性も考えられた。

### (5) 変異 PS1 トランスフェクト細胞の IDE 活性における APO 治療の効果(in vitro)

家族性 AD 変異 PS1 を導入した SH-SY5Y 細胞では細胞内 A $\beta$  分解酵素である IDE の活性低下が認められた。さらに、APO 処理により IDE 活性が上昇し、APO の抗 AD 作用機序の一つと考えられた。

### (6) 3xTg-AD マウス脳における IDE 活性上昇と APO 治療の効果(in vivo)

次に、3xTg-AD マウス脳における IDE のウェスタンブロットおよび活性測定を行った。6ヶ月齢の 3xTg-AD マウス脳組織では、non-Tg マウスと比べて、IDE 蛋白量はあきらかな変化はなかったが、変異 PS1 トランスフェクト細胞とは対照的に IDE 活性が上昇しており(n=5)、A $\beta$ 42 蓄積に対する代償性変化が考えられた。また、比較的高齢な 11、17 および 24 ヶ月齢の 3xTg-AD マウス脳では加齢に伴い IDE の活性低下が見られた(図 2)。

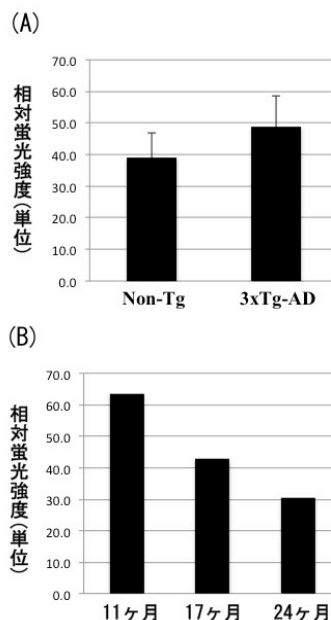


図 2 (A) 6ヶ月齢のマウス脳組織の IDE 活性 (B) 3xTg-AD 脳 IDE 活性の加齢性変化

さらに、APO 治療 3xTg-AD マウス脳では IDE の蛋白量は変化なかったが、IDE 活性上昇傾向が見られた。



(7) 3xTg-AD マウスに対する市販薬アポカイン®の治療効果

現在、パーキンソン病患者に対する治療薬として使われているアポカイン®を投与したところ、1 mg/kg でも 5 mg/kg 注射でも生理食塩水注射群に比べて、モリス水迷路であきらかな記憶力の改善を認めた。

(8) 3xTg-AD マウス脳におけるアポカイン®治療によるインスリン抵抗性の改善

神経細胞におけるインスリン抵抗性の量的指標として、リン酸化インスリン受容体基質-1 (pIRS-1)の総 IRS-1 に対する比の増加が知られている。我々は、3xTg-AD マウス脳組織の pIRS-1 の APO 治療による変化をウェスタンブロット(WB)により検討し、APO 治療により pIRS-1 の低下傾向を認めた(図 3)。現在、pIRS-1/総 IRS-1 比を正確に検討中である。従って、APO 治療による脳組織のインスリン抵抗性低下およびインスリンシグナリングの改善が示唆された。

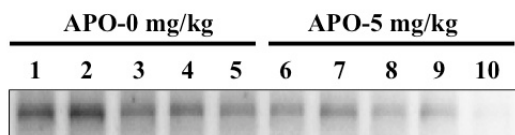


図3 6ヶ月齢3xTg-ADマウスに週一回一ヶ月間 APO皮下注射後の脳組織のpIRS-1のWB

以上より、APO 治療は AD マウス脳の神経細胞におけるインスリン抵抗性を改善し、それが IDE 活性を上昇させ、神経細胞内外の Aβ分解を促進すると考えられ、AD の記憶力回復につながる治療標的の可能性が示唆された。今後、耐糖能異常/糖尿病を合併した 3xTg-AD マウスを作成し、さらに APO の特異的な有効性およびその治療標的を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Himeno E, Ohyagi Y, Ma L, Nakamura N, Miyoshi K, Sakae N, Motomura K, Soejima N, Yamasaki R, Hashimoto T, Tabira T, LaFerla FM, Kira J: Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-β degradation. *Ann Neurol* 69: 248-256, 2011. (査読有) DOI: 10.1002/ana.22319.
- ② Ma L, Ohyagi Y, Nakamura N, Iinuma KM,

Miyoshi K, Himeno E, Soejima N, Yanagihara YT, Sakae N, Yamasaki R, Kira J: Activation of glutathione peroxidase and inhibition of p53-related apoptosis by apomorphine. *J Alzheimers Dis* 27: 225-237, 2011. (査読有) DOI: 10.3233/JAD-2011-110140

- ③ 大八木保政:細胞内アミロイドβおよび酸化ストレスを標的とする治療薬:アポモルフィン. *臨床神経* 51: 884-887, 2011. (査読無)
- ④ Ohyagi Y: [Chapter 12] Therapeutics targeting intracellular amyloid β-protein in Alzheimer's disease: A novel effect of apomorphine. *Advances in Alzheimer Research* 1: 272-290, 2012. (査読無) DOI: なし
- ⑤ Ohyagi Y: [Editorial] Apomorphine: A novel efficacy for Alzheimer's disease and its mechanism. *J Alzheimers Dis & Parkinsonism* 2: e122, 2012. (査読有) DOI: 10.4172/2161-0460.1000e122
- ⑥ 大八木保政:細胞内アミロイドβおよび酸化ストレスを標的とする治療薬. *神経内科* 77: 158-164, 2012. (査読無)
- ⑦ Soejima N, Ohyagi Y, Nakamura N, Himeno E, Iinuma KM, Sakae N, Yamasaki R, Tabira T, Murakami K, Irie K, Kinoshita N, LaFerla FM, Kiyohara Y, Iwaki T, Kira J: Intracellular accumulation of toxic turn amyloid-β is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 10: 11-20, 2013. (査読有) DOI: 10.2174/1567205011310010003
- ⑧ Ohyagi Y, Miyoshi K: Aluminium and Alzheimer's disease: An update. *J Alzheimer's Dis & Parkinsonism*, in press, 2013. (査読有) DOI: 未定
- ⑨ 大八木保政:次世代アルツハイマー医薬開発:細胞内 Aβの分子病態とアポモルフィン治療. *神経治療学*, 印刷中, 2013. (査読無)

[学会発表] (計 9 件) (主なもの)

- ① Ohyagi Y et al: A new apomorphine therapy for Alzheimer's disease. 135th Annual Meeting of American Neurological Association. San Francisco, USA, Sep. 14, 2010.
- ② Ohyagi Y et al: Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid-β degradation. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease. Paris, France, Jul. 18, 2011.
- ③ 大八木保政:細胞内アミロイドβおよび酸化ストレスを標的とする治療薬:アポモルフィン. 第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.

- ④ 大八木保政：アルツハイマー病の新規治療薬～神経細胞内アミロイドβ蛋白および酸化ストレスを標的とするアポモルフィン～ BioJapan World Business Forum, 横浜, 2011年10月.
- ⑤ 大八木保政、中村憲道、副島直子、姫野恵理、吉良潤一：細胞内アミロイドβの分子病態とアポモルフィン治療. 第30回日本認知症学会学術集会, 東京, 2011年11月.
- ⑥ Ohyagi Y et al: Intracellular accumulation of toxic turn amyloid-β associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease. 42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience. New Orleans, USA, Oct. 15, 2012.
- ⑦ Nakamura N, Ohyagi Y, et al: Treatment with apomorphine and lithium in mice with Alzheimer's disease. 42nd Annual Meeting of Society for Neuroscience. New Orleans, USA, Oct. 17, 2012.
- ⑧ 大八木保政：神経細胞内アミロイドβの分子病態とアポモルフィン治療の開発. 第30回日本神経治療学会総会, 北九州, 2012年11月.
- ⑨ 大八木保政：アルツハイマー型認知症の分子病態と治療戦略. 第86回日本薬理学会セミナー, 福岡, 2013年3月.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

九州大学大学院医学研究院神経内科学

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/neuro/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大八木 保政 (OHYAGI YASUMASA)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30301336

### (2) 研究分担者

飯沼/本村今日子 (IINUMA/MOTOMURA KYOKO)

九州大学・大学院医学研究院・技術職員

研究者番号：20380644

栄 信孝 (SAKAE NOBUTAKA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：80423523

### (3) 連携研究者

中別府 雄作 (NAKABEPPU YUSAKU)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30180350