

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：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890150

研究課題名（和文） アルツハイマー病に対するアポモルフィン治療の分子機構の解明

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

研究代表者

姫野 恵理 (HIMENO ERI)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：10608508

研究成果の概要（和文）：

アルツハイマー病(AD)は主要な老年期認知症の原因疾患であり、その根本的治療薬の開発は喫緊の課題である。我々は、神経細胞内蓄積アミロイド β 42 (A β 42)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。本研究ではさらに、1) APO の AD 治療効果は単純なドパミン受容体刺激効果とは異なる、2) APO は細胞内インスリン分解酵素(IDE)活性を上昇させる、3) APO の分子作用機序の一つはインスリン抵抗性抑制と IDE 活性上昇である可能性、4) AD モデルマウス(3xTg-AD)において 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、5) 現在市販されている APO 製剤のアポカイン®でも少量注射で 3xTg-AD マウスの記憶力改善に有効、などをあきらかにした。一方、細胞内 A β のさらなる解析により、3xTg-AD マウスで記憶障害発症前に神経細胞内に毒性ターン構造 A β 42オリゴマーが蓄積し、小胞体ストレスを惹起することをあきらかにした。

研究成果の概要（英文）：

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of senile dementia, and development of curative drugs is an important issue. We have found apomorphine (APO) to be a novel drug that targets amyloid- β 42 (A β 42) accumulating early in the neurons. In the present research, we revealed 1) that the anti-AD effects of APO is not simply due to stimulation of dopamine receptors; 2) that APO elevates the activity of Insulin-degrading enzyme (IDE) in the cultured cells; 3) that one of the molecular mechanisms of APO effects may be inhibition of the insulin resistance and elevation of the IDE activity; 4) that APO treatment is more effective for the AD mouse model (3xTg-AD) than lithium treatment which inhibits hyper-phosphorylation of tau protein; and 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. While, we studied the nature of intracellular A β , and have demonstrated that toxic turn A β 42 accumulates in neurons before onset of memory dysfunction inducing endoplasmic reticulum stress in 3xTg-AD mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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) 培養 SH-SY5Y 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。

- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) APO とタウ蛋白異常リン酸化抑制するリチウム(LiCl)の有効性を比較検討する。
- (5) APO の市販薬であるアポカイン®の有効性を検討する。
- (6) 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ゲター構造をとる小分子 Aβオリゴマーの関連性を解析する。

3. 研究の方法

- (1) 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 H₂O₂ 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。
- (2) 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。
- (3) 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 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。
- (4) 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。

- (5) 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 Aβ 毒性ターン構造を認識する 11A1、Aβ₁₇₋₂₄ を認識する 4G8、Aβ_{42end} を認識する 12F4、そして高分子凝集 Aβ 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 Aβ 種とこれらの細胞内異常が関係するかを検討した。

4. 研究成果

(1) APO の抗 AD 作用の分子機序

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。従って、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以外のシグナル経路が示唆された。

次に、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いた(表 1)。

表 1 H₂O₂、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 ₂ O ₂ vs. control	31	17
APO+H₂O₂ vs. H₂O₂	1054	727
CBG+H ₂ O ₂ vs. H ₂ O ₂	84	85
APO+H₂O₂ vs. CBG+H₂O₂	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 Aβ₄₂ 分解促進にかかわる可能性も考えられた。

(2) 変異 PS1 トランスフェクト細胞と 3xTg-AD マウス脳における IDE 活性と APO の作用

家族性 AD 変異 PS1 を導入した SH-SY5Y 細胞では細胞内 Aβ 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。

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)、Aβ₄₂ 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 1)。

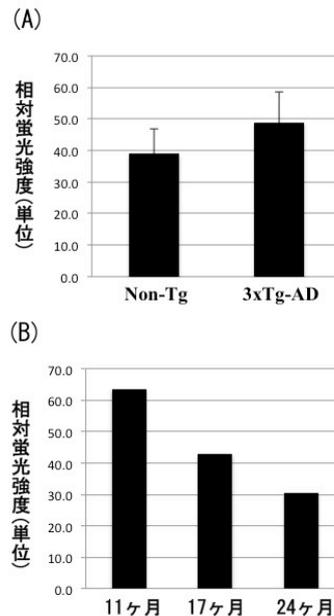


図 1 (A) 6ヶ月齢のマウス脳組織の IDE 活性 (B) 3xTg-AD 脳 IDE 活性の加齢性変化

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。

(3) 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 2)。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。

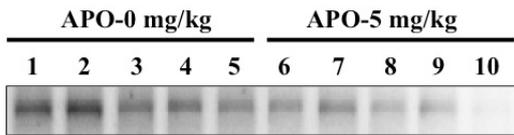


図2 6ヶ月齢3xTg-ADマウスに週一回一ヶ月間 APO皮下注射後の脳組織のpIRS-1のWB

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。

(4) 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 Aβ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。

(5) 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。

(6) 3xTg-ADにおけるAβ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 Aβ42 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 Aβ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 3)。従って、Aβ生成直後あるいは Aβ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 Aβ42 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。

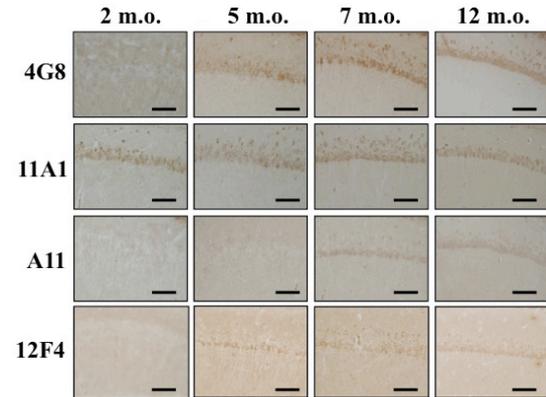


図3 3xTg-AD マウス脳組織(海馬 CA1)の抗 Aβ抗体による免疫染色 Bar=100 μm

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 Aβ42 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 Aβ42 の主体は毒性ターン構造 Aβ42 であり、高分子凝集 Aβ42 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 Aβ42 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 Aβ42 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 Aβ42 の分解促進も期待できる。

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 3 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, Inuma 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 Soejima N, Ohyagi Y, Nakamura N, Himeno E, Inuma 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 tau 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

[学会発表] (計 6 件)

- ① 姫野恵理、大八木保政、山下謙一郎、中村憲道、副島直子、吉良潤一：認知症の耐糖能と認知機能低下に関する検討。第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.
- ② 中村憲道、大八木保政、姫野恵理、副島直子、本村今日子、栄信孝、吉良潤一：3xTg-AD マウスにおけるアポモルフィンの抗酸化ストレス作用と A β 分解促進。第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.
- ③ 副島直子、大八木保政、中村憲道、姫野恵理、本村今日子、栄信孝、吉良潤一：3xTg-AD マウス及び変異 PS1 細胞の細胞内 A β オリゴマーと細胞内輸送系障害。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、本村今日子、中村憲道、姫野恵理、副島直子、栄信孝、吉良潤一：3xTg-AD マウスにおけるアポモルフィンとリチウム併用治療の検討。第 52 回日本神経学会学術大会, 名古屋, 2011 年 5 月.
- ⑤ Ohyagi Y, Himeno E, Motomura K, Soejima N, Nakamura N, Kira J: Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting

amyloid- β degradation. Alzheimer's Association International Conference on Alzheimer's Disease. Paris, France, Jul. 18, 2011.

- ⑥ 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.

[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

姫野 恵理 (HIMENO ERI)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員
研究者番号：10608508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし