

令和元年5月20日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26702001

研究課題名(和文)糖尿病患者の健やかな老いを創出・支援する介入的アルツハイマー病併発予防法の開発

研究課題名(英文) The study of Alzheimer's disease prevention in order to support healthy aging of diabetic patients

研究代表者

板垣 史郎 (ITAGAKI, SHIRO)

札幌医科大学・その他部局等・准教授

研究者番号：00360925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、認知機能あるいは糖尿病に関する幾つかの知見を得た。具体的には、1) 高血圧治療剤アンジオテンシン変換酵素阻害剤による空間認知記憶能改善効果、2) その効果に寄与すると考えられる脳内ペプチドの発見、3) 2型糖尿病モデルラットGoto-Kakizakiラットが糖尿病性ニューロパチーに起因する慢性循環器疾患病態のモデル動物となる可能性の提唱、4) ジパルミトイルホスファチジルコリンを付与したエアゾール型リポソームを活用した、肺胞粘膜層の細胞間隙の拡大に伴うインスリン吸収の増加、である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国では、超高齢化社会の進行に伴い、認知症が大きな社会問題となっている。一例として、厚生労働省が実施した平成28年国民生活基礎調査において、認知症がはじめて介護が必要となった原因の1位となった。長らく1位であった脳卒中の占める割合が急速に低下している半面、認知症の占める割合は12年で倍増している。また、近年では糖尿病が認知症の危険因子であるということが広く認識されるようになってきている。これらの背景から、本研究の成果は、糖尿病患者の健やかな老いに貢献する一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have obtained those results, 1) centrally active angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, widely used to treat high blood pressure, improved memory function of rat, 2) centrally active ACE inhibitor induced highly expressed peptide in rat brain, 3) diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats could be a nice animal model for chronic cardiovascular disease related to diabetic neuropathy, 4) encapsulation of insulin into dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) liposomes was more effective for pulmonary insulin absorption than co-administration of DPPC liposomes and unencapsulated free insulin.

研究分野：健康科学、生活科学

キーワード：認知症 糖尿病 インスリン 糖尿病性ニューロパチー エアゾール型リポソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界に例のない超高齢化が進行する我が国では、高齢期を本人と家族が希望する場所で過ごすことができる福祉体制を確立することは喫緊の課題である。しかしながら、膨大の途にある我が国の医療費は、高齢者生活を支える体制の確立を極めて困難なものにしている。とりわけ、アルツハイマー病(AD)をはじめとする認知症が抱える問題は大きい。認知症は介護が必要となった原因の第2位に位置し(厚生労働省 平成 22 年国民生活基礎調査)患者本人、その家族や介護者を含め、一千万人以上もの国民が高齢者福祉体制の問題と向き合わざるを得ないものとなっている。

介護が必要となった主な原因 (単位: %)

	平成13年	平成16年	平成19年	平成22年
脳卒中	27.7	脳卒中 29.1	脳卒中 27.3	脳卒中 24.1
高齢による衰弱	16.1	高齢による衰弱 14.9	認知症 18.7	認知症 20.5
骨折・転倒	11.8	認知症 12.5	高齢による衰弱 12.5	高齢による衰弱 13.1
痴呆	10.7	骨折・転倒 10.9	関節疾患 9.1	骨折・転倒 9.3
関節疾患	10.4	関節疾患 8.9	骨折・転倒 8.4	関節疾患 7.4

(2) AD の臨床的・社会的重要性にもかかわらず、世界で承認されている抗 AD 薬はその全てが AD 進展抑制剤にすぎず、AD 発症の根本に迫るものはない。これまで、幾つもの AD 根本治療薬の開発試験が世界規模で実施されてきたが、ことごとく不成功に終わっている。これは、AD との診断は脳神経細胞死に由来する症状がかなりのレベルで発現して初めて可能になることに起因する。

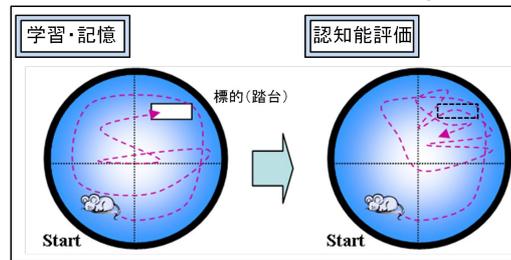
(3) 糖尿病が動脈硬化症をはじめとする心血管疾患の危険因子であることは良く知られている。一方、近年の疫学研究から、従来、純粋な神経変性疾患と考えられてきた AD についても、糖尿病がその危険因子であることが明らかになりつつある(Profenno et al., Biol Psychiatry 2009, Ohara et al., Neurology 2011)。糖尿病患者の増大、特に 65 歳以上の高齢者層の増大が顕著な我が国に対し(厚生労働省 平成 18 年糖尿病実態調査)これらの報告が与えたインパクトは極めて大きい。しかしながら、この疫学的事実の背景にある病態は不明な部分が多く、これらの重要な報告が実際の AD 治療には十分に活かされていないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) アルツハイマー型認知症とアンジオテンシン変換酵素(ACE)の関連性について、中枢移行性 ACE 阻害薬を投与された高血圧患者では認知能の低下が生じにくい、という大規模臨床試験の結果が報告されている(Sink et al., Arch. Intern. Med., 2009)。この報告は、アルツハイマー型認知症患者の症状進展抑制を図る上で、中枢に存在する ACE が有用な標的となる可能性を示唆している。骨格筋・海馬の双方に存在するアンジオテンシン 4 受容体はペプチダーゼ活性を介して骨格筋糖取り込みトランスポータを制御しているが、そのペプチダーゼ活性はインスリン共存下で低下する(Kandror et al., JBC, 1994)。本研究では、アンジオテンシン変換酵素を切り口として糖尿病が AD をまねく機序を解明し、その知見を基に糖尿病患者における AD 併発予防法を開発する。本研究の成果は、糖尿病患者の健やかな老いに大きく貢献する。

3. 研究の方法

(1) ラットの記憶能は、空間認知記憶能を指標として、モーリス水迷路法により評価した。直径 120cm、高さ 46cm の円形のビニールプールに水(水温 25 ± 1)を 30cm の深さまで入れたものを使用した。まず場所課題用逃避台(以下プラットホーム、直径 8.2cm 高さ 28cm)を置き固定した後、プラットホーム上面まで水を入れ、その上面に標的を載せた。この状態で、プール壁側の一定の位置よりラットを泳がせ、ラットがプラットホームに到達するまでの時間(遊泳時間: 最大 180 秒間)を 1 日 1 回、約 4~5 日間測定し、学習訓練を行った。学習訓練最終日の翌日より、標的を除去しプラットホームを水面下 2cm に水没させ、プール壁側の一定の位置よりラットを泳がせ、遊泳時間を 1 日 1 回、連続 6 日間測定した。



被験薬は中枢移行性 ACE 阻害薬カプトプリル、非中枢移行性 ACE 阻害薬イミダプリルおよびアンジオテンシン 受容体拮抗薬ロサルタンラットとし、記憶保持能は遊泳時間の減少から評価・解析した。

(2) 脳内ペプチドは、カプトプリル、イミダプリルおよびロサルタンを 5 日間投与した SD ラットの脳を試料として用い、探索した。強酸性の条件にて加熱処理を行った後、固相抽出を行い、抽出した試料を用いて SELDI-TOF-MS によるプロファイリングを行った。被験薬投与が脳内ペプチドの発現に与える影響を比較・検討し、カプトプリルを投与したラットの脳において特異的な発現が確認されたペプチドについて LC-MS/MS 法による構造解析を行った。

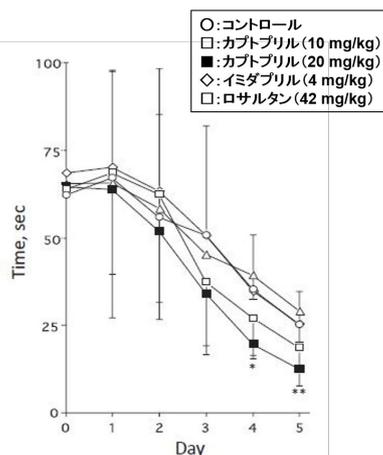
(3) 運動神経伝導速度(MNCV)、知覚神経伝導速度(SNCV)および神経線維密度(IENFD)の評価には、50 週齢のラットを用いた。心電図記録、心拍数(HR)および R - R 間隔は ML846 PowerLab

System (AD Instruments) を用いて測定した。IENFD は protein G product9.5 (PGP 9.5) を用いた免疫染色により評価した。

(4) インスリンの非侵襲的投与方法として経肺的アプローチを試みた。具体的には、ジバルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を付与したエアゾール型リポソームにインスリンを封入した製剤を設計・調製した。この製剤をラットに肺投与したのちの血糖降下作用をモニターし、インスリンの経肺吸収促進にもとづく新規アプローチの有用性を評価した。加えて、本製剤によるインスリンの経肺吸収促進メカニズムを肺胞上皮細胞モデルの生理学的反応により検討し、細胞障害性の有無についても評価した。

4. 研究成果

(1) モーリス水迷路法の結果、薬剤非投与群では遊泳回数の増加に比例した遊泳時間の短縮が認められた。薬剤投与群ではカプトプリル投与群において投与開始後 3 日目から 5 日目まで薬剤非投与群に比して有意な遊泳時間の短縮が認められた。一方、イミダプリル投与群ならびにロサルタン投与群では薬剤非投与群に比して有意な遊泳時間の短縮は認められなかった。中枢移行性 ACE 阻害剤のみが空間認知記憶能改善効果を示したこの結果から、中枢に存在する ACE の基質等が記憶保持に関与する可能性が示唆された。



(2) 続いて、中枢移行性 ACE 阻害剤による記憶保持亢進の機序の解明に資する知見を得るため、カプトプリル、イミダプリルおよびロサルタンについて、ラットにおける空間認知記憶能と脳内ペプチドの発現の対応性について解析を行った。その結果、HPLC 法による解析では、カプトプリルの濃度に依存して増加するピークが 1 種観察された。TOF-MS 法による解析では、カプトプリル投与により特異的に発現が亢進するペプチドが多数観察されたものの、その多くは質量数 3,000 以下であった。

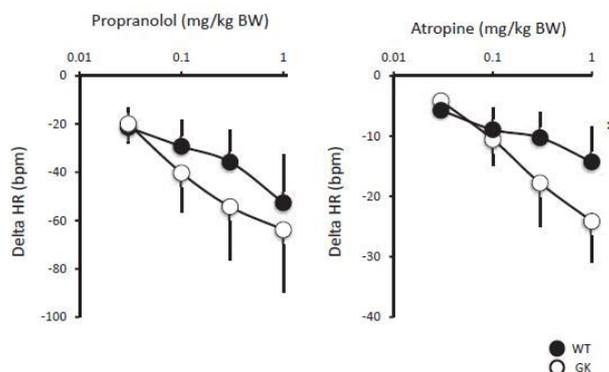
検出範囲	質量数 (m/z = MW + 1)			
	Array : Q10		Array : CM10	
	pH 4.5	pH 8.5	pH 4.5	pH 8.5
1000 < 2000	1284.9, 1512.3, 1599.1, 1615.8, 1848.8, 1881.6, 1928.1, 1976.3	N.D.	N.D.	1294.8, 1439.5, 1700.6, 1883.3
2000 < 3000	2086.0, 2253.7, 2357.5, 2453.8, 2511.0, 2538.3, 2553.8, 2575.8, 2650.0, 2690.2, 2925.4, 2940.2	N.D.	N.D.	2049.9, 2067.5, 2150.3, 2276.5, 2541.9
3000 < 4000	3,071.00	3,494.00	N.D.	N.D.
4000 < 5000	N.D.	4,565.3, 4,668.1	N.D.	N.D.
5000 <	5,270.40	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: 未検出

TOF-MS 法により検出されたペプチドの質量数は、ACE が分解するとの報告がある脳内ペプチド(サブスタンス P 等)や insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) の基質と考えられているバゾプレッシンとは異なるものであった。脳内には ACE や IRAP 以外にも活性中心に Zn²⁺ を有するメタロプロテアーゼが存在する。これらのペプチドが、カプトプリルにより阻害されたメタロプロテアーゼの内在性基質である可能性が考えられた。

(3) 平成 29 年 2 月に、千葉大学薬学研究院より、インスリンとインスリン依存的な脂肪細胞内のシグナルが記憶の維持に必要であり、インスリンシグナルの加齢に伴う変化が記憶低下の一因であるとの研究成果がプレスリリースされた (Tanabe et al., Cell Rep., 2017)。当該報告では、脳 - 脂肪組織間のシグナル伝達に寄与するペプチド DiI p3 が記憶維持に重要であると結論している。そこで、カプトプリル投与ラットについて脂肪蓄積調節機能の解析を行い、カプトプリルが脂肪蓄積抑制作用および脂肪組織重量の現象をもたらすことを確認した。また、血圧と脂肪の双方に寄与する生体因子アンジオテンシノゲンに着目し、カプトプリル投与により、血清中および脂肪組織中のアンジオテンシノゲン濃度が低下することを見出した。

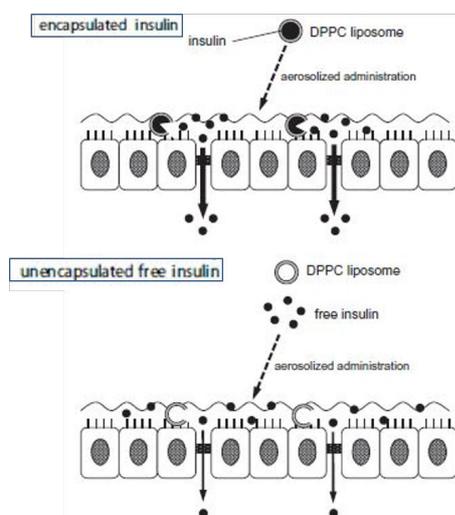
(4) 糖尿病モデルである Goto-Kakizaki (GK) ラットの神経系に関する解析を行い、GK ラットではコントロールである Wistar ラットに比して、有意な MNCV、SNCV および IENFD の低下が認められた。この結果は、GK ラットが糖尿病性ニューロパチー(末梢神経障害)に起因する自律神経系異常を呈していることを示している。さらに、GK ラットが圧反射低下および高用量アトロピンに対する反応性の低下を呈することを確認した。これらの結果は、Goto-Kakizaki ラットが糖尿病性ニューロパチーに起因する慢性循環器疾患病態のモデル動物となる可能性を提示す



るものである。糖尿病性ニューロパチーとアルツハイマー病をはじめとする認知症の関係については、関連性を示唆する多くの原著論文や総説報告がある一方で、その実態については未解明な点も多く残されているのが現状である。GK ラットがその解明に資するツールの一つとして活用されることが期待される。

(5) 糖尿病の根本的対処薬インスリンについて、非侵襲的投与法の発展を図るべく、経肺的アプローチに基づく検討を行なった。DPPC を付与したエアゾール型リポソームヘインスリンを封入させることで、肺胞粘膜層の細胞間隙の拡大に伴うインスリン吸収の増加が得られること、当該リポソームによる粘膜細胞障害は認められないことを見出した。

経肺経路は経口投与と異なり肝による初回通過効果を受けない投与経路であるため、当該リポソームにインスリンと共に認知症治療あるいは予防効果を持つ成分を封入することで、糖尿病患者における認知症発症の予防に貢献できる可能性がある。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Yonekura M., Kondoh N., Han C., Toyama Y., Ohba T., Ono K., Itagaki S., Tomita H., Murakami M.: Medaka as a model for ECG analysis and the effect of verapamil. J. Pharmacol. Sci., 137: 55-60 (2018). 査読あり

Han C., Inaba W., Yonekura M., Ogata Y., Ohba T., Kushikata T., Niwa H., Yanagisawa T., Tomita H., Itagaki S., Hirota K., Akai H., Mizukami H., Murakami M.: Modified parasympathetic nervous system in Goto-Kakizaki diabetic rats. Hirosaki Med. J., 68: 33-43(2017). 査読あり

Togami K., Chono S., Itagaki S.: Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary absorption of encapsulated insulin compared with co-administrated insulin. Drug Dev. Ind. Pharm., 43:1892-1898 (2017). 査読あり

Kaneko K., Togami K., Yamamoto E., Wang S., Morimoto K., Itagaki S., Chono S.: Sustained distribution of aerosolized PEGylated liposomes in epithelial lining fluid on alveolus surface. Drug Deliv. Transl. Res., 6:565-571 (2016). 査読あり

金澤 佐知子, 細井 一広, 照井 一史, 下山 律子, 中川 潤一, 板垣 史郎, 早狩 誠, 中枢移行性アンジオテンシン変換酵素阻害剤投与によるラット脳内ペプチド性物質のプロファイリング, 弘前医学, 65:95-103 (2014). 査読あり

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：丁野 純男、村上 学

ローマ字氏名：(CHONO sumio) (MURAKAMI manabu)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。