

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24年 4月20日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590298

研究課題名（和文） 複合型アルツハイマー病動物モデルの認知障害における PPAR γ の役割に関する研究研究課題名（英文） PPAR γ plays an important role in improvement of cognitive decline in Alzheimer's disease model animals complicated by lifestyle diseases.

研究代表者

岩崎 克典（IWASAKI KATSUNORI）

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：10183196

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに脳血管障害を併せ持つアルツハイマー病動物モデルを作成し、迷路学習障害などの記憶障害が増悪することを証明してきた。脳循環障害による認知症の発現には TNF α や HMGB1 など炎症性サイトカインの一過性上昇とこれに引き続く海馬 CA1 領域のアポトーシスが深く関わることが推測された。さらに抗炎症作用と抗アポトーシス作用を持つ PPAR γ を活性化することにより空間記憶障害を改善できた。本研究より、PPAR γ agonist 作用を持つ薬物が認知症治療薬となりうるということが証明された。

研究成果の概要（英文）：We made Alzheimer's disease model animals to complicate cerebrovascular disorders, and we proved that defects of memory such as the maze learning disability aggravated. It was supposed that the temporal increase of inflammatory cytokines including TNF α and HMGB1 and apoptosis of neurons in the hippocampus CA1 led with the onset of dementia by the cerebrovascular disorders. Furthermore, We were able to improve a spatial memory disorder by activating PPAR γ with anti-inflammatory effect and anti-apoptosis effect. It was proved that drugs with PPAR γ agonist effect could become the dementia therapeutic drug than this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：薬理学一般

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：脳循環障害、アルツハイマー病、PPAR γ

1. 研究開始当初の背景

我が国のアルツハイマー病患者の大半は、高齢ゆえに高血圧症や糖尿病などの生活習慣病をその背景に有しており、それにより認知症への進行が速く予後も悪いことが知られる。しかし、生活習慣病などが複雑に関わる現実的な患者像を想定した研究はほとん

どなされていない。そこで本研究では脳血管障害のみならずアルツハイマー病の神経細胞死の進行に炎症反応が深く関わることに着目し、これらの細胞機序がアルツハイマー病の認知症への進行にどのように関わるのかを研究する。そのために糖尿病、高脂血症などにおける炎症反応の基幹部分に深く関

わる核内受容体である PPAR γ の動態をそれぞれの病態の発症の経時変化にあわせて検出し、アルツハイマー病における細胞死へのカスケードにどのような役割を演じているかを解明する。本研究の到達目標は、アルツハイマー病を加速する二次的機序を解明することにより、予防および進行抑制の両者に役立つ治療薬を探索することである。

2. 研究の目的

Telmisartan は peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) のパーシャルアゴニスト作用を持つ angiotensin II 受容体拮抗薬であり、高血圧症にのみならず生活習慣病の治療に用いられる。脳内での PPAR γ 活性化によって、神経細胞など多くの細胞でアポトーシスや炎症反応が抑制され、amyloid- β (A β) クリアランスが増加することから、telmisartan はアルツハイマー病治療への応用が期待されている。そこで生活習慣病のみならずアルツハイマー病の認知症の進展に関わる PPAR γ の役割を明らかにし、その両者を抑制する細胞機序を見いだすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 脳梗塞や生活習慣病を併発したアルツハイマー病モデル動物を用いた PPAR γ 作用薬の効果の検討

① 脳梗塞モデルである中大脳動脈閉塞

(MCAo) マウスは、中大脳動脈の閉塞・再還流処置によって線条体を中心に細胞壊死が生ずる。この梗塞巣の体積を指標に TTC 染色等による PPAR γ 作用薬の脳保護効果を検討した。

② 脳血管性認知症のモデル動物である繰り返し脳虚血 (RI) ラットは、全脳虚血を2回繰り返し処置することで作製するが、海馬 CA1 領域で特に神経細胞死が認められ、学習記憶障害を呈するモデル動物である。この動物の細胞死・学習記憶障害に対する PPAR γ 作用薬の効果、TUNEL 染色や免疫染色、行動薬理学的手法を用いて検討した。

③ アルツハイマー型認知症モデル動物である脳虚血とアミロイド β (A β) 脳室内投与併用ラットは、我々の研究室においてその A β の凝集形態によって2種作製された。オリゴマー型 (低重合型) の A β 脳室内注入併用モデルの場合は、Ach など神経伝達物質の遊離低下などによって学習記憶障害を示す。一方で、アグリゲート型 (凝集型) の A β を注入したモデル動物では、神経細胞死を伴う記憶障害を示す。これら発症機序が異なるアルツハイマー型認知症モデル動物を用いて、細胞死・学習記憶障害に対する PPAR γ 作用薬の効果、TUNEL 染色や免疫染色、行動薬理学的手法を用いて検討した。

(2) アルツハイマー病モデル動物脳内での炎症反応とそれに対する PPAR γ 作用薬の効果の検討

モデル動物の脳内での炎症反応様式を経時的に検討し、またその炎症に対して PPAR γ 作用薬が効果を発揮するか、炎症性サイトカインである TNF- α を指標として real-time PCR 法で検討した。

(3) 脳内の神経細胞死を想定した in vitro 細胞死モデル系の構築および PPAR γ 作用薬の細胞死抑制機序の解明

脳循環障害や神経変性疾患の脳内では酸化ストレスや小胞体ストレスが上昇していることが知られている。これらのストレスを培養神経細胞に処置して細胞死を誘発し、さらに PPAR γ 作用薬によって細胞死抑制効果が認められるか WST-1 アッセイ法により検討した。また、各ストレス処置によって誘発されたアポトーシス関連因子の変動及び PPAR γ 作用薬による影響を RT-PCR 法や western blot 法により検討した。

4. 研究成果

(1) 生活習慣病を併発したアルツハイマー病モデル動物に対する PPAR γ 作用薬の効果の検討

① 中大脳動脈閉塞 (MCAo) マウスに対する PPAR γ 作用薬の効果を検討したところ、有意に壊死領域が減少し、その効果は PPAR γ 阻害薬によって消失した (図1)。脳血管性障害に対する PPAR γ 作用薬の脳保護効果がみられた。

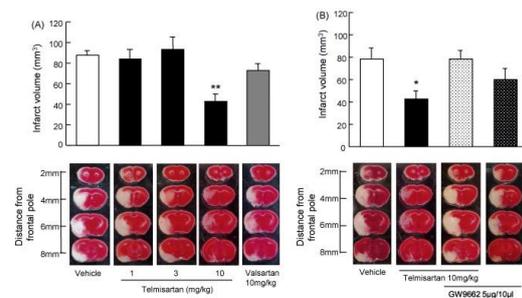


図1. 中大脳動脈閉塞 (MCAo) マウスの脳梗塞領域に対する PPAR γ 作用薬の保護効果

② 繰り返し脳虚血 (RI) ラットに対する PPAR γ 作用薬の効果を検討したところ、有意に海馬 CA1 領域の神経細胞死が減少し、その効果は PPAR γ 阻害薬によって消失した。脳血管性障害に対する PPAR γ 作用薬の脳保護効果がみられた。さらに RI ラットの学習記憶障害に与える影響を検討したところ、改善効果が認められた (図2)。

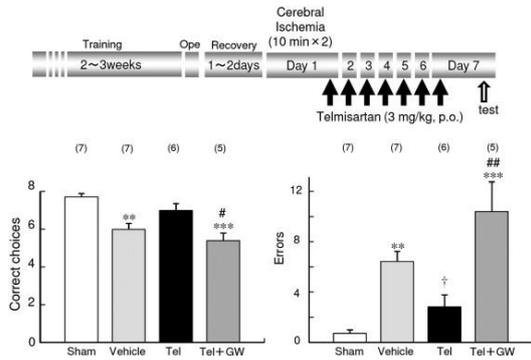


図 2. 繰り返し脳虚血 (RI) ラットに対する PPAR γ 作用薬の学習記憶障害改善効果

以上の結果より、脳血管性障害に対して PPAR γ 作用薬が細胞死を抑制することで記憶改善効果を発揮することを見出した。

③アルツハイマー型認知症のモデルを用いて PPAR γ 作用薬の効果を検討した。Ach 遊離低下や記憶障害など神経機能低下を示すが、神経細胞死は生じていない脳虚血と A β (oligomeric A β) 脳室内投与併用ラットに対しては、PPAR γ 作用薬は効果を示さなかった (図 3)。

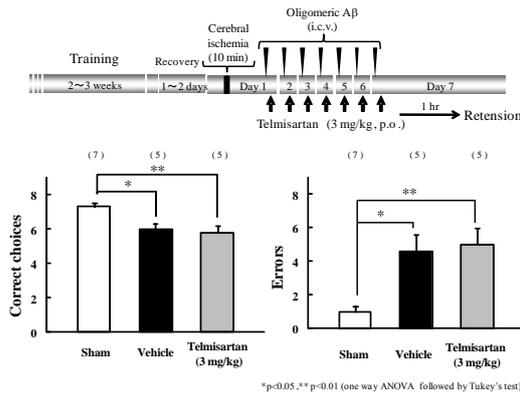


図 3. 脳虚血と A β (oligo) 脳室内投与併用ラットの学習記憶障害には PPAR γ 作用薬は無効

一方、CI + A β (agg) モデルラットでは、PPAR γ 作用薬は、有意に海馬 CA1 領域の神経細胞死を抑制し、その効果は PPAR γ 阻害薬によって消失した。また学習記憶障害に対して改善効果が認められた (図 4)。

以上の結果より、PPAR γ 作用薬の記憶改善効果は、神経細胞死抑制を介して発揮することが明らかとなった。

①～③より図 5 のような結果が得られ、PPAR γ 作用薬の神経細胞死抑制効果がアルツハイマー病モデル動物の記憶障害改善に特に重要であり、臨床においても同様な効果が期待できることが示された。

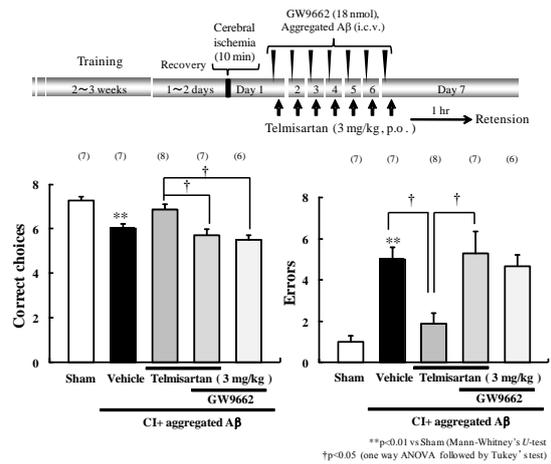


図 4. 脳虚血と A β (agg) 脳室内投与併用ラットの学習記憶障害に対する PPAR γ 作用薬の改善効果

モデル動物	神経細胞死	学習記憶障害	Telmisartan の細胞死抑制効果	Telmisartan の記憶改善効果
MCAo	あり		○	
RI	あり	あり	○	○
CI + A β agg	あり	あり	○	○
CI + A β oligo	なし	あり		×

図 5. 各疾患モデル動物に対する PPAR γ 作用薬の効果

(2) アルツハイマー病モデル動物脳内での炎症反応とそれに対する PPAR γ 作用薬の効果の検討

PPAR γ の作用として抗炎症作用が知られている。また脳循環障害やアルツハイマー病病態に炎症反応が深く関わっている知見も得られている。そこで我々の作出したモデル動物の脳内で炎症反応が惹起されているか、さらに PPAR γ 作用薬によって炎症が抑制できるか検討した。細胞死を伴って学習記憶障害を呈する CI + A β (agg) モデルラットでは、処置 6 時間後に海馬および大脳皮質において TNF α の顕著な上昇がみられた。また PPAR γ 作用薬によってその発現上昇は抑制された。

(3) 脳内の神経細胞死を想定した in vitro 細胞死モデル系の構築および PPAR γ 関連薬の細胞死抑制機序の解明

モデル動物の研究より、PPAR 作用薬の神経細胞死抑制効果がアルツハイマー病等の神経変性疾患への応用が期待された。そこで、PPAR γ 作用薬の細胞死抑制機序の解明を試みた。

脳内の神経細胞死活性化経路には、小胞体シグナル経路、ミトコンドリアシグナル経路、

細胞死受容体シグナル経路の3つが知られている。小胞体ストレス (Tunicamycin) によって細胞死を誘発した細胞死モデルにおいて、PPAR γ 作用薬は細胞生存率に影響を与えなかった。一方で酸化ストレス (Glutamate, H₂O₂) によってミトコンドリア経路を活性化させ細胞死を誘発した場合には、PPAR γ 作用薬はストレスによる細胞生存率低下を回復させた。また PPAR γ 阻害薬によってその改善作用は消失した。

以上の結果より、PPAR γ 作用薬による細胞死の抑制は、ミトコンドリアシグナル経路を阻害することに起因することを明らかにした。今後は、PPAR γ 作用薬が直接作用している因子の探索および調節機序解明を進め、臨床応用や新たな治療薬ターゲット分子の確立へとつなげたい。

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2件)

- ① Haraguchi T, Iwasaki K, Takasaki K, Uchida K, Naito T, Nogami A, Kubota K, Shindo T, Uchida N, Katsurabayashi S, Mishima K, Nishimura R, Fujiwara M. Telmisartan, a partial agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, improves impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats treated with repeated cerebral ischemia. Brain Res. 2010, 24:1353:125-32. 査読有
- ② Haraguchi T, Takasaki K, Naito T, Hayakawa K, Katsurabayashi S, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Cerebroprotective action of telmisartan by inhibition of macrophages / microglia expressing HMGB1 via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. Neurosci Lett. 2009, 464(3):151-5. 査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 中山知香、岩崎克典ら10名
PC12細胞において酸化ストレスにより誘導された細胞死への PPAR γ パーシャルアゴニスト Telmisartan の効果
第85回日本薬理学会年会、2012年3月14-16日、京都
- ② 高崎浩太郎、岩崎克典ら14名
アルツハイマー型認知症モデルラットの

空間記憶障害と海馬の神経細胞死に対する telmisartan の効果
第41回日本神経精神薬理学会年会、2011年10月27-29日、東京

- ③ 鬼村理香、岩崎克典ら12名
アルツハイマー型認知症モデルラットの空間記憶障害と海馬のアポトーシスに対する telmisartan の効果
日本薬学会第131年会、2011年3月28日-31日、静岡
- ④ 内田佳菜子、岩崎克典ら13名
繰り返し脳虚血ラットの空間記憶障害と海馬のアポトーシスに対する PPAR γ 活性化薬の作用
第40回神経精神薬理学会年会
2010年9月15-17日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 克典 (IWASAKI KATSUNORI)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：10183196

(2) 研究分担者

三島 健一 (MISHIMA KENICHI)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：00320309

高崎 浩太郎 (TAKASAKI KOTARO)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号：70461506

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号：50435145