

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：16301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K09302
 研究課題名(和文) アルツハイマー病のインスリンシグナル障害とアポモルフィン・インスリン複合治療

研究課題名(英文) Impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease and combined therapy with apomorphine and insulin

研究代表者
 大八木 保政 (Ohyagi, Yasumasa)
 愛媛大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30301336
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)では、脳内が糖尿病状態となっている。私たちがアミロイド蛋白(A_β)の分解促進薬として報告したアポモルフィン(APO)は、脳神経細胞のインスリン抵抗性を改善する。本研究では、3xTg-ADマウスに対してSTZ注射や高フルクトース食で糖尿病状態を誘導し、脳内での毒性A_β42コンフォマーの増加、A_β42とタウ蛋白の共凝集、インスリンシグナリング障害、およびミクログリアの活性化を見出した。次に、培養N2a細胞におけるウェスタンブロットやTR-FRET法によるインスリンシグナリングのアクセス系を確立し、A_βによるインスリンシグナリング抑制、およびAPOの治療効果を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADの治療薬開発では150種類以上の臨床試験が失敗に終わっている。ADの病態について、「脳の糖尿病」説は理解しやすく、また治療戦略として魅力的な仮説である。実際に多数の糖尿病薬がADマウスやAD患者に有効であることが報告されている。APOもインスリンシグナリングを促進すると考えられるが、APOは糖尿病治療薬ではない。従って、糖尿病薬とは別の機序でPI3K-Akt経路を刺激していると考えられ、APOは各種糖尿病薬との併用効果も期待できる。本研究成果は、AD脳内の新たな分子病態をあきらかにし、新規治療法開発のための基盤となる細胞アクセス系を確立したことである。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) brain is thought to be in diabetes-like condition. Apomorphine (APO), which we have reported to be a novel drug promoting degradation of amyloid-protein (A_β), improves insulin resistance of neurons. In the present study, we induced peripheral diabetic condition in 3xTg-AD mice using the streptozotocin (STZ) injection and high fructose diet, and found an increase in levels of toxic A_β42 conformer, co-aggregation of A_β42 and tau protein, impairment of insulin signaling, and activation of microglia in brain. Next, we established an assay system of insulin signaling in cultured N2a cells using western blot and TR-FRET, and confirmed inhibition of insulin signaling by A_β and recovery of the insulin signaling by APO. Currently, we are investigating possibility of synergistic effects of APO and various anti-diabetic drugs using this assay system.

研究分野：内科学一般(含心身医学)

キーワード：アルツハイマー病 糖尿病 モデルマウス アポモルフィン アミロイド 蛋白 毒性ターン構造 オリゴマー リン酸化タウ蛋白

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) アルツハイマー病(AD)は老年期認知症において 60%以上を占める主因疾患であり、高齢化と共に我が国では急増している。現在保険適応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非常に重要な課題である。1990年代より提唱されているアミロイド仮説に基づき、AD 脳内に蓄積するアミロイドβ蛋白(Aβ)を標的とする薬剤が多数開発されたが、いずれも臨床試験では認知機能障害に関する有効性を実証できなかった。
- (2) AD 脳における 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、進行期にはタウ蛋白のリン酸化促進および大量のニューロン死に至るとされる。特に、42 個のアミノ酸からなる Aβ42 は分泌 Aβの 10%以下であるが毒性の高いオリゴマーを形成しやすいタイプである。私たちは以前、パーキンソン病治療薬であるアポモルフィン(APO)の投与が神経細胞内に蓄積する Aβの分解を促進し、3xTg-AD マウスの認知機能や AD 病理を改善することを報告した(Himeno et al, 2011)。また、APO 治療が培養細胞内インスリンシグナリングを改善することを見出した。一方、特異な毒性ターン構造を有する Aβ42 (毒性 Aβ42 コンフォーマー)は、早期より 3xTg-AD マウスの脳内に増加することも報告した(Soejima et al, 2013)。さらに、3xTg-AD マウスにおいて、APO 治療により脳神経細胞のインスリン抵抗性が改善することを報告した(Nakamura et al, 2017)。
- (3) 近年、AD 脳の分子病態として糖尿病(DM)と類似の機序が推定されており、欧米では AD は「脳の DM」あるいは「3 型 DM」と言われている。従って、インスリン抵抗性上昇やインスリン欠乏状態では AD 病理の中心である Aβ蓄積や神経原線維変化のリン酸化タウ蛋白生成を促進すると考えられている。また最近、AD モデルマウスや AD 患者において、糖尿病薬やインスリン点鼻による記憶機能や AD 病理の改善も多数報告されている。

2. 研究の目的

- (1) 3xTg-AD マウスにおいて、高フルクトース食飼育(high fructose diet, HFuD)でインスリン抵抗性上昇、あるいは streptozotocin (STZ)注射で末梢のインスリン分泌を抑制し、特に毒性 Aβ42 コンフォーマーの形成促進や過剰リン酸化タウ蛋白(p-tau)蓄積促進に対するインスリン代謝異常の影響を検証する。
- (2) 培養細胞系において、インスリンシグナリングを定量的に解析する実験系を確立する。その実験系において、Aβペプチドによるインスリンシグナリング障害、および APO や糖尿病薬によるインスリンシグナリング改善の効果を検証する。

3. 研究の方法

- (1) 3xTg-AD マウスは *APP_{KM670/671NL}/PS1_{M146V}/TAU_{P301L}* の 3 つの変異遺伝子を有し、約 4 か月齢から記憶障害を呈する。6 ヶ月齢 3xTg-AD マウスに対して、5 日間 STZ 50 mg/kg 注射群、高フルクトース食(60%) / 水(10%)飼育群(HFuD)、通常食飼育群(natural)をそれぞれ作成し(n=12)、3 ヶ月後の 9 ヶ月齢で解析した。脳組織蛋白を TBS で抽出し、毒性 Aβ42 コンフォーマー(24B3・11A1)、総 Aβ42 (12F4)、p-tau (AT180・AT8)、総タウ蛋白(Tau46)、β-actin の各抗体でドットプロット定量的解析やウェスタンブロット解析を行った。また、タウ蛋白オリゴマー抗体(T22)との二重免疫染色、Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET)法によるインスリンシグナリング分子解析、ミクログリアの免疫染色も行った。
- (2) インスリンシグナリング解析の培養細胞系として Neuro-2a (N2a)細胞を用いた。インスリン受容体刺激により Akt や GSK-3βがカスケード的にリン酸化される。これらのリン酸化型である pAkt および pGSK-3βのウェスタンブロットを行った。次に、本実験系において、合成 Aβ40 および Aβ42 ペプチドの影響をウェスタンブロット解析した。Aβペプチドのオリゴマー形成促進には室温で 22 時間の pre-incubation を行った。また、さらに高精度の TR-FRET 法による pAkt の定量的解析も行った。

4. 研究成果

(1) インスリン欠乏は毒性 Aβ42 コンフォーマー形成を促進する

モリス水迷路解析において、STZ 群では natural 群および HFuD 群に比べて、ゴール台場所の記憶が有意に悪化していた。

さらにドットプロット解析では、STZ 群で顕著な Aβ42 増加および毒性 Aβ42 コンフォーマー形成が促進されていたが、p-tau 形成は STZ 群・HFuD 群とも有意に促進していた(図 1A, B)。ウェスタンブロットでは 24B3・11A1 とともに 3-mer、4-mer の同パターンバンドが見られた(図 1C)。11A1 は野生型 Aβ42 も一部認識するが 24B3 は毒性 Aβ42 コンフォーマー特異的であり、脳内蓄積 Aβ42 の大部分は毒性コンフォーマーのオリゴマーと考えられた。

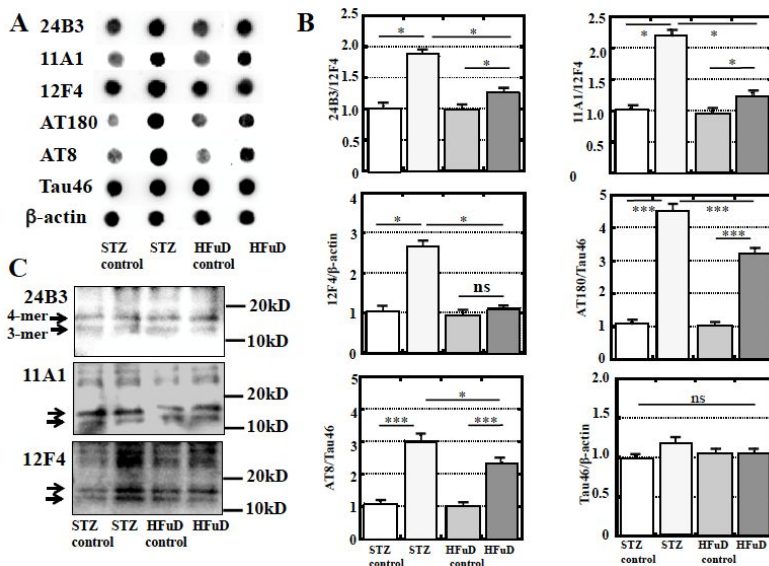


図 1 マウス脳内に蓄積する Aβ42 および p-tau の蛋白レベルの解析

(A)ドットプロット解析 (B)ドットプロット強度の定量化 (C)ウェスタンブロット解析

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns = not significant

(2) 毒性Aβ42コンフォーマーとp-tauは神経細胞内で共局在する

蛍光免疫染色では、毒性 Aβ42 コンフォーマー(11A1)および p-tau (AT180)とも特に STZ 群で形成蓄積が促進され(図 2)、二重染色では両蛋白の共局在、すなわち共凝集が示唆された(図 3)。

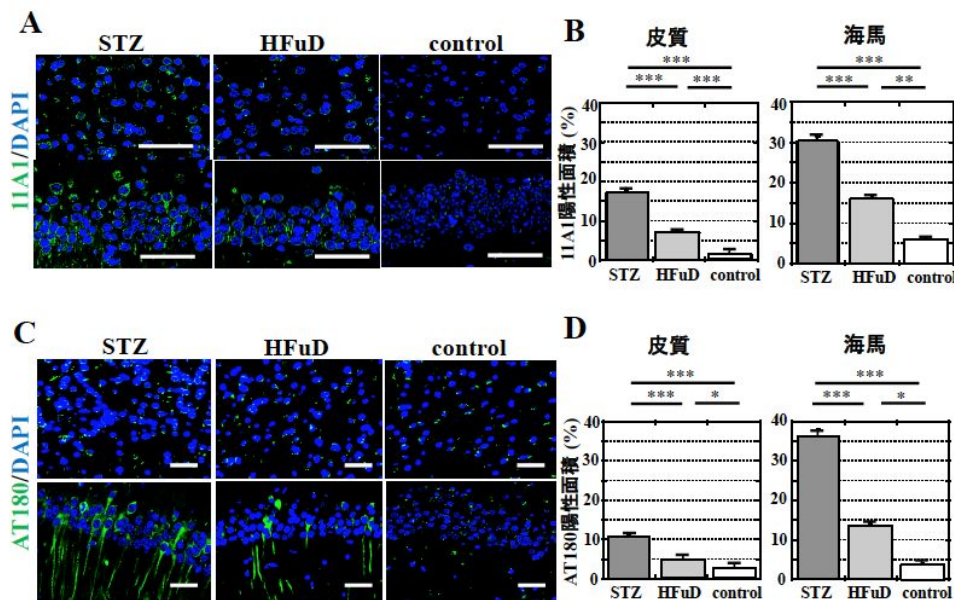


図 2 マウス脳組織の蛍光免疫染色：スケールバー = 50μm

(A)(C)上段は大脳皮質、下段は海馬。(B)(D)各陽性細胞の面積割合。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

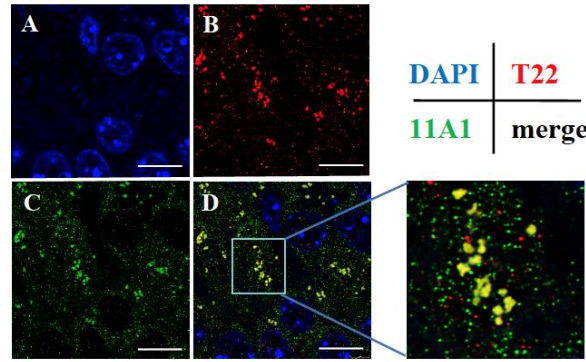


図3 マウス脳組織の二重蛍光免疫染色：スケールバー = 10 μ m
 (A)核染色(DAPI) (B)タウオリゴマー(T22) (C)毒性 A β 42 コンフォーマー(11A1) (D)融合像

(3) 末梢のインスリン欠乏や抵抗性上昇は脳神経細胞インスリンシグナリング障害を誘導する
 細胞内のインスリンシグナリングでは、IRS-1、Akt、GSK-3 β とリン酸化が進む(図4左)。GSK-3 β は脱リン酸型が活性型であり、タウ蛋白の過剰リン酸化を促進する。従って、pAkt および pGSK-3 β はインスリンシグナリングの指標となる。マウス脳抽出の蛋白を TR-FRET で定量すると、STZ・HFuD 両群で pAkt、pGSK-3 β とも低下しておりインスリンシグナリングが障害されるが、STZ 群でより顕著であった(図4右)。総Akt量や総GSK-3 β 量は変化なかった。

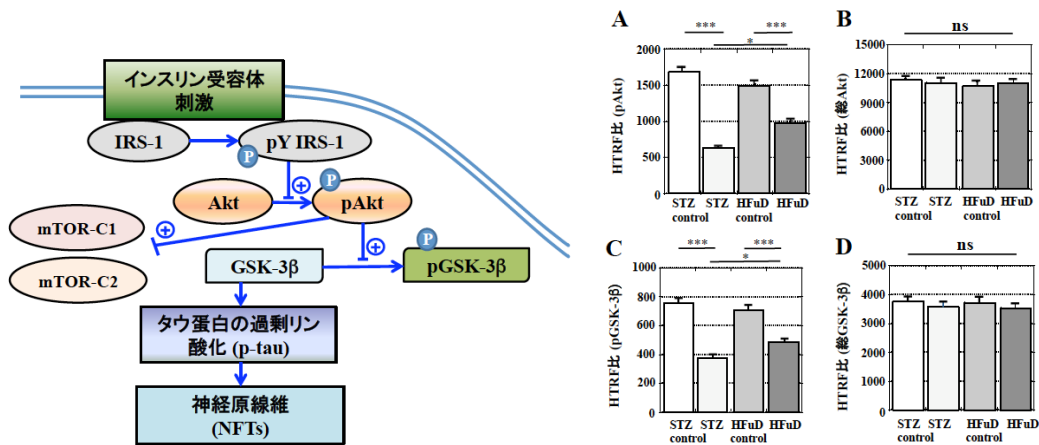


図4 左) インスリンシグナリング関連分子：IRS-1、Akt、GSK-3 β とリン酸化が進む。
 右) TR-FRETによる定量解析：(A)リン酸化Akt (B)総Akt (C)リン酸化GSK-3 β (D)総GSK-3 β
 $*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$ 、ns = not significant

(4) 末梢のインスリン欠乏は脳内ミクログリア活性化を促進する
 AD 脳の病理学的特徴の一つは、ミクログリアの活性化である。インスリンシグナリング低下はミクログリア活性化を惹起すると言われており、本マウスでも特に STZ 群で活性型(NOS2 陽性)のミクログリア(Iba1 陽性)の顕著な増加が認められた(図5)。

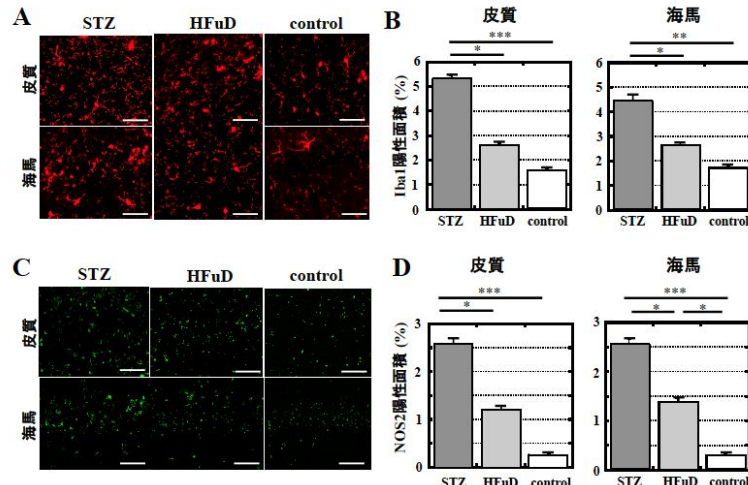


図5 マウス脳組織の蛍光免疫染色：スケールバー = 50 μ m
 (A)Iba1 (C)NOS2 (B)(D)面積割合 $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ 、 $***p < 0.001$ 、ns = not significant

(5) N2a 細胞において Aβ42 オリゴマーはインスリンシグナリング障害を誘導し、APO 処理はその障害を回復する：ウェスタンブロットおよび TR-FRET

次に、インスリンシグナリングを解析する培養細胞系を確立した。N2a 細胞で、通常のウシ胎仔血清(FBS)入り培地から N2 supplement 入り無血清培地に置換すると N2 supplement 中のインスリン刺激によりインスリンシグナリングの pAkt や pGSK-3βが増加する。その条件下で、Aβ40 および Aβ42 ペプチドを添加した。また、Aβペプチドを 5 時間、22 時間 pre-incubation することでオリゴマー形成を促進した。図 6 左は Aβ42 の影響を示すが、22 時間 pre-incubation でオリゴマー形成を促進すると、pAkt がより顕著に減少し、pGSK-3βの変化は軽微だった。さらに、APO 処理を加えると pAkt 減少が抑制され、また p-tau 増加も抑制された。従って、APO は Aβ42 オリゴマーによるインスリンシグナリング抑制を改善したことが示唆された。

さらに高精度な TR-FRET 法を用いて、pAkt を定量的に解析した。N2a 細胞を FBS 入り培地、N2 supplement 入り無血清培地(ウェスタンブロットと同様に x0.5 および x1 で検討)に、Aβ40 および Aβ42 ペプチドを添加して 14 時間培養後に細胞を回収した。図 6 右に示すように、Aβ40 および Aβ42 処理で pAkt 量は低下するが、APO を添加すると pAkt が増加(矢印)、すなわちインスリンシグナリングが回復した。

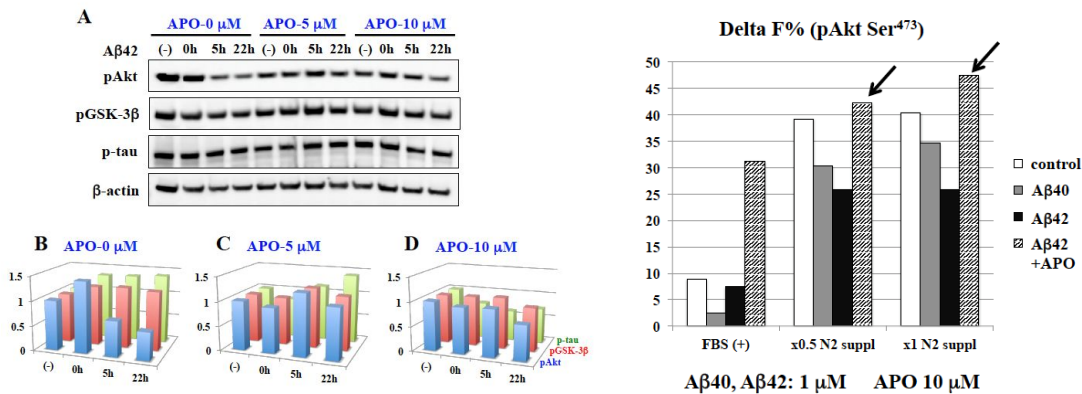


図 6 ウェスタンブロット法(左)および TR-FRET による pAkt、pGSK-3βおよび p-tau 等の解析 TR-FRET法では、Aβ40・Aβ42は1μM、APOは10μM、14時間処理した。

(6) AD 脳組織のインスリン・糖代謝異常と APO の治療標的

上記の 3xTg-AD マウスの結果について、2020 年に報告した(Imamura et al, 2020)。これまでの知見から、AD 脳内の分子病理と治療標的について我々の考えをまとめる(図 7)。末梢のインスリン抵抗性上昇もしくはインスリン欠乏は脳神経細胞のインスリンシグナリング低下を誘導する。インスリンシグナリング低下はインスリン分解酵素(IDE)活性低下や脱リン酸型 GSK-3β活性上昇をきたし、Aβ分解低下や p-tau 増加を誘導する。この時に形成促進される毒性 Aβ42 コンフォーマーとタウオリゴマーが共凝集することでさらに AD 病態を促進する(右写真)。毒性 Aβ42 コンフォーマー(オリゴマー)はさらにインスリン受容体刺激を抑制することでさらなるインスリンシグナリング低下の悪循環を生じる。我々の既報告(Nakamura et al, 2017)のように、APO は脳神経細胞のインスリン抵抗性を改善するとともに、今回の図 6 の結果より、毒性 Aβ42 コンフォーマーによるインスリン受容体阻害も抑制することが推察された。

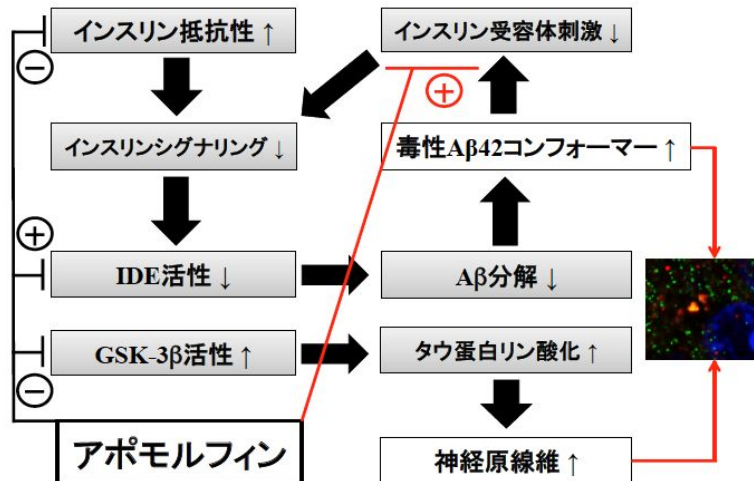


図 7 AD 脳におけるインスリンシグナリングの分子病態と APO の治療的機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imamura T, Yanagihara YT, Ohyagi Y, Nakamura N, Iinuma KM, Yamasaki R, Asai H, Maeda M, Murakami K, Irie K, Kira JI	4. 巻 137
2. 論文標題 Insulin deficiency promotes formation of toxic amyloid-42 conformer co-aggregating with hyper-phosphorylated tau oligomer in an Alzheimer's disease model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurobiol Dis	6. 最初と最後の頁 104739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbd.2020.104739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ohyagi Y, Takei SI	4. 巻 8
2. 論文標題 Insulin signaling as a therapeutic target in Alzheimer's disease: Efficacy of apomorphine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurol Clin Neurosci	6. 最初と最後の頁 146-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohyagi y, Miyoshi K, Nakamura N	4. 巻 1128
2. 論文標題 Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease in the View of Diabetes Mellitus	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol	6. 最初と最後の頁 227-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-981-13-3540-2_11.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura N, Ohyagi Y, Imamura T, Yanagihara YT, Iinuma KM, Soejima N, Murai H, Yamasaki R, Kira J	4. 巻 58
2. 論文標題 Apomorphine therapy for neuronal insulin resistance in a mouse model of Alzheimer's disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1151-1161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-160344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大八木保政	4. 巻 32
2. 論文標題 アルツハイマー型認知症の予防	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大八木保政	4. 巻 95
2. 論文標題 認知症の診断：アルツハイマー病	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床と研究	6. 最初と最後の頁 233-237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件(うち招待講演 2件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 武井聡子、大八木保政、越智雅之、越智博文
2. 発表標題 アルツハイマー病脳のインスリンシグナリング障害を改善する薬剤評価のための培養細胞アッセイ系の確立
3. 学会等名 第36回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大八木保政、武井聡子、岡部颯、花岡由理子、井手努、越智雅之、越智博文
2. 発表標題 Impairment of insulin signaling by Alzheimer 's amyloid- protein and protection by apomorphine
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 アルツハイマー病における脳の糖尿病とアポモルフィン治療の可能性
3. 学会等名 第34回日本老年精神医学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohyagi Y, Takei S, Nakamura N, Imamura T
2. 発表標題 Apomorphine as a novel drug targeting neuronal insulin signaling in Alzheimer's disease
3. 学会等名 144th Annual Meeting of The American Neurological Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 糖尿病 + アルツハイマー病モデルマウスの分子病態と治療薬の開発
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohyagi Y, Ohara M, Igase M, Nakamura T, Imamura T, Yanagihara YT, Kira J, Watanabe A, Fujii N
2. 発表標題 Glucose intolerance associating with mild cognitive impairment and brain diabetes as a therapeutic target in Alzheimer's disease
3. 学会等名 World Congress of Neurology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohyagi Y, Nakamura N, Imamura T, Watanabe A, Fujii N
2. 発表標題 Apomorphine as a novel drug for Alzheimer's disease targeting brain diabetes
3. 学会等名 Neuroscience 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 武井聡子、大八木保政、越智雅之、越智博文
2. 発表標題 アルツハイマー病脳のインスリンシグナリング障害を改善する薬剤評価のための培養細胞アッセイ系の確立
3. 学会等名 第36回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大八木保政、今村友裕、柳原由記
2. 発表標題 3xTg-ADマウスの糖インスリン代謝異常はAβ毒性ターン形成を促進する
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ohyagi Y, Nakamura N, Miyoshi K	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 248
3. 書名 Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer's disease? Chapter: Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in the view of diabetes mellitus	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山口 浩雄 (Yamaguchi Hiroo) (00701830)	九州大学・大学病院・特任講師 (17102)	