

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07826

研究課題名(和文)アルツハイマー病のインスリンシグナリング障害およびA β の分子病態と治療

研究課題名(英文)Molecular pathology and therapeutics of insulin signaling impairment and Abeta in Alzheimer's disease

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) 3,300,000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、培養N2a細胞において、リン酸化Akt(pAkt)をインスリンシグナリングの指標としてAPOと他のドパミン受容体アゴニストや糖尿病薬との作用の比較や併用効果を調べ、APOのpAktレベル上昇作用がドパミン受容体刺激ではなく、糖尿病薬と同様にインスリン受容体刺激を介することが考えられた。また、APOはA β による細胞毒性およびインスリンシグナリング障害を抑制することをあきらかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近のADの治療薬開発では、脳内A β を標的とする抗体薬が少しずつ承認されている。A β の減少は認知症の早期段階において認知症進行の抑制につながるが、進行した認知症に対する効果は乏しい。一方、ADの「脳の糖尿病」説は認知症の治療戦略として魅力的である。私たちがADマウスやAD患者で記憶力改善効果を見出したAPOもインスリンシグナリングに関わると考えられる。本研究では、APOの作用がドパミン受容体刺激ではなくインスリン受容体を刺激する可能性が考えられ、実際にA β による細胞毒性やインスリンシグナリング低下を抑制することをあきらかにした。本研究成果は、ADの認知機能回復の治療薬開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) brain is suggested to be in diabetes-like condition. Apomorphine (APO), which we have reported to be a novel drug promoting degradation of amyloid- β protein (A β), improves insulin resistance of neurons. In the present study, we compared the effects on the insulin signaling between APO and other dopamine receptor agonists or anti-diabetic drugs in the N2a cells using phosphorylated Akt (pAkt) as an indicator of insulin signaling. We have revealed that the pAkt-increasing effects of APO may be independent of dopamine receptor stimulation but may directly stimulate the insulin receptor, because APO effects are competitive with anti-diabetic drugs. In addition, APO treatment inhibited the pAkt-decreasing effects as well as the cell-toxic effects of A β 40 and A β 42, indicating an efficacy for AD. Currently, we are investigating the similar effects of APO in an AD mouse model.

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 培養細胞 インスリンシグナリング アポモルフィン 糖尿病薬 ドパミン受容体
アミロイド 蛋白 細胞毒性

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、研究者個人に帰属します。

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、我が国では患者が急増している。現在保険適応されているコリンエステラーゼ阻害剤等は認知機能低下を遅らせるのみであり、根本治療薬とは成り得ていない。また、AD 脳内に蓄積するアミロイドβ蛋白(Aβ)を標的とする抗体薬は、より病態進行を抑える治療法として期待されているが、進行期 AD の認知機能を改善することは困難と考えられる。
- (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。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)。
- (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。
- (4) さらに私たちは、APO 治療により 3xTg-AD マウスの脳神経細胞のインスリン抵抗性が改善すること(Nakamura et al, 2017)、および末梢のインスリン分泌低下(STZ 注射)あるいは抵抗性上昇(高フルクトース食[HFuD]飼育)が 3xTg-AD マウス脳内のインスリンシグナリングを抑制し AD 病理を促進することをあきらかにした(Imamura et al, 2020)。したがって、APO 治療は脳神経細胞のインスリンシグナリングを改善する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

- (1) 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し、Aβペプチドによるインスリンシグナリング障害や細胞死促進作用に対する APO の効果を検証する。
- (2) さらに、APO と他のドパミン受容体アゴニストや糖尿病薬の作用を比較し、APO のインスリンシグナリング改善効果はドパミン受容体刺激を介するのか、糖尿病薬との相乗効果が期待できるかなどについて検証する。

3. 研究の方法

- (1) 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(図 1)。したがって、リン酸化 Akt (pAkt)を定量的に解析することで、インスリンシグナリングレベルの変化を解析できる。pAkt レベルはウェスタンブロット(WB)、あるいは高精度の TR-FRET 法により解析した。

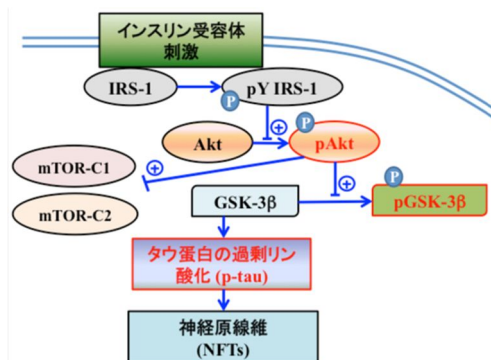


図 1 インスリンシグナリング経路の簡略シエマ
IRS-1 がリン酸化され、PI3K によるリン酸化カスケードが作動する。

- (2) ドパミン受容体アゴニストとして Pramipexole (PPX)、Ropinirole (ROP)、Pergolide (PGL)を用い、また糖尿病薬として、Liraglutide、Vildagliptin、Metformin を用いて、N2 supplement 入り無血清培地でそれぞれ 14 時間処理し、APO (アポカイン注射薬®)と作用を比較した。また、APO と糖尿病薬の併用効果も検討した。
- (3) APO の作用がインスリンシグナリングを介するものか、特異的 IRS-1 阻害薬の NT157 の影響を検討した。
- (4) Aβ40 および Aβ42 によるインスリンシグナリング抑制作用と、それに対抗する APO の活性化作用を検討した。
- (5) さらに、48 時間処理後の培養細胞の生存率を Cell Counting Kit-8 で解析し、Aβ40 および Aβ42 処理による生存率低下と、それに対抗する APO の細胞保護作用を検討した。

4. 研究成果

- (1) Akt リン酸化促進は APO 以外のドパミン受容体アゴニストではみられない
 非麦角系アゴニストの PPX・ROP はドパミン D2 受容体を、麦角系アゴニストの PGL はドパミン D1・D2 受容体を刺激する。一方、APO は非麦角系アゴニストで広域にドパミン受容体を刺激する。WB 解析で、APO では pAkt / Total Akt 比が上昇したが、他の 3 種薬では上昇がみられなかった(図 2)。

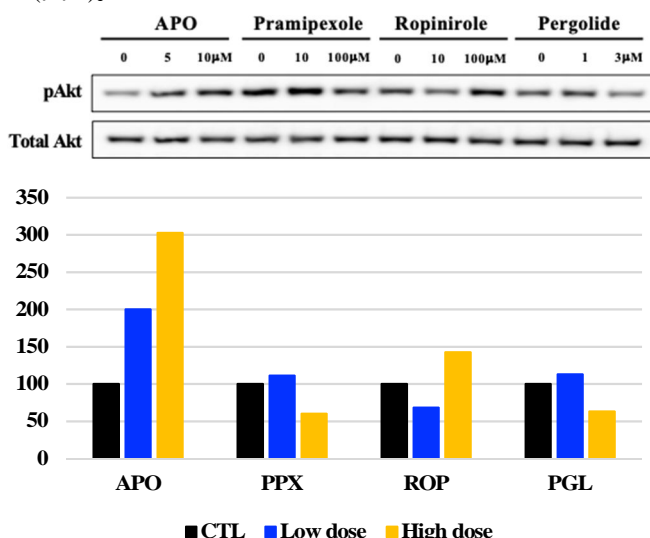


図 2 APO とドパミン受容体アゴニスト 3 種の比較
 pAkt / Total Akt 比は APO でのみ上昇がみられた。

- (2) Akt リン酸化促進は糖尿病薬でもみられる
 TR-FRET 法で pAkt および Total Akt を解析した。WB 同様に、APO で pAkt / Total Akt 比が上昇し、また糖尿病薬 3 種でも上昇がみられた(図 3)。特に、GLP-1 アゴニストである Liraglutide では APO と同レベルの明確な上昇作用がみられた。

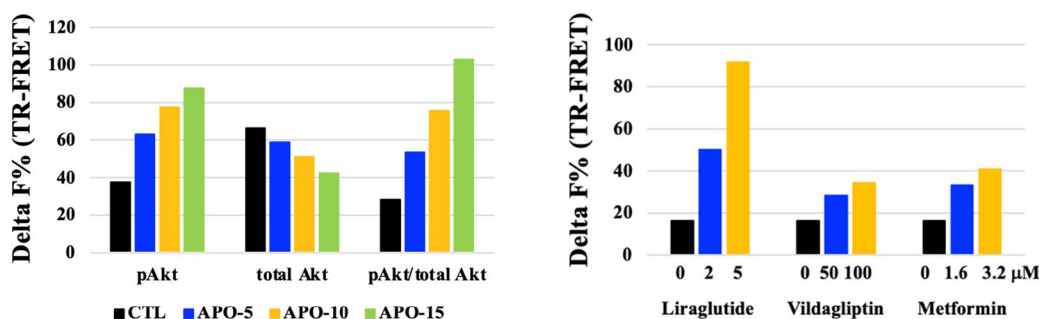


図 3 APO と糖尿病薬 3 種の比較
 pAkt / Total Akt 比は APO および糖尿病薬で上昇がみられた。

(3) APO と糖尿病薬の併用は競合的である

TR-FRET 法で、APO と Vildagliptin の併用を検討した。APO、Vildagliptin とともに単独処理の方が pAkt 上昇作用は顕著であり、両者の併用ではそのような作用が抑制された(図 4)。Liraglutide でも同様の傾向が見られた。したがって、APO と糖尿病薬の併用は相乗効果ではなく、インスリンシグナリングが共通の作用標的であることによる競合的阻害が考えられた。

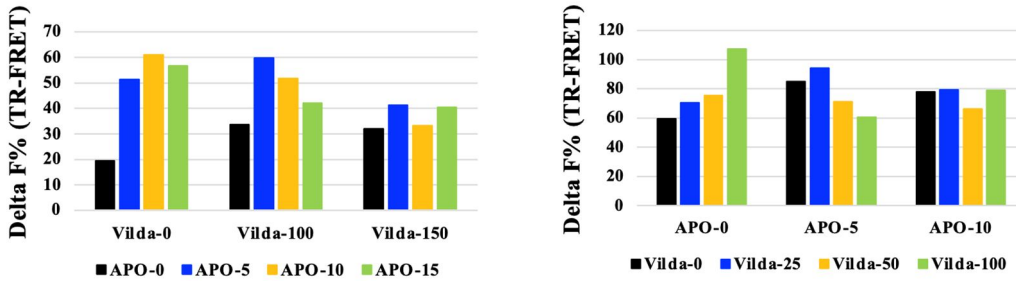


図 4 APO と Vildagliptin 併用の作用

pAkt / Total Akt 比は、APO、Vildagliptin (左高濃度；右低濃度)とも単独で効果が高い。

(4) APO の Akt リン酸化促進作用は NT157 で抑制される

WB 解析で、APO による pAkt 上昇作用は、特異的 IRS-1 阻害薬である NT157 で抑制された(図 5)。したがって、図 4 の結果も併せると、APO の作用はインスリン受容体刺激経路の促進と考えられた。

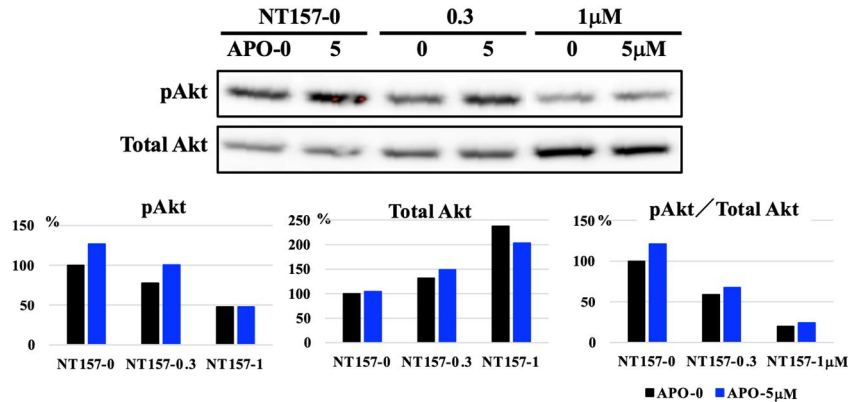


図 5 NT157 による pAkt 低下と APO 作用の抑制

NT157 処理で pAkt / Total Akt 比は低下し、APO による上昇効果も抑制される。

(5) Aβはインスリンシグナリングを抑制し、APO 処理で回復する

Aβ40 および Aβ42 ペプチドを細胞培地に加え、また Aβ42 添加細胞に APO を併用して、TR-FRET 法で pAkt を解析した。まず、pAkt はウシ胎仔血清(FBS)入り培地よりも N2 supplement 入り無血清培地で pAkt レベルが高かった。これは、N2 supplement の中にインスリンが含まれているためである。Aβ処理で pAkt レベルは低下したが、APO 併用で回復がみられた(図 6)。したがって、Aβ、特に Aβ42 にはインスリンシグナリング抑制作用があり、APO はその Aβの作用を抑制すると考えられた。また、FBS 入り培地でも APO による pAkt 上昇がみられたことから、APO は直接インスリンシグナリングを活性化する可能性がある。

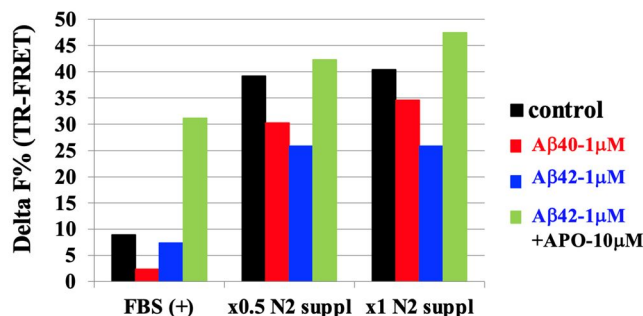


図 6 Aβ処理による pAkt 低下と APO による回復

無血清培地における pAkt レベル低下は Aβ42 で強く、APO 処理で回復する。

(6) APO は Aβによる細胞死を抑制し、細胞保護的である

Aβには細胞毒性があり、細胞生存率低下が pAkt レベル低下に影響する可能性を検証した。N2 supplement 入り無血清培地で 48 時間処理により、Aβ40 は 10 μM から、Aβ42 は 5 μM から濃度依存性に細胞生存率が低下した(図 7)。図 6 における pAkt レベル低下は 1 μM でみられており、細胞生存率低下の影響ではないことが考えられた。

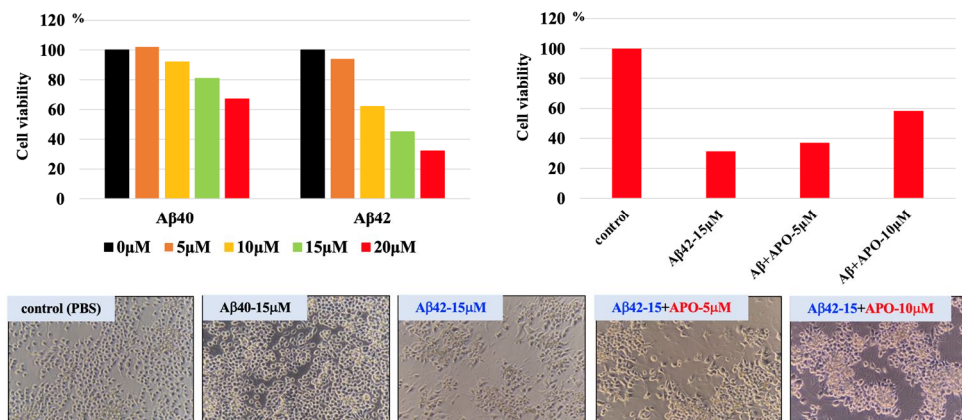


図 7 Aβ処理による細胞生存率低下と APO による回復

Aβ40・42 による細胞生存率低下は APO で改善する。また、APO には突起伸長作用がある。

(7) 結果のまとめと考察

これまでの結果をまとめると、以下のような結論が得られる。

APO はドパミン受容体アゴニストの一つとして知られているが、インスリンシグナリング促進作用はドパミン受容体刺激以外の経路が考えられる。

APO と同様に糖尿病薬にも pAkt 上昇作用があるが、APO と糖尿病薬である Vildagliptin の併用は逆に pAkt レベルは低下した。また、APO の作用は NT157 で抑制された。したがって、APO はインスリン受容体に直接作用する可能性がある。

APO は Aβ42 によるインスリンシグナリング障害および細胞毒性に対して抑制作用があり、AD に対する治療効果が期待できる。

現在、ドパミン受容体の D1~D4 サブタイプ別の拮抗薬で APO の作用が抑制されないか検証中である。さらに今後、上記の結果が in vivo でも確認できるか、AD マウスモデルを使って検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 大八木保政	4. 巻 111
2. 論文標題 認知症の臨床update	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本内科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 436-440
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 63
2. 論文標題 アルツハイマー病	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 今日の治療指針	6. 最初と最後の頁 979-981
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 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 Neurobiology of Disease	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 Goto T, Kuramoto E, Dhar A, Wang RP-H, Seki H, Iwai H, Yamanaka A, Matsumoto S, Hara H, Michikawa M, Ohyagi Y, Leung WK, Chang RC-C	4. 巻 76
2. 論文標題 Neurodegeneration of trigeminal mesencephalic neurons by the tooth loss triggers the progression of Alzheimer's disease in 3xTg-AD model mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1443-1459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-200257	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 該当する

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 Neurology and Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 12369
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 大八木保政, 今村友裕, 武井聡子	4. 巻 34
2. 論文標題 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戦略	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dementia Japan	6. 最初と最後の頁 253-262
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7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 認知症と糖尿病：共通の病態機序と認知症の治療標的の可能性
3. 学会等名 第56回糖尿病学の進歩 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 アルツハイマー病と糖尿病：認知症の治療標的の可能性
3. 学会等名 第40回日本認知症学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大八木保政、武井聡子、今村友裕
2. 発表標題 アルツハイマー病マウス脳のPI3K-Aktシグナル障害とその治療薬の探索
3. 学会等名 第39回日本神経治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 超高齢社会における内科学：認知症の臨床update
3. 学会等名 第49回内科学の展望（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 認知症の臨床update
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ohyagi Y
2. 発表標題 Apomorphine treatment targeting neuronal insulin signaling in Alzheimer's disease.
3. 学会等名 International Conference on Complex Medical and Engineering (ICME) 2020
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 大八木保政
2. 発表標題 アルツハイマー病のインスリンシグナリング障害モデルの培養細胞アッセイ系の確立と治療薬の探索
3. 学会等名 第62回日本老年医学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔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	武井 聡子 (Takei Satoko) (40838017)	愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員) (16301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関