

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461274

研究課題名(和文)アルツハイマー病のインスリン抵抗性を標的とするアポモルフィン治療法の開発

研究課題名(英文)Development of apomorphine therapy targeting insulin resistance 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は認知症の主因である。近年、ADは「3型糖尿病」と言われている。私たちは以前、神経細胞内のアミロイド(A₄₂)の分解促進薬としてアポモルフィン(APO)を同定した。APOはインスリン抵抗性を改善させる。本研究では、3xTg-ADマウスにstreptozotocin(STZ)注射で1型糖尿病、また高フルクトース食(HFuD)で2型糖尿病を誘導した。HFuD群よりもSTZ群で認知障害悪化や毒性ターンA₄₂の増加があきらかであった。さらに、毒性ターンA₄₂は神経細胞内でタウ蛋白オリゴマーと共凝集していた。今後、糖尿病+ADマウスにおいて新規のAD治療法開発を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia. A diabetes-like pathogenic mechanism in AD brain has recently been suggested, and AD is called "type-3 diabetes mellitus (DM)". Previously, we identified apomorphine (APO) as a novel drug to promote degradation of A₄₂ accumulating in AD neurons. APO may improve the insulin resistance in AD neurons. In the present study, we established DM+AD mouse models in which injection of streptozotocin (STZ) induced type-1 DM and high-fructose diet (HFuD) induced type-2 DM in 3xTg-AD mice. Exacerbation of cognitive impairment and increases in the toxic turn A₄₂ which forms readily aggregating oligomers were more apparent in STZ-injection mice (type-1 DM) than in HFuD mice. In addition, it was indicated that toxic turn A₄₂ co-aggregates with tau oligomers in neurons. Thereafter, we will develop new therapeutic strategies of combination of APO and other DM drugs using such a DM+AD mouse models.

研究分野：神経内科学

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 リン酸化タウ蛋白

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、特に高齢化が進んで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非常に重要な課題である。
- (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。特に、分泌 Aβ の 10% 以下である Aβ42 は毒性の高いオリゴマーを形成しやすいタイプで、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。しかし、その臨床試験の結果は必ずしも明確な有効性を示していない。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)。さらに、DNA マイクロアレイ解析で、APO 治療が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 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)。
- (3) 近年、AD 脳の分子病態として糖尿病(DM)と共通の機序が重要と考えられており、欧米では AD は「脳の DM」あるいは「3 型 DM」と言われている。また、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。

2. 研究の目的

- (1) 3xTg-AD マウスに対して、高フルクトース食(high fructose diet, HFuD)飼育することによりインスリン抵抗性が上昇する 2 型 DM、あるいは streptozotocin (STZ)注射することで膵臓β細胞からのインスリン分泌を抑制し、1 型 DM を誘導する。
- (2) 1 型 DM や 2 型 DM を誘導することで、3xTg-AD マウスの認知障害が悪化するかと検証する。

- (3) さらに、1 型 DM あるいは 2 型 DM を誘導することで毒性ターン Aβ42 の形成が促進されるかを検証する。毒性ターン Aβ42 および total Aβ42 を定量的に解析するためのドットプロット解析や ELISA システムを確立する。

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。7 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)、通常食の飼育群(natural)をそれぞれ作成し(n=12)、開始 3 ヶ月後の 10 ヶ月齢で解析した。
- (2) 記憶機能はモリス水迷路(MWM)により評価した。特に、60 秒間プローベ試験でゴール台場所の 1/4 区画の遊泳割合およびゴール場所の交差回数を記憶機能の主要な指標とした。
- (3) 6 時間絶食後にインスリン(®Novolin R)を 0.5 U/kg 注射し、血糖の反応性を指標として末梢インスリン抵抗性を評価した(Insulin Tolerance Tests, ITTs)。
- (4) 脳組織蛋白を TBS で抽出し、毒性ターン Aβ42 (11A1・24B3)および総 Aβ42 (12F4) の各特異抗体でドットプロット解析あるいは ELISA の定量的解析を行った。また、タウ蛋白オリゴマー抗体(T22)との二重免疫染色も行った。
- (5) 統計学的有意差は t 検定で、また相関関係については Pearson 解析を行った。P<0.05 を有意と解釈した。

4. 研究成果

(1) STZ 群では認知障害が悪化する(図 1)

MWM 試験のゴール 1/4 区画の遊泳割合は、natural 群に比べて HFuD 群で有意に高く、STZ 群で有意に低かった。ゴール場所交差回数では、HFuD 群に比べて STZ 群で有意に低かった。STZ 群では認知障害が明確に悪化した。

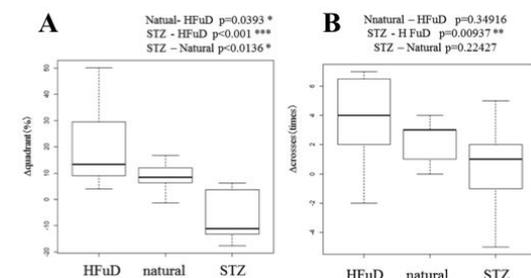


図 1 (A) MWM のゴール 1/4 区画の遊泳割合 (B) MWM とゴール場所の交差回数

(2) STZ群はインスリン分泌を低下させ、HFuD群はインスリン抵抗性を上昇させる

空腹時血糖はSTZ群、HFuD群とも有意に上昇していた。血中インスリンレベルはSTZ群で低下しており、ITTsでHFuD群においてインスリン抵抗性上昇が見られた。病理学的には、STZ群で膵臓β細胞の減少・萎縮、HFuD群で肝細胞内脂肪沈着が見られ、それぞれ1型DMおよび2型DMに矛盾しない所見であった(データ非提示)。

(3) 毒性ターンのAβ42形成はインスリン分泌低下と逆相関する(図2)

新規の毒性ターンのAβ42抗体24B3のELISA解析(Murakami et al, Sci Rep, 2016)と末梢インスリン分泌レベル(IRI/PG)の相関を解析し、有意な逆相関を認めた。従って、インスリン分泌レベルが低下すると脳組織内の毒性ターンのAβの形成・蓄積が促進されることが示唆された。一方、HFuD群では、末梢インスリンレベルと脳組織内の毒性ターンのAβ蓄積量に有意な相関は見られなかった(データ非提示)。

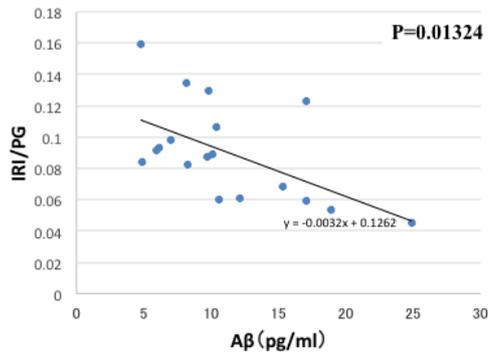


図2 STZ群における毒性ターンのAβ量と血中インスリンレベルの相関

(4) STZ群ではタウオリゴマー蓄積も促進されている(図3)

ドットプロット解析では、毒性ターンのAβ42に対する両抗体(11A1・24B3)、総Aβ42に対する抗体(12F4)、さらにはタウ蛋白オリゴマーに対する抗体(T22)とも、STZ群で毒性Aβ42およびタウ蛋白オリゴマーの形成・蓄積の促進が示唆された。

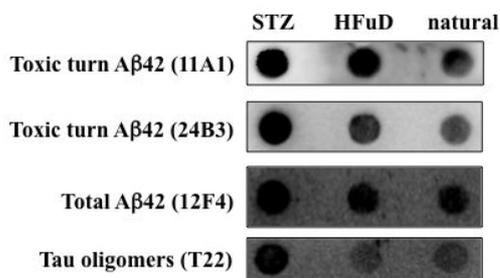


図3 毒性ターンのAβ42、総Aβ42、タウ蛋白オリゴマーのドットプロット

(5) 毒性ターンのAβ42はタウ蛋白オリゴマーと神経細胞内で共凝集している(図4)

STZマウスの脳組織を毒性ターンのAβ42(11A1)とタウ蛋白オリゴマー(T22)の抗体で蛍光二重免疫染色したところ、両蛋白は神経細胞内で共局在しており、それらの神経細胞の核(DAPI)は萎縮・脱落傾向が見られた。従って、これらの蛋白は互いにseedを形成することで共凝集が促進され、それらが蓄積する神経細胞ではアポトーシスが惹起されている可能性が示唆された。

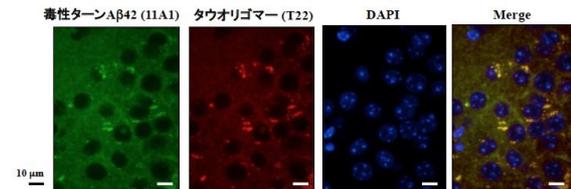


図4 STZマウス脳組織の蛍光二重免疫染色。11A1(緑)とT22(赤)が共局在しており(黄)、それらの細胞の核(DAPI、青)が脱落傾向。

(6) APO治療はAD脳神経細胞のインスリン抵抗性を改善する(図5)

私たちは、APO皮下注射で3xTg-ADマウスの記憶機能が改善することを報告し(Himeno et al, 2011)、その作用機序の一部は抗酸化ストレス機構の増強であることも報告した(Ma et al, 2011)。さらに、インスリンシグナリングも増強することから、神経細胞のインスリン抵抗性改善作用の可能性を考えた。

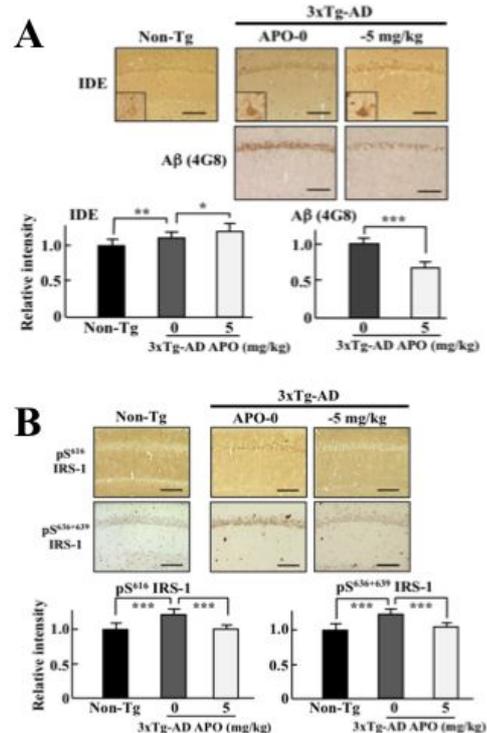


図5 13ヶ月齢APO治療マウス海馬の免疫染色 (A) インスリン分解酵素(IDE)とAβ (B) pS⁶¹⁶およびpS⁶³⁶⁺⁶³⁹IRS-1 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 Bar=100 μm

図 5A に示すように、海馬 CA1 の神経細胞では 5 mg/kg APO 治療により IDE 増加と A β 減少がみられた。A β 分解酵素としてよく知られている IDE の増加から、APO 治療によるインスリンシグナリング促進が考えられた。また、図 5B に示す pS⁶¹⁶ や pS⁶³⁶⁺⁶³⁹ Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) は細胞のインスリン抵抗性の指標である。どちらの IRS-1 も APO 治療の 3xTg-AD マウスで染色性が低下しており、インスリン抵抗性の低下が示唆された。以上の結果について、論文業績 1) にまとめて報告した(Nakamura et al, 2017)。

【考察と今後の展望】

本研究の主目的は、AD における 1 型 DM および 2 型 DM の影響を比較する、それに対する APO の治療効果を比較することであった。については、STZ 注射および HFuD 飼育により、AD モデルの 3xTg-AD マウスに 1 型 DM および 2 型 DM を誘導できた。

これまで、高脂肪食(HFD)飼育による末梢インスリン抵抗性上昇が AD モデルマウスの認知機能障害や AD 病理を促進することがいくつか報告されているが、今回の研究における HFuD 飼育による末梢インスリン抵抗性上昇では MWM における記憶障害の悪化は認めなかった。HFD 飼育とは異なり、フルクトースが供給されることで、インスリン抵抗性上昇の影響よりもむしろ脳神経細胞におけるエネルギー産生が改善された可能性も考えられるが、今回の観察期間である 3 ヶ月間よりもっと長期の影響を調べる必要もあるかもしれない。

一方、今回の研究では、STZ 注射による膵臓インスリン分泌抑制が、明確な認知機能の悪化と AD 脳の病態で重要な分子と考えられる毒性ターン構造 A β 42 の形成・蓄積を促進したことは興味深い。さらに、3xTg-AD マウスの脳組織では、神経細胞内で毒性ターン A β 42 とタウオリゴマーの共凝集が示唆されたことから、末梢インスリン分泌低下による神経細胞のインスリンシグナリング低下が脱リン酸化 GSK-3 を誘導しタウ蛋白の過剰リン酸化およびオリゴマー形成を促進、それが seed となって毒性ターン A β 42 形成を促進した可能性が考えられた。日本人高齢者では、インスリン抵抗性上昇よりもむしろインスリン分泌低下が目立ってくるため、AD 病理や認知症発症を促進するメカニズムの一つと考えられ、今後重要な治療標的となる可能性がある。

さらに、3xTg-AD マウスにおける APO の治療効果は脳神経細胞のインスリン抵抗性を改善し、A β 分解酵素である IDE の発現を促進することで認知機能を改善することが示唆された。以上の結果から、STZ 注射による

1 型 DM 合併の 3xTg-AD マウスに対する APO 治療の効果を検証する必要がある。これが本研究の目的であるが、現段階では開始できていない。今後も引き続き、上記研究計画を推進していく。さらに、APO と糖尿病薬などを組み合わせることで、さらに効果の高い治療法開発につながることを期待できる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) Nakamura N, Ohyagi Y, Imamura T, Yanagihara YT, Inuma KM, Soejima N, Murai H, Yamasaki R, Kira J. Apomorphine therapy for neuronal insulin resistance in a mouse model of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis, May 25, 2017. [Epub ahead of print] (査読有り)
- 2) 大八木保政. アルツハイマー病：脳の糖尿病の治療薬開発．老年期認知症研究会誌 21: 46-49, 2017. (査読無し)
- 3) 大八木保政. アルツハイマー型認知症の予防．BioClinica, 印刷中, 2017. (査読無し)
- 4) 大八木保政. アルツハイマー病のインスリン抵抗性とアポモルフィン治療の開発．Dementia Japan 30: 329-337, 2016. (査読無し)
- 5) 大八木保政, 中村憲道. 次世代のアルツハイマー病に対する医薬開発：細胞内 A β の分子病態とアポモルフィン治療．神経内科 80: 376-382, 2014. (査読無し)

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) Ohyagi Y, Nakamura N, Imamura T, Watanabe A, Fujii N. Apomorphine as a novel drug for Alzheimer's disease targeting brain diabetes. Neuroscience 2017, Nov 11-15, 2017, Washington, DC, USA.
- 2) Ohyagi Y, Ohara M, Igase M, Nakamura N, Imamura T, Yanagihara YT, Kira J, Watanabe A, Fujii N. Glucose intolerance associating with cognitive impairment and brain diabetes as a therapeutic target in Alzheimer's disease. World Congress of Neurology, Sept 16-21, 2017, 京都国際会館, 京都府京都市.
- 3) 大八木保政, 尾原麻耶, 伊賀瀬道也. 大学病院ドック受検者における認知機能と糖インスリン代謝の解析. 第 35 回日本認知症学会学術集会. 2016 年 12 月 1 日～3 日. 東京国際フォーラム, 東京都千代田区.
- 4) 大八木保政. アポモルフィン注射薬は AD マウス脳のインスリン抵抗性を改善する. 第 34 回日本神経治療学会総会. 2016 年 11 月 3 日～5 日. 米子コンベンションセンター, 鳥取県米子市.
- 5) Ohyagi Y, Watanabe A, Sasagasako N, Fujii N, Nakamura N, Kira J. Apomorphine improves memory function and insulin

resistance in Alzheimer's disease. 第 57 回日本神経学会学術大会 . 2016 年 5 月 18 日～21 日 . 神戸国際会議場 , 兵庫県神戸市 .

- 6) 大八木保政, 渡邊暁博, 笹ヶ迫直一, 藤井直樹 . アルツハイマー型認知症に対するアポモルフィン治療のパイロット研究 . 第 33 回日本神経治療学会総会 . 2015 年 11 月 26 日～28 日 . 名古屋国際会議場 , 愛知県名古屋市 .
- 7) 大八木保政 . アルツハイマー病のインスリン抵抗性とアポモルフィン治療の開発 (シンポジウム) . 第 34 回日本認知症学会学術集会 . 2015 年 10 月 2 日～3 日 . リンクステーションホール青森 , 青森県青森市 .
- 8) 大八木保政, 柳原由記, 中村憲道, 川村有希子, 吉良潤一 . 非糖尿病アルツハイマー病患者における認知機能と末梢インスリン抵抗性の解析 . 第 56 回日本神経学会学術大会 . 2015 年 5 月 20 日～23 日 . 朱鷺メッセ , 新潟県新潟市 .
- 9) 大八木保政, 柳原由記, 中村憲道, 川村有希子, 吉良潤一 . 非糖尿病アルツハイマー病患者の認知機能における末梢インスリン抵抗性の影響 . 第 33 回日本認知症学会学術集会 . 2014 年 11 月 29 日～12 月 1 日 . パシフィコ横浜 , 神奈川県横浜市 .
- 10) Ohyagi Y, Nakamura N, Yanagihara Y, Iinuma K, Kira J. Apomorphine therapy for neuronal insulin resistance in Alzheimer mice. 26th International Conference of Alzheimer's Association (AAIC). July 12-17, 2014, Copenhagen, Denmark.
- 11) Ohyagi Y. New trends in therapeutics for Alzheimer's disease (Symposium): A novel therapeutics for Alzheimer's disease as type-3 diabetes. 第 55 回日本神経学会学術大会 . 2014 年 5 月 21 日～24 日 . 福岡国際会議場 , 福岡県福岡市 .

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Ohyagi Y, Miyoshi K, Nakamura N. Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in the view of diabetes mellitus. In Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer's disease? Nakabeppu Y Eds. Springer Nature, in press, 2017.

〔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/>
愛媛大学大学院医学系研究科老年・神経・総合診療内科学
<http://www.m.ehime-u.ac.jp/school/geriatric/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大八木 保政 (OHYAGI YASUMASA)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 : 30301336

(2)研究分担者

山崎 亮 (YAMASAKI RYO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 10467946

飯沼 今日子 (IINUMA KYOKO)
九州大学・大学院医学研究院・臨床・衛生
検査技師
研究者番号 : 20380644

(3)連携研究者

なし