

〈シンポジウム 02—1〉アルツハイマー病の分子治療戦略：新しい視点を求めて

細胞内アミロイドβおよび酸化ストレスを標的とする治療薬： アポモルフィン

大八木保政

(臨床神経 2011;51:884-887)

Key words : アルツハイマー病, 3xTg-ADマウス, アポモルフィン, アミロイドβ蛋白, 酸化ストレス

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) は老年期認知症の主要な原因疾患であるが, 現在の AD 治療のコリンエステラーゼ阻害薬および NMDA 受容体拮抗薬は認知症の進行抑制効果はあるものの認知機能回復や根治にいたっていない。AD の病理学的特徴として, 神経原線維変化 (neurofibrillary tangle, NFT) および老人斑 (senile plaque, SP) が知られている。NFT の主成分は過剰リン酸化タウ蛋白 (hyperphosphorylated tau protein, p-tau) であり, SP の主成分はアミロイドβ蛋白 (amyloid-β protein, Aβ) である。一般に, Aβ の凝集促進が AD の主因と考えられており (アミロイドカスケード仮説), その抑止薬の開発が期待されている。近年, 線維化 Aβ よりも未熟な Aβ オリゴマーの神経細胞毒性が高いことが知られており, 治療標的として重視されている。

一方, 細胞内に蓄積する Aβ に起因する神経細胞障害も最近知られている。われわれは, 加齢にともなう酸化ストレスが神経細胞内の Aβ 蓄積を促進し, p53 発現増強を介してアポトーシスを促進することを報告した¹⁾。また, 細胞内 Aβ は, シナプス毒性, 小胞体ストレス, プロテアソーム障害, ミトコンドリア障害などにもかかわるとされている²⁾。そこで, AD 治療薬候補として細胞内 Aβ の分解を促進する薬剤を探索し, ドパミン受容体刺激薬の一つであるアポモルフィン (apomorphine, APO) をはじめてみいだした。さらに, AD モデルマウスに対する APO の治療効果およびその作用機序を解析した。

APO による細胞内 Aβ 分解促進と Aβ 分解酵素活性の上昇

われわれはまず, SH-SY5Y 細胞をもちいて細胞内 Aβ 分解アッセイ系確立した。合成 Aβ40 および Aβ42 ペプチドを細胞質内に蓄積させ, その後の Aβ 減少をウェスタンブロット (WB) で解析した。本アッセイ系をもちいて既存薬でスクリーニング実験をおこない, APO 処理で Aβ40 および Aβ42

の分解促進が示唆された。さらに, proteasome 阻害薬である MG132 で処理すると Aβ 分解が抑制され, MG132 と APO を併用すると Aβ 分解速度の回復がみられた。

次に, Aβ 分解酵素の活性に対する APO の作用をしらべた。代表的な Aβ 分解酵素である proteasome, insulin-degrading enzyme (IDE), neprilysin (NEP) の活性をしらべたところ, proteasome 活性および IDE 活性は APO 処理で有意に上昇したが, 主に細胞外 Aβ 分泌にかかわる NEP に対しては, 活性上昇はみられなかった。したがって, APO は主として細胞内の Aβ 分解を促進することが推察された。

APO による 3xTg-AD マウスの記憶障害 および AD 病理の改善

本邦未承認の APO は欧米でパーキンソン病に対する即効性皮下注射薬として市販されているため, *in vivo* における有効性の検討も皮下注射でおこなった。対象とした 3xTg-AD マウスは Oddo と LaFerla らが開発した AD モデルマウスで, 2 種類の家族性 AD 関連変異遺伝子 (*APP_{KM670/671NL}/PS1_{M146V}*) およびタウ蛋白遺伝子変異 (*Tau_{P301L}*) を導入しており, 4 カ月齢頃より神経細胞内 Aβ 蓄積と記憶障害を発症する³⁾。6 カ月齢 3xTg-AD マウスに, 生食, 5mg/kg あるいは 10mg/kg の APO を週 1 回 1 カ月間, 計 5 回の皮下注射をおこなった。治療前後にモリス水迷路 (MWM) 解析で記憶力の回復を評価した。MWM 解析では, 3 日間以上の訓練でゴール場所を記憶し, その 24 時間後にゴール台なしで 60 秒間遊泳させ (probe 試験), ゴール台場所までの初回到達潜時 (秒), ゴール台場所の交差回数 (回), ゴール台場所 1/4 区画の遊泳割合 (%) を指標とした。その結果, APO 治療群で到達潜時の短縮 (Fig. 1A), ゴール場所交差回数の増加 (Fig. 1B), およびゴール場所 1/4 の遊泳割合の増加 (Fig. 1C) がみとめられた。APO 治療で明確に改善したマウスの治療前後の probe 解析の遊泳軌跡を提示する (Fig. 1D)。

その後, マウス脳組織を採取し, 免疫染色および WB をおこなった。免疫染色では, APO 治療マウスの海馬・皮質の神経細胞内の Aβ, p-tau, p53, heme oxygenase 1 (HO1) が明

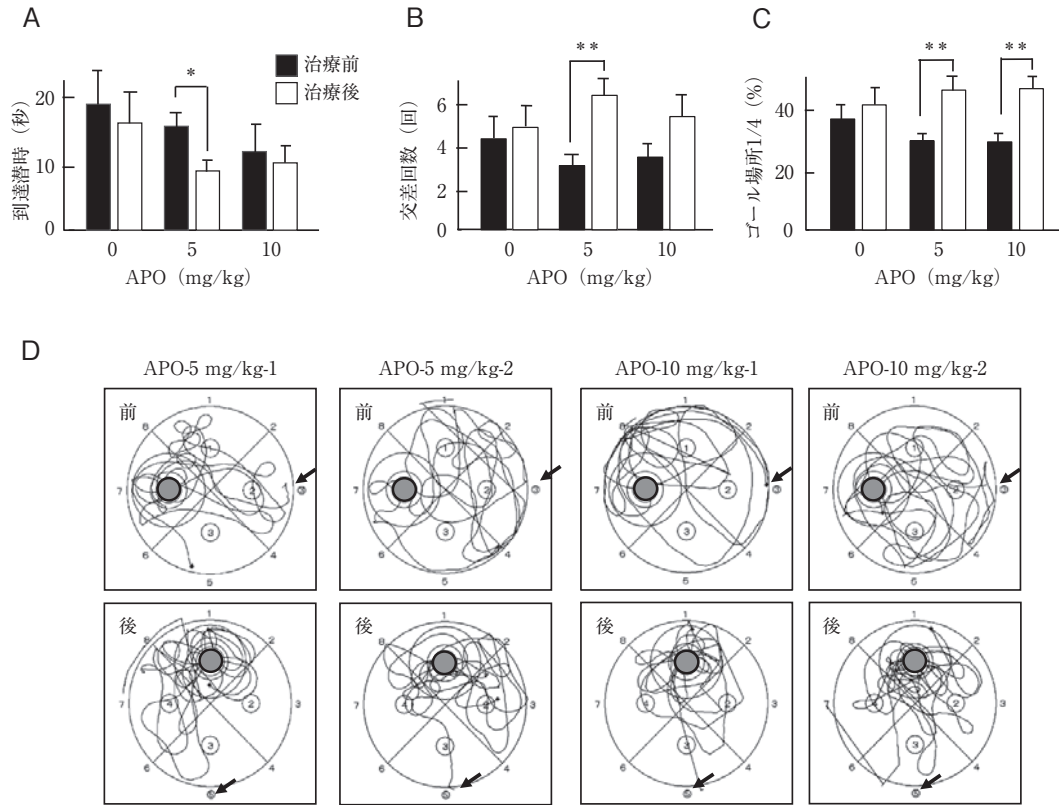


Fig. 1 APO 治療前後のモリス水迷路解析 (probe 試験)。

A) ゴール場所初回到達時 (秒); B) ゴール場所交差回数 (回); C) ゴール場所 1/4 遊泳割合 (%); D) APO 有効マウスの治療前後の遊泳軌跡. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 各群 $n = 8$. APO 治療による空間記憶力の改善が示唆された。

確に低下していた (Fig. 2A)。また、免疫沈降 + WB 解析 (A β) および WB 解析 (p-tau, p53, HO1) でも APO 治療マウスで有意に低下しており、免疫染色の結果に矛盾しなかった (Fig. 2B)。p53 および HO1 レベルは過剰な酸化ストレス状態を反映しており、APO 治療による AD 病理の改善および酸化ストレスの低下が示唆された。

APO の glutathione peroxidase (GPx) 活性上昇による酸化ストレス抑制

APO は培養 SH-SY5Y 細胞において H₂O₂ による細胞死を明確に抑制したが、他のアポトーシス誘導薬剤の staurosporine, etoposide, MG132, thapsigargin のアポトーシスでは APO の保護作用をみとめなかった。H₂O₂ は GPx や catalase により H₂O に転換される。GPx, glutathione reductase (GR) および catalase の特異的阻害剤をもちいて抑制試験をおこなったところ、APO の保護効果は GPx および GR 依存性であることが示唆された。さらに、GPx, GR および catalase 活性解析では、APO による GPx 活性の特異的上昇作用がみとめられた。

APO 治療の可能性と今後の展開

われわれは細胞内 A β の重要性に早くから注目してきた。2011 年、われわれは世界ではじめて、APO が細胞内 A β 分解を促進し、AD の記憶障害や病理を改善する可能性がある有望な治療薬候補であることを示した⁴⁾。さらに、APO が GPx 活性を特異的に上昇させることを報告した⁵⁾。APO では Nrf2/ARE 経路を介する細胞保護作用が報告されており⁶⁾、GPx 活性上昇に Nrf2/ARE 経路がかかわっている可能性もある。われわれは APO の抗 AD 効果ではドパミン受容体刺激以外の経路を推定しており、今後その分子経路の解明が必要である。最近、細胞外と細胞内の A β プールは動的平衡状態にあることが近年提唱されており^{7,8)}、APO による細胞内 A β レベル低下は細胞外 A β オリゴマーレベル低下につながることを期待される。

APO の大きな利点として、すでに臨床で使われていることの安全性と、開発費用の低コスト性が挙げられる。今後、AD 患者を対象とする臨床研究を進めていきたい。APO は細胞内 A β を治療標的とする唯一の薬剤候補であり、細胞外 A β オリゴマーを標的とする他の AD 治療薬候補と併用することで、

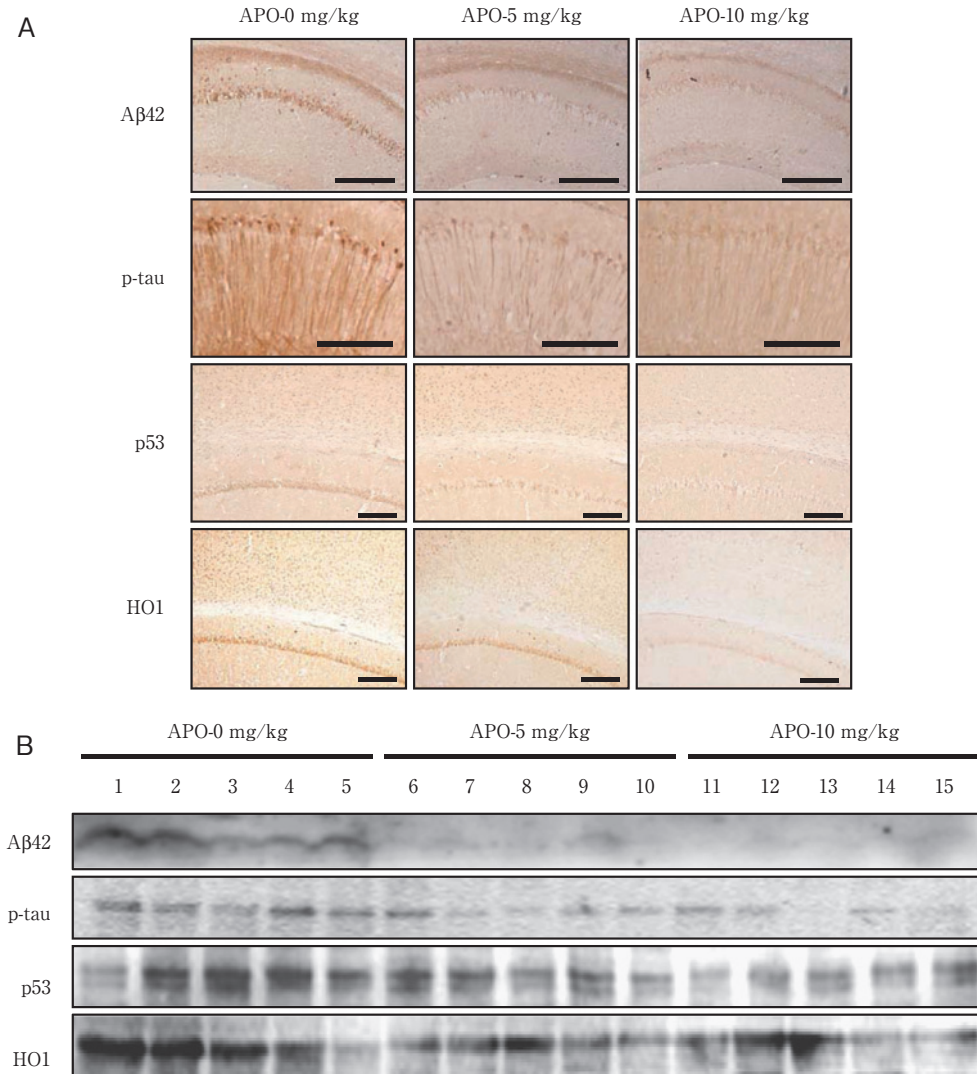


Fig. 2 APO 治療マウス脳組織の免疫染色およびウェスタンブロット (WB).

A) 海馬 CA1 の免疫染色. Bar=100 μ m. B) 免疫沈降 + WB (A β 42) および WB (p-tau, p53, HO1). APO 治療マウスにおける A β 42, p-tau, p53, HO1 レベルの低下が示唆された.

さらに有効性の高い治療法の開発が期待できる.

文 献

- 1) Ohyaig Y, Asahara H, Chui DH, et al. Intracellular A β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *FASEB J* 2005;19:255-257.
- 2) Ohyaig Y. Intracellular amyloid β -protein as a therapeutic target for treating Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2008;5:555-561.
- 3) Billings LM, Oddo S, Green KN, et al. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 2005;45:675-688.
- 4) Himeno E, Ohyaig Y, Ma L, et al. Apomorphine treatment in Alzheimer mice promoting amyloid- β degradation.

Ann Neurol 2011;69:248-256.

- 5) Ma L, Ohyaig Y, Nakamura N, et al. Activation of glutathione peroxidase and inhibition of p53-related apoptosis by apomorphine. *J Alzheimers Dis* 2011;Epub: Jul 28.
- 6) Hara H, Ohta M, Adachi T. Apomorphine protects against 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway. *J Neurosci Res* 2006;84:860-866.
- 7) Oddo S, Caccamo A, Smith IF, et al. A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A β . *Am J Pathol* 2006;168:184-194.
- 8) LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:499-509.

Abstract**A drug targeting intracellular amyloid-β and oxidative stress: Apomorphine**

Yasumasa Ohyagi, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Alzheimer's disease (AD) is the major cause of dementia in the elderly people. In the molecular pathogenesis of AD, toxicity of secreted amyloid-β protein (Aβ), especially Aβ oligomers, is considered to play a pivotal role. While, we have long been focused on intraneuronal Aβ as a therapeutic target in AD. Intraneuronal Aβ accumulation is found in the early stage of AD neurons, and may be quite toxic and pathogenic. Recently, we have found apomorphine (APO), a kind of dopamine receptor agonists, to promote the intracellular Aβ degradation activating the Aβ-degrading enzymes, proteasome and insulin-degrading enzyme (IDE). We then found that APO treatment improved memory function and AD-related pathology in an AD mouse model, 3xTg-AD mice. Moreover, APO protected against oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. We further investigated effects of APO on cellular anti-oxidative stress system, and found that APO activated glutathione peroxidase (GPx) specifically. Thus, APO may be a promising drug for the cure of AD and clinical trials are necessary in the future. In addition, further investigation to understand the molecular mechanism associated with the APO effect greatly contributes to the development of new drugs for AD.

(Clin Neurol 2011;51:884-887)

Key words: Alzheimer's disease, 3xTg-AD mouse, apomorphine, amyloid-β protein, oxidative stress
