

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007 年-2008 年  
 課題番号：19590545  
 研究課題名 (和文) インスリン抵抗性糖尿病のアルツハイマー病加速機序に関する行動薬理学的研究  
 研究課題名 (英文) Pharmacological studies in accelerating mechanism of Alzheimer's disease by diabetes mellitus with insulin resistance in rats  
 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：アルツハイマー病の原因物質の 1 つと考えられているアミロイド  $\beta$  タンパク質 ( $A\beta$ ) を糖尿病モデル動物である GK ラットの脳室内に投与すると学習障害が発現した。 $A\beta$  脳室内投与による学習障害は、糖尿病によるインスリン抵抗性、または高血糖により増悪することが分かった。さらに本研究により糖尿病は合併症としての循環障害によりアルツハイマー病を加速するのみならず、脳内でインスリン抵抗性を作り出す神経膜のマイクロドメインでのインスリンシグナル伝達機構の変調が病態の加速に深く関わることを示唆した。さらに今回作成した動物モデルは臨床像を反映した新たなアルツハイマー病モデル動物として有用であり、これまでにない新しいタイプのアルツハイマー病治療薬の探索に応用できる可能性も示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：アルツハイマー病、インスリン受容体、マイクロドメイン、アミロイド  $\beta$ 、インスリン抵抗性、ガングリオシド、薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

我が国は男女の平均寿命が 80 歳を超える世界でも有数の長寿国である。それゆえ国民総人口に占める老人人口の割合は増加の一途

を辿っている。これは医学の発展に起因するのは言うまでもないが、その反面、複雑な社会現象はこれまでにない精神的ストレスを生み出し、食生活の向上や運動不足がこれに

加わりいわゆる2型糖尿病などの生活習慣病を蔓延させている。また、老年期疾患の中でアルツハイマー病は近年その発症率が急上昇した疾患であるが、前述したような我が国の食生活や社会生活の中では、この疾患の背景にも生活習慣病が潜んでいることは間違いない。

生活習慣病の中でも糖尿病は重篤な合併症を引き起こすことで知られている疾患である。糖尿病患者がアルツハイマー病やその他の認知症を罹患しやすいことはよく知られているが、その理由に関しては定説がなく、合併症としての脳血管障害がその原因として考えられていた。また、培養細胞を用いた実験では、糖尿病を想定した、高血糖、低インスリン環境下ではアルツハイマー病の原因蛋白の1つである $\beta$ -アミロイド ( $A\beta$ ) の凝集を抑制するという結果が多く、糖尿病をアルツハイマー病の危険因子とする臨床との間に大きな矛盾点を露呈していた。

ところが、最近になって、インスリン受容体が脳内にも存在することが明らかになり、長期間の高血糖によりインスリン抵抗性を発現した糖尿病患者では、アルツハイマー病の発症頻度が高まることが分かった (ロッテルダムスタディー)。このような患者ではインスリンは十分にある (高インスリン) が、インスリン受容体機能が大きく低下していわゆるインスリン抵抗性によりグルコースの取り込みが阻害されていたのである。

インスリン受容体は末梢では細胞膜のマイクロドメインと呼ばれる部位に存在する。脳内でも神経細胞膜のラフト・マイクロドメインに存在することが報告された。神経細胞のラフト・マイクロドメインは、インスリン受容体機能のみならず、コレステロールを組み込んでアルツハイマー病における  $A\beta$  の切り出しに深く関わる部位でもある。このこと

は、糖尿病とアルツハイマー病を結びつける大きな接点であり、本研究の標的となる部位になった。これに関して柳沢らは、マイクロドメイン上のガングリオシド  $GM1$  がシード (種) になり  $A\beta$  の凝集を加速することを見いだした。さらに、井ノ口らがマイクロドメイン上のガングリオシド  $GM3$  が過剰に発現することによりインスリン受容体が機能を失いインスリン抵抗性を発することを突き止めた。ここにマイクロドメインを中心にインスリン抵抗性とガングリオシドそしてアルツハイマー病の3つが糖尿病がアルツハイマー病の危険因子になる機序の焦点部位である可能性がでてきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経膜のマイクロドメインにおけるインスリン受容体機能の低下が、 $A\beta$  分泌および凝集過程に影響を及ぼす影響を調べることにより、インスリン抵抗性糖尿病がアルツハイマー病を増悪する機序を明らかにし、新たなマイクロドメイン矯正薬をアルツハイマー病の治療薬として開発することを目的とするものである。

## 3. 研究の方法

(1) GK ラットの糖尿病状態の確認

### ① 糖負荷試験

一晩絶食した9週齢のGKラットおよび同週齢のWistarラットに2 g/kg glucoseの経口糖負荷を行った。採血は糖負荷直前、糖負荷後30、60、120分に行った。

### ② インスリン負荷試験

4時間絶食したGKラットおよび同週齢のWistarラットに0.75 unit/kg insulinを腹腔内投与した。採血はインスリン負荷直前、インスリン負荷後60、120、180分に行った。

(2)  $A\beta$  脳室内注入ラットの作製および学習評

価

#### ①Oligomeric A $\beta$ の調製方法

A $\beta$  (1-42) : A $\beta$  (1-40)を 1 : 10 の割合で混合し、37°Cで 2.5 時間インキュベートしたものを、oligomeric A $\beta$ とした。電子顕微鏡で形態学的特徴を、Western blot 法でその凝集を確認した。

#### ②脳室内投与用ガイドカニューレ留置

9 週齢の GK ラットおよび対照として同週齢の Wistar ラットを用いた。ラットを pentobarbital sodium 50 mg/kg の腹腔内投与による麻酔下に脳定位固定装置に固定し、側脳室に長さ 13 mm、内径 22 ゲージのステンレススチール製のガイドカニューレを埋め込んだ。

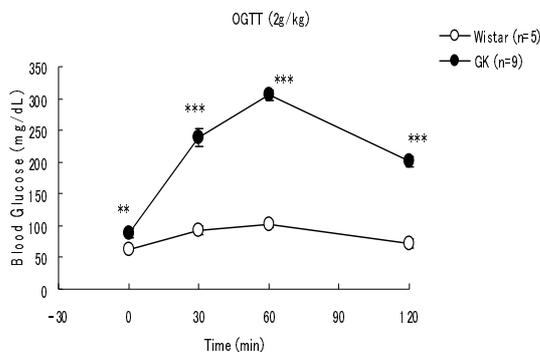
#### ③A $\beta$ 脳室内投与および学習評価

1 週間の術後回復期間を設けた後に、①で調整した oligomeric A $\beta$ を、留置した脳室内投与用ガイドカニューレから、1 日 1 回、7 日間反復投与した後に Morris 水迷路課題による学習評価を 9 日間にわたり行った。A $\beta$ の投与量は 1 回につき 10  $\mu$ l ずつ両側の脳室内に計 20  $\mu$ l (Oligomeric A $\beta$ として 200 pmol) を投与した。また、最終評価から 14 日後に記憶保持の評価を行った。

## 4. 研究成果

### (1)GK ラットの糖尿病状態

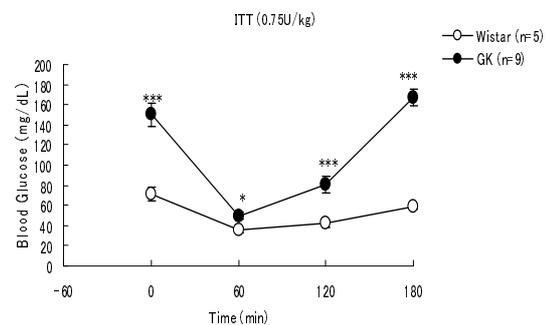
#### ①GK ラットの耐糖能異常



糖負荷試験時の GK ラットの血糖値は糖負荷前、糖負荷後 30、60、120 分のいずれの時点でも対照群の Wistar ラットと比べて高く、GK ラットは耐糖能異常を示すことが確認された。

#### ②GK ラットのインスリン抵抗性

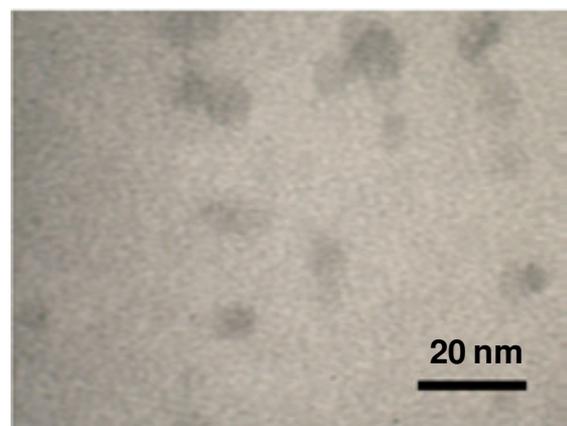
インスリン負荷試験時の GK ラットの血糖値はインスリン負荷前、インスリン負荷後 60、120、180 分のいずれの時点でも対照群の Wistar ラットと比べて高く、GK ラットはインスリン抵抗性を示すことが確認された。



### (2)A $\beta$ 脳室内注入ラットの作製および学習評価

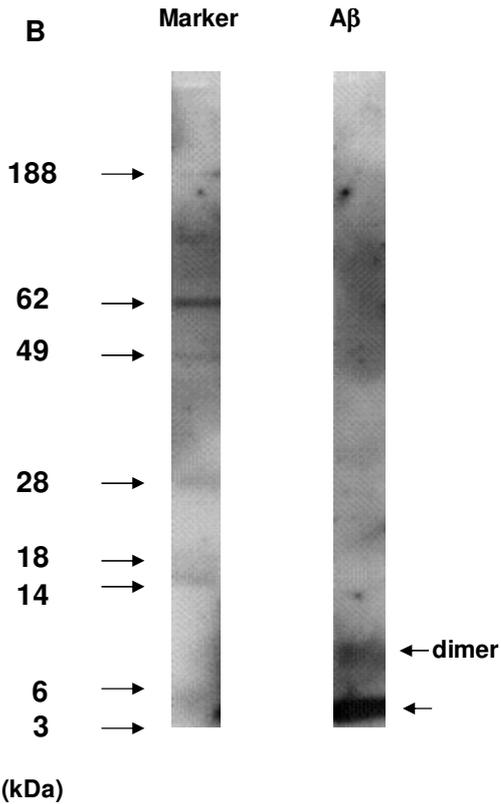
#### ①Oligomeric A $\beta$ の形態の確認

調整した Oligomeric A $\beta$ の形態を電子顕微鏡で確認したところ、球状の凝集体を形成し



ていることが確認された。

また、Western blot 法でその凝集を確認したところ、二量体が主となっていることが確

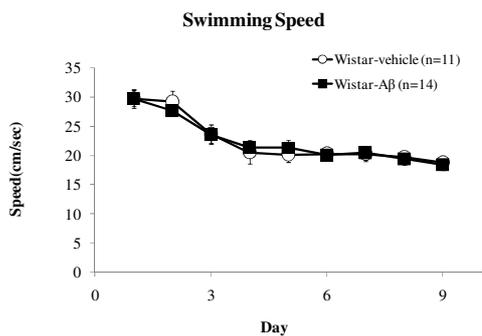


認された。

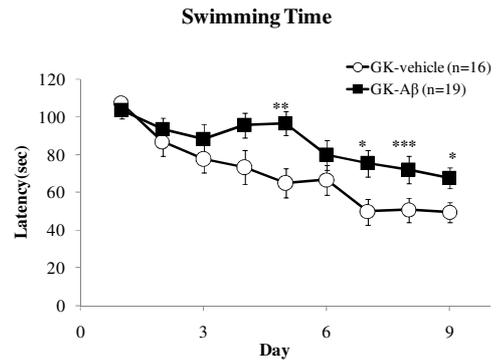
### (3) 水迷路課題を用いた学習評価

#### ① 記憶獲得過程

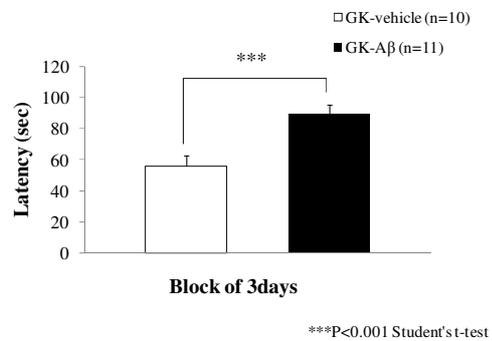
Wistar ラットに A $\beta$  を脳室内投与しても、その後の水迷路課題における記憶獲得過程に影響はなかった (下図)。



GK ラットに A $\beta$  を脳室内投与したところ、水迷路課題における記憶獲得は 8 日目に有意に障害された (右上図)。



また、記憶獲得から 14 日間経過した後の GK ラットの記憶保持能も A $\beta$  の脳室内投与により有意に障害されていた (下図)。



#### (4) 本研究の結論と展望

本研究により、糖尿病モデル動物である GK ラットの脳室内に Oligomeric A $\beta$  を注入することで、空間認知障害が発現することが明らかとなった。この結果は、疫学的調査や臨床報告でなされているように、糖尿病がアルツハイマー病の加速因子であることが強く示唆される結果である。しかしながら、その原因となるメカニズムを明らかとすることはできなかった。

一つの可能性として、GK ラットの脳内のインスリンシグナル伝達機構の障害が、A $\beta$  微量注入による A $\beta$  蓄積を促進する方向に働いたこと、またインスリンシグナル下流に位置する GSK3- $\beta$  によりタウタンパク過剰リン酸化の発現が起こることが学習障害の発現に関わっているのではないかと考えられる。しかしながら、他の報告では膵臓  $\beta$  細胞

を選択的に破壊するストレプトゾトシンを投与して高血糖状態としたマウスに、 $A\beta$ を海馬実質内に投与したアルツハイマー病病態モデル動物でも、水迷路課題で学習障害が確認されている。このように、糖尿病病態生理である高血糖が酸化ストレスに繋がり、アポトーシスの発現が生じたとの報告もある。このように、糖尿病病態生理である高血糖か、インスリン抵抗性のいずれかが、またはその両方が学習障害に関与しているかは、未だ明らかではない。

今後は脳内インスリン抵抗性、脳内ラフト・ガングリオシドの異常などの検知を行い、さらなる研究の発展に努めたい。

## 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1件)

①清水 芳香、糖尿病を合わせ持つアルツハイマー病モデル動物の作製と行動特性に関する研究、福岡大学薬学集報、査読有、第9巻、2009年、207-208

[学会発表] (計3件)

①橋本 勇作、インスリン抵抗性糖尿病がアルツハイマー病を加速する要因に関する研究、第10回ブレインサイエンス研究会、2008年6月1日、福岡

②岩崎 克典、高崎 浩太郎、清水 芳香、吉川 弥里、高島 明彦、藤原 道弘、インスリン抵抗性を示す糖尿病ラットを用いたアルツハイマー病モデル動物の作製、福岡大学高機能物質研究所成果報告会、2007年1月24日、福岡、

③Yoshika Shimizu, Katsunori Iwasaki, Shin Ishikane, Kotaro Takasaki, Takuya Watanabe,

Nobuaki Egashira, Kenichi Mishima, Michihiro Fujiwara, Involvement of brain insulin resistance and learning and memory disturbances in an animal model of Alzheimer's disease、37th ANNUAL MEETING SOCIETY FOR NEUROSCIENCE (San Diego, USA), November3-7, 2007

## 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

・藤原 道弘 (FUJIWARA MICHIIRO)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：10091331

・井ノ口 仁一 (JIN-ICHI INOKUCHI)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70131810

・三島 健一 (KENICHI MISHIMA)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：00320309

### (3)連携研究者

無し