

機関番号：13101
研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2008 ～ 2010
課題番号：20590990
研究課題名 (和文) インスリンシグナル破綻がアルツハイマー病の分子病態に及ぼす影響
研究課題名 (英文) A role of insulin signal impairment in the pathogenesis of Alzheimer disease
研究代表者
池内 健 (IKEUCHI TAKESHI)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：20372469

研究成果の概要 (和文)：

糖尿病に伴うインスリン抵抗性はアルツハイマー病 (AD) の危険因子として知られている。インスリンシグナルの破綻が AD 病態に与える分子機序を明らかにする目的で本研究を実施し、次の知見を得た。1) 培養細胞外液にインスリンを添加すると β アミロイド ($A\beta$) が増加する、2) 細胞外に過剰 $A\beta$ が存在すると異常リン酸化タウが誘導される、3) 過剰 $A\beta$ 存在下ではインスリンシグナル伝達が障害される。これらの知見から、高インスリン血症は AD 病態を加速させ、AD で生じている $A\beta$ 依存性異常タウリン酸化にインスリンシグナル伝達不全が関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Insulin resistance caused by diabetes is now recognized as risk factor of Alzheimer disease (AD). We conducted a research to verify a role of insulin signal impairment in AD pathogenesis and here provide following findings. i) increase of insulin in culture medium leads to enhanced production of β -amyloid ($A\beta$). ii) overproduction of $A\beta$ induces abnormal phosphorylation of tau, iii) insulin signal transduction is impaired by overproduction of $A\beta$. These findings suggest that heperinsulinemia may accelerates AD pathogenesis and insulin signal transduction may play a role in $A\beta$ -induced tau phosphorylation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：認知症学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：アルツハイマー病，認知症，糖尿病，インスリンシグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の病態として注目されているイン

スリン抵抗性とアルツハイマー病の関連が国内外の疫学研究により明らかにされており、インスリン抵抗性はアルツハイマー病の重要な危険因子として認識されている。しかしながら、インスリン抵抗性がアルツハイマー病の発病あるいは病態促進に関与する具体的事象に関する解析は十分ではなかった。その理由の一つとしては、分子病態としてインスリン抵抗性とアルツハイマー病を関連づけるスキームが不足していたことが挙げられる。

2. 研究の目的

インスリン受容体を介したインスリンシグナル伝達の破綻と、Akt-GSK3 β カスケードを介したタウのリン酸化に焦点をあてインスリン抵抗性とアルツハイマー病の分子病態を結びつける分子病態を明らかにする。

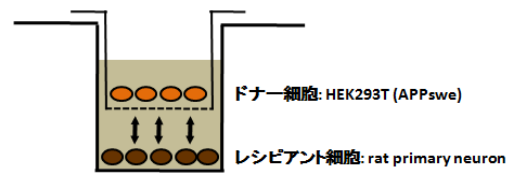
3. 研究の方法

アミロイド前駆体タンパク (APP) を安定発現する Neuro2a 細胞に異なる濃度のインスリンを培養液に添加し、培養液中の β -amyloid ($A\beta$) の量をウエスタンブロットおよびサンドイッチ ELISA にて解析した。

次に、 $A\beta$ 産生亢進 \rightarrow 異常タウリン酸化を再現できる培養細胞アッセイ系を構築した。このアッセイ系は、宿主細胞に APP を過剰発現する HEK293 細胞を、レシピエント細胞に内在性タウを発現するラット初代神経培養細胞とする共培養システムである (図 1)。共培養後にレシピエント細胞ライセイトを用いてリン酸化タウ抗体 (AT-8)、非リン酸化タウ抗体 (Tau-1)、総タウ抗体 (Tau-5) を用いて内在性タウリン酸化を評価した。

またインスリン刺激後の Akt, GSK3 β のリン酸化を免疫ブロットで検討することによりインスリンシグナル伝達を評価した。

図1. 新しい共培養システムの構築

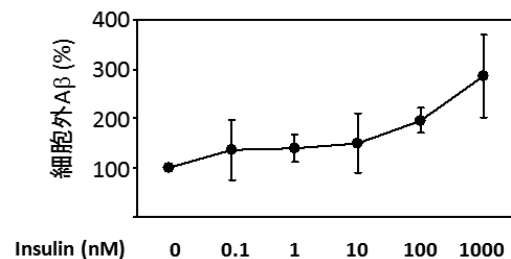


4. 研究成果

(1) 高インスリン状態が $A\beta$ に及ぼす影響。

APP を安定発現する N2a 細胞の細胞外液に 0~1000nM のインスリンを添加し、24 時間後の培養液中の $A\beta$ を ELISA にて定量した。培養液中の $A\beta$ は、インスリンの濃度依存性に増加した (図 2)。

図2. インスリン濃度依存性の $A\beta$ 産生増加



(2) $A\beta$ 依存性タウリン酸化の誘導

宿主細胞にスウェーデン型 APP 変異を発現させ細胞外 $A\beta$ を増加させた共培養状態でレシピエント細胞 (ラット初代神経細胞) の内在性タウリン酸化を検討した。AT-8 で検出されるリン酸化タウは過剰 $A\beta$ 存在下で増加した。一方、非リン酸化タウ、総タウは過剰 $A\beta$ 存在下でも変化を示さなかった。 $A\beta$ 産生を阻害する γ セクレターゼ阻害剤 (compound E 50 nM) を添加すると、リン酸化タウの誘導は抑制された。

(3) $A\beta$ 依存性タウリン酸化におけるインスリンシグナル伝達

異常タウリン酸化を誘導する過剰 $A\beta$ を産生するドナー細胞との共培養状態で、インスリン 1 μ M を培養液に炭化しインスリンシグナ

ル伝達経路にある Akt (Ser473), GSK3 β (Ser 9) のリン酸化を検討した。A β を過剰に産生するホスト細胞との共培養においては、コントロール・ホスト細胞 (mock) と比較してリン酸化 Akt, リン酸化 GSK3 β の活性化が抑制されていた。

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 7 件)

- 1) Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Ebinuma H, Takubo K, Kaneko H, Kasuga K, Kakita A, Takahashi H, Bujo H, Saito Y, Nishizawa M. Dementia Geriat Cogn Disord 査読有 30:28-32, 2010
- 2) Fu Y, Nishihira Y, Kuroda S, Toyoshima Y, Ishihara T, Shinozaki M, Miyashita A, Piao YS, Tan CF, Tani T, Koide R, Iwanaga K, Tsujihata M, Onodera O, Kuwano R, Nishizawa M, Kakita A, Ikeuchi T, Takahashi H. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration, parkinsonism and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity. Acta Neuropathologica 査読有 120:21-32, 2010
- 3) Kasuga K, Tokutake T, Ishikawa A, Uchiyama T, Tokuda T, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Differential levels of α -synuclein, β -amyloid, and tau in cerebrospinal fluid between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 査読有 81:608-610, 2010
- 4) Okazaki K, Fu Y-J, Nishihira Y, Endo M, Fukushima T, Ikeuchi T, Okamoto K, Onodera O, Nishizawa M, Takahashi H. Alzheimer's disease: Report of two autopsy cases with a clinical diagnosis of corticobasal degeneration.

Neuropathology 査読有 30:140-148, 2010

- 5) Kasuga K, Ohno T, Ishihara T, Miyashita A, Kuwano R, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Depression and psychiatric symptoms preceding onset of dementia in family with early-onset Alzheimer disease with novel *PSEN1* mutation. Journal of Neurology 査読有 256:1351-1353, 2009
- 6) Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of independent APP locus duplication in Japanese patients with early-onset Alzheimer disease. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 査読有 80:1050-1052, 2009
- 7) Yanagida K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Kodama TS, Nishitomi K, Jiang J, Mori K, Tatsumi S, T Arai T, Ikeuchi T, Kasuga K, Tokuda T, Masaki Kondo M, Masaki Ikeda M, Kentaro Deguchi K, Hiroaki Kazui H, Tanaka T, Morihara T, Hashimoto R, Kudo T, Steiner H, Haass C, Tsuchiya K, Akiyama H, Kuwano R, Takeda M. The 28-amino acid form of an APLP1-derived A β -like peptide is a surrogate marker for A β 42 production in the central nervous system. EMBO Molecular Medicine 査読有 1:223-235, 2009

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 池内健, 春日健作, 宮下哲典, 川瀬康裕, 杉下守弘, 桑野良三, 西澤正豊. 健忘主体の臨床徴候を呈するタウ遺伝子 R406W 変異を伴う家族性認知症. 第 51 回日本神経学会 2010 年 5 月 20 日, 仙台
- 2) 矢島隆二, 池内健, 春日健作, 徳武孝允, 西澤正豊. *APOE* ϵ 4(+)群と ϵ 4(-)群との臨床経過, 側頭葉内側部萎縮, 髄液バイオマーカーの比較. 第 51 回日本神経学会

- 2010.5.22 東京
- 3) 徳武孝允, 池内健, 春日健作, 篠崎 真, 小野寺理, 西澤正豊. β アミロイド依存性タウリン酸化カスケードにおけるインスリンシグナル障害の関与. 第 51 回日本神経学会 2010.5.20 東京
- 4) 徳武孝允, 春日健作, 矢島隆二, 石川厚, 内山剛, 徳田隆彦, 西澤正豊, 池内健. レビー小体型認知症 (DLB) の新規バイオマーカー: 髄液 α シヌクレインの ELISA 定量. 第 29 回日本認知症学会学術集会 2010.11.5 名古屋
- 5) 池内健, 平山哲, 三井田孝, 深町勇, 矢島隆二, 徳武孝允, 春日健作, 金子博之, 田久保耕平, 海老沼宏幸, 武城英明, 西澤正豊. アルツハイマー病患者・髄液中では可溶性 LR11 が増加する. 第 29 回日本認知症学会学術集会 2010.11.5 名古屋
- 6) 池内健, 春日健作, 野崎洋明, 石原智彦, 金子博之, 篠崎 真, 桑野良三, 小野寺理, 西澤正豊. 遺伝子変異を伴った家族性アルツハイマー病の表現形の比較. 第 50 回日本神経学会 口演発表 2009.5.22 仙台
- 7) 春日健作, 池内健, 石川 厚, 徳田隆彦, 中川正法, 小野寺理, 西澤正豊. 認知症性疾患の髄液バイオマーカーとしての α シヌクレインの検討. 第 50 回日本神経学会 口演発表 2009.5.24 仙台
- 8) 池内健, 春日健作, 宮下哲典, 川瀬康裕, 小野寺理, 杉下守弘, 桑野良三, 西澤正豊. 健忘主体の特異な臨床型を呈したタウ遺伝子 (MAPT) R406W 変異を伴う家族性認知症の臨床分子遺伝学的解析. 第 28 回日本認知症学会 2009.11.21 仙台
- 9) 野崎洋明, 石平悠, 金子博之, 豊島靖子, 柿田明美, 高橋均, 小野寺理, 西澤正豊, 池内 健. レビー小体の大脳皮質における α シヌクレイン蓄積と SNCA mRNA 発現

の検討. 第 28 回日本認知症学会 2009.11.21 仙台

- 10) 春日健作, 徳武孝允, 篠崎 真, 西澤正豊, 小野寺理, 池内健. $A\beta$ はインスリンシグナルを障害することでタウの過剰リン酸化を引き起こすか? 第 28 回日本認知症学会 2009.11.20 仙台

- 11) 篠崎 真, 金子博之, 春日健作, 徳武孝允, 小野寺理, 西澤正豊, 池内健. アルツハイマー病関連・ β アミロイド ($A\beta$) 配列内変異が $A\beta$ 産生および高次構造に及ぼす影響. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009.12.11. 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

池内 健 (IKEUCHI TAKESHI)

研究者番号：20372469

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし