

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591053

研究課題名(和文)

脳インスリン抵抗性による認知障害の防止に向けたリピッドホスファターゼの意義の解明

研究課題名(英文)

Role of lipid phosphatase in brain insulin resistance related to neuroprotection and memory function

研究代表者

笹岡 利安 (SASAKA TOSHIYASU)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：00272906

研究成果の概要(和文)：

インスリン抵抗性が2型糖尿病に伴うアルツハイマー型認知障害を引き起こす機序は不明である。インスリン作用を負に調節するリピッドホスファターゼ SHIP2 は、2型糖尿病モデル db/db や加齢マウスの脳で発現上昇することを見出した。SHIP2 過剰発現マウスでは、脳内インスリンシグナルの減弱と神経細胞死の増大を認め、本マウスと db/db マウスは記憶学習能の低下を呈した。SHIP2 阻害剤の脳室内投与はこれらの異常を効果的に改善したことから、新たな認知障害の治療薬としての開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：

Although brain insulin resistance is a cause of cognitive impairment associated with type 2 diabetes and Alzheimer's disease, the precise underlying mechanism is largely unknown. In the present study, we found that lipid phosphatase SHIP2, a negative regulator of insulin signaling, is increased in the brain of type 2 diabetic db/db and aged mice. Mice overexpressing SHIP2 exhibited impaired memory performance with disrupted insulin signaling and increased apoptosis in the brain. Importantly, inhibition of SHIP2 ameliorated the impairment of hippocampal synaptic plasticity and memory formation in db/db mice. These results suggest that inhibition of SHIP2 is a novel therapeutic approach in brain dysfunction related to insulin resistance with type 2 diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：糖尿病・内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー・糖代謝異常、インスリン作用、認知機能、ホスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化や運動不足などの生活習慣の変化に伴い、肥満、特に内臓脂肪蓄積を伴うことでインスリン抵抗性が生じ、耐糖能

異常を経て、2型糖尿病が発症する。わが国での糖尿病罹患人口は現在 890 万人であり、増加の一途を辿っている。糖尿病患者の増加に伴い、慢性合併症の増加が Quality of Life

と医療経済の両面から社会問題となっている。さらに、高齢化社会を迎えた本邦で増大する社会問題として認知障害があげられる。糖尿病患者での認知障害は、元来、大血管障害に伴う脳梗塞の結果生じると考えられていたが、この機序とは独立に、脳でのインスリン抵抗性に伴う神経変性をきたし、アルツハイマー型認知障害の発症が高まること、最近の疫学調査で報告されており、病態の解明に基づいた適切な対策の確立が求められている。

## 2. 研究の目的

脳神経系でのインスリン抵抗性を改善して神経変性を防止する効果的な方策を確立することが重要であるが、脳神経系におけるインスリンシグナルの負の制御機構はほとんど明らかにされていない。脳特異的インスリン受容体欠損マウスは、全身でのインスリン抵抗性を伴った耐糖能異常を呈することに加え、神経変性に関連した **Tau** 蛋白のリン酸化の亢進を呈することから、脳でのインスリン作用メカニズムと制御システムを解明することは重要である。末梢インスリン標的組織において、リピッドホスファターゼ **SHIP2-Containing Inositol 5'-Phosphatase 2 (SHIP2)** はインスリンの代謝シグナルに重要な **PI3-キナーゼ** 産物である **PI(3,4,5)P<sub>3</sub>** を **PI(3,4)P<sub>2</sub>** に加水分解することでインスリンシグナルを負に調節する制御因子である。2型糖尿病モデルマウス **db/db** では骨格筋や脂肪細胞において **SHIP2** の発現が亢進し、2型糖尿病患者においても **SHIP2** の発現亢進を引き起こす遺伝子多型が報告されている。しかし、リピッドホスファターゼ **SHIP2** の発現の病態での変化が脳インスリンシグナルの制御や脳の高次機能に及ぼす影響は不明である。そこで本研究では、脳神経系の **SHIP2** が記憶学習の認知機能に及ぼす影響とその阻害効果を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験試薬：

Human regular insulin (Humalin R) は Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) より提供を受けた。モノクローナル抗 Akt1 抗体は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)、ポリクローナル抗 Thr<sup>308</sup> および Ser<sup>473</sup> phospho-Akt 抗体は Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) より購入した。AS1949490 は Suwa らの方法にしたがって作製した (Suwa et al., 2009)。その他の試薬は Wako Pure Industries (Osaka) または Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA) より購入した。

### (2) 実験動物：

当研究室で作製した SHIP2 過剰発現 (Tg) マウスを C57BL/6J (CLEA Japan, Inc., Tokyo) と交配し、F2 から F6 世代の雄性マウスを実験に用いた。また、BKS. Cg-m+/m+/J (m+/m+)、BKS. Cg-m+/m+Lepr<sup>db</sup>/J および BKS. Cg-+Lepr<sup>db</sup>/+Lepr<sup>db</sup>/J (db/db) マウス (Charles River Japan, Inc., Yokohama) を使用した。動物は富山大学生命科学先端研究センター・動物実験施設で飼育した。飼育室は室温が 24±1°C、湿度は 55±10% に維持されており、12 時間サイクル (7:00 on / 19:00 off) で照明が調節されている。また、食餌は RI 照射済のピコラボロデントを使用した。食餌および水は自由に摂取させた。なお、本実験は富山大学動物実験取扱規定に則り、必要以上の苦痛を動物に与えないように考慮した上で実施した。

### (3) RT-PCR：

m+/m+, db/m+ および db/db マウス (8 週齢) と C57BL/6J マウス (14 週齢と 24-27 ヶ月齢) より脳各組織を採取し、total RNA を抽出した。SHIP2、インスリン受容体、GAPDH の mRNA 量を定量するために、それぞれのプライマーを用いてリアルタイム PCR を行なった。なお、SHIP2 およびインスリン受容体の mRNA 発現量は GAPDH mRNA 量との相対比で表した。

### (4) 脳室内投与方法：

マウスを麻酔した後、脳定位固定装置 SR-6 に固定した。ガイドカニューレを用いてカニューレをマウスの側脳室に挿入した。カニューレ挿入の 1 週間後、マウスを 16 時間絶食させ、vehicle、インスリンあるいは AS1949490 をマウスの側脳室に注入した。

### (5) ウェスタンブロット法：

マウス細胞を PBS で洗浄し、細胞溶解液を加え細胞を剥離した。遠心分離後、細胞溶解液に Laemmli buffer を加え煮沸し、7.5% SDS-PAGE で蛋白質を分子量により展開し、PVDF 膜に転写した。膜を一次抗体で処置後、ECL western blotting detection reagents (GE Healthcare) によりバンドを検出した。

### (6) TUNEL 法：

SHIP2-Tg マウスおよび野生型マウスを麻酔した後、氷冷生理食塩水および 4% paraformaldehyde を還流した。全脳を採取しドライアイスで凍結して、クリオスタットを用いて脳スライスを作製した。アポトーシス時に観察される DNA の断片化を TUNEL 法で検出した。

### (7) 行動実験：

モリス水迷路試験と新奇物体認知試験により、マウスの記憶・学習能を評価した。

(8) 電気生理学的実験 :

m+/m+および db/db マウスより海馬スライスを作製し、vehicle あるいは AS1949490 を含む ACSF で還流した。海馬 CA3 領域のシェファー側枝に電気刺激を与え、海馬 CA1 領域の放射状層における field excitatory postsynaptic potentials (fEPSP) を記憶した。Long-term potentiation (LTP) をテタヌス刺激によって誘導し、その後引き続き fEPSP を記録した。テタヌス刺激の 60 分後において fEPSP の増加が 20% 以上の場合、LTP が誘導されたと定義した。

(9) 統計的解析 :

データは平均値±標準偏差で表示し、2 群の比較の場合には Student's *t* 検定で有意差を検定し、3 群以上の比較の場合には one-way ANOVA および Bonferroni test で有意差を検定した。*P*-value は 0.05 未満を有意とし、検定は StatView J-4.5 software (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行なった。

4. 研究成果

(1) 2 型糖尿病モデル db/db マウスおよび加齢マウスの脳内での SHIP2 mRNA 発現量の変化 :

糖尿病病態や加齢状態では脳内インスリン受容体システムが破綻することが知られている。そこで、脳内の SHIP2 の発現量を検討すると、大脳皮質の SHIP2 mRNA 発現量は m+/m+ マウスと比べて db/m+ マウスでわずかに増加し、db/db マウスで 2.4 倍に増加した。一方、インスリン受容体の発現量には変化を認めなかった。次に、非糖尿病加齢マウス (24-27 ケ月齢) の海馬および大脳皮質における SHIP2 mRNA の発現量は 14 週齢の若年マウスと比べて、それぞれ 2.7 倍および 1.9 倍に増加した。一方、加齢マウスでのインスリン受容体 mRNA 発現量は若年マウスと比べ、有意に低下した。

(2) SHIP2-Tg マウスの海馬と大脳皮質におけるインスリンシグナルの減弱 :

SHIP2 過剰が海馬および大脳皮質のインスリンシグナルに及ぼす影響を検討するため、3-6 ケ月齢の SHIP2-Tg マウスおよび野生型マウスの脳室内にインスリンを投与し、ウェスタンブロット法で Akt のリン酸化を検討した。野生型マウスの海馬および大脳皮質においてインスリンによる Akt のリン酸化を認めたが、SHIP2-Tg マウスでは減弱していた。

(3) 加齢した SHIP2-Tg マウスの脳内におけるアポトーシス陽性細胞数の変化 :

SHIP2 過剰発現がマウス脳神経細胞のアポトーシスに及ぼす影響を、SHIP2-Tg マウスの脳断片におけるアポトーシス細胞数を TUNEL

法により検討した。12-15 ケ月齢の SHIP2-Tg マウスにおけるアポトーシス陽性細胞数は野生型マウスと比べ、大脳皮質では 7.1 倍に増加した。

(4) SHIP2-Tg マウスにおける空間記憶学習能の変化 :

インスリンは認知機能および空間記憶能力の形成や保持に関与することが知られている。SHIP2-Tg マウスでは脳内インスリンシグナルの減弱やアポトーシスの亢進を認めたことから SHIP2-Tg マウスでの記憶学習能を評価した。

モリス水迷路試験での Hidden platform trial において、施行 5 日目における SHIP2-Tg マウスの escape latency は野生型マウスと比べ有意に長かった。また、probe trial においても SHIP2-Tg ではプラットホームが置かれていた位置の横切り回数が有意に低下した。

また、新奇物体認知試験においても、野生型マウスでは novel object に対する探索時間が familiar object に対する探索時間に比べて有意に延長したが、SHIP2-Tg マウスでは novel object に対する探索時間の有意な変化は認められなかった。

以上より、SHIP2-Tg マウスでは記憶学習能が低下していることが示唆された。

(5) db/db マウスの海馬におけるシナプス可塑性の障害に対する SHIP2 阻害剤の影響 :

シナプス伝達の LTP は記憶形成の細胞メカニズムとして知られている。脳での SHIP2 の発現増加が認められた 8 週齢の db/db マウスでは、LTP は誘導されなかった。そこで、SHIP2 の障害が db/db における LTP の障害に及ぼす影響を SHIP2 特異的阻害剤の AS1949490 を用いて検討した。AS1949490 を処置した db/db マウスの海馬スライスにおいて、LTP の持続的な亢進が認められた。

(6) モリス水迷路試験における db/db マウスの空間記憶障害に対する SHIP2 阻害剤による改善効果 :

8-12 週齢の db/db マウスでの hidden platform trial において、db/db マウスは対照の C57BL/6J マウスより顕著に長い escape latency を示した。AS1949490 を脳室内投与した C57BL/6J マウスにおいては escape latency の変化は認められなかった。しかし、AS1949490 を処置した db/db マウスにおいては、escape latency は vehicle を処置した db/db マウスに比べて顕著に減少した。

以上より、脳神経細胞における SHIP2 の過剰はインスリンシグナルを障害し、認知機能障害を誘発することが示された。また、2 型

糖尿病によって引き起こされるシナプス可塑性および記憶・学習の障害は SHIP2 阻害剤により改善した。したがって、糖尿病に伴う認知機能障害の改善に向けた新しい治療戦略として、SHIP2 の阻害が有効である可能性が示唆された。

#### 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 6 件)

- ① Wada T, Hoshino M, Kimura Y, Ojima M, Nakano T, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Both type I and II IFN induces insulin resistance by inducing different isoform of SOCS expression in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology & Metabolism* 300:E1112-1123, 2011. 査読有
- ② Soeda Y, Tsuneki H, Muranaka H, Mori N, Hosoh S, Ichihara Y, Kagawa S, Wang X, Toyooka N, Uwano T, Nishijo H, Wada T, Sasaoka T. The inositol phosphatase SHIP2 negatively regulates insulin/IGF-1 actions implicated in neuroprotection and memory function in mouse brain. *Molecular Endocrinology* 24:1965-1977, 2010. 査読有
- ③ Wada T, Kenmochi H, Miyashita Y, Sasaki M, Ojima M, Sasahara M, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Spironolactone improves glucose and lipid metabolism by ameliorating hepatic steatosis and inflammation and suppressing enhanced gluconeogenesis induced by high-fat and high-fructose diet. *Endocrinology* 151:2040-2049, 2010. 査読有
- ④ Wada T, Hori S, Sugiyama M, Fujisawa E, Nakano T, Tsuneki H, Nagira K, Saito S, Sasaoka T. Progesterone inhibits glucose uptake by affecting diverse steps of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298:E881-888, 2010. 査読有
- ⑤ Wada T, Ohshima S, Fujisawa E, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Aldosterone inhibits insulin-induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 150:1662-1669, 2009. 査読有

⑥ Ikubo M, Wada T, Fukui K, Ishiki M, Ishihara H, Asano T, Tsuneki H, Sasaoka T. Impact of lipid phosphatases SHIP2 and PTEN on the time- and Akt-isoform-specific amelioration of TNF $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology & Metabolism* 296:E157-164, 2009. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 市原克則, 和田努, 添田義行, 石井陽子, 笹原正清, 恒枝宏史, 笹岡利安: 視床下部ニューロンでの SHIP2 の発現が, 摂食シグナルとインスリン感受性, エネルギー代謝に与える影響の解明. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011, 5, 19-21, 札幌.
- ② 村中勇人, 恒枝宏史, 添田義行, 森規彦, 岡本健太郎, 細尾脩史, 市原克則, 和田努, 笹岡利安: 2 型糖尿病モデルマウスの認知機能障害に対するリピッドホスファターゼ SHIP2 阻害剤の改善効果. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2011, 5, 19-21, 札幌.
- ③ 笹岡利安: 加齢に伴うインスリン抵抗性の分子機構. 第 45 回糖尿病学の進歩, 2011, 2, 18-19, 福岡.
- ④ Sasaoka T, Ichihara Y, Soeda Y, Tsuneki H, Wada T.: Overexpression of SHIP2 causes hypothalamic insulin but not leptin resistance in the regulation of glucose homeostasis in mice. *Keystone symposia*. 2011, 1, 12-17, Keystone, U. S. A.
- ⑤ Sasaoka T, Soeda Y, Muranaka H, Mori N, Wada T, Tsuneki H: Impact of the elevation of lipid phosphatase SHIP2 on brain insulin action for the cognitive function in mice. XI International Symposium on Insulin Receptors and Insulin Action. 2010, 10, 28-30, Naples, Italy.
- ⑥ 笹岡利安, 和田努, 恒枝宏史: ホスファターゼと肥満. 第 31 回日本肥満学会 (シンポジウム), 2010, 10, 1-2, 前橋.
- ⑦ Sasaoka T, Ichihara Y, Soeda Y, Tsuneki H, Wada T.: Impact of hypothalamic insulin resistance caused by overexpression of SHIP2 on glucose and energy homeostasis in mice. *American Diabetes Association (ADA) 70th Scientific Sessions*, 2010, 6, 25-29, Orlando, U. S. A.

⑧ 市原克則, 和田努, 添田義行, 恒枝宏史, 笹岡利安: SHIP2 過剰発現による視床下部インスリン抵抗性がマウス個体のエネルギー代謝に与える影響. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010, 5, 27-29, 岡山.

⑨ 村中勇人, 恒枝宏史, 添田義行, 森規彦, 和田努, 笹岡利安: マウス脳におけるリピッドホスファターゼ SHIP2 の異常増加が認知機能に及ぼす影響の解析. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2010, 5, 27-29, 岡山.

⑩ Sasaoka T, Soeda Y, Muranaka H, Mori N, Wada T, Tsuneki H: Impairment of central insulin action in neuronal cell survival and spatial memory in mice overexpressing SH2-containing inositol 5'-phosphatase 2. American Diabetes Association (ADA) 69th Scientific Sessions, 2009, 6, 5-9, New Orleans, U.S.A.

⑪ 添田義行, 恒枝宏史, 村中勇人, 森規彦, 和田努, 笹岡利安: 糖尿病によるマウス脳でのリピッドホスファターゼ SHIP2 発現の異常増加: 神経細胞死および記憶・学習能力に及ぼすインパクト. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009, 5, 21-24, 大阪.

⑫ 市原克則, 和田努, 添田義行, 恒枝宏史, 笹岡利安: 高脂肪食負荷に伴う視床下部 SHIP2 発現増加が視床下部インスリン感受性に与える影響の解析. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会, 2009, 5, 21-24, 大阪.

⑬ 添田義行, 恒枝宏史, 村中勇人, 森規彦, 和田努, 笹岡利安: マウス脳において糖尿病および加齢によるリピッドホスファターゼ SHIP2 の増加は神経保護機能および記憶・学習機能を破綻させる. 第 82 回日本薬理学会年会, 2009, 3, 16-18, 横浜.

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/clinphar/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笹岡 利安 (SASAOKA TOSHIYASU)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号: 00272906

### (2) 研究分担者

恒枝 宏史 (TSUNEKI HIROSHI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・准教授

研究者番号: 20332661