

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790244

研究課題名(和文) インスリン/インスリン様成長因子受容体シグナル発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Clarification of insulin/IGF-I receptor signal expression mechanism

研究代表者

根本 隆行(NEMOTO TAKAYUKI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90506833

研究成果の概要(和文): 本研究において申請者は(1) Hsp90 が IRS の発現量を調節していること、(2) GSK-3 活性抑制が Na_v1.7 細胞膜発現に寄与すること、(3) IGF-I 受容体発現が GSK-3 および mTOR を介して homologous に調節されること、(4) Na_v1.7 からの Na⁺細胞内流入 Ca²⁺流入 PI3K-Akt 経路、PKC β -ERK/p38 経路活性化が GSK-3 をリン酸化/不活性化し、その結果 tau の通常リン酸化量を低下させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文): We clarified (1) IRS expression by Hsp90; (2) up-regulation of Na_v1.7 by GSK-3 inhibition; (3) IGF-I-induced homologous regulation of IGF-I receptor expression via GSK-3 and mTOR; and (4) decrease of phosphorylated tau via GSK-3 inhibition by Na⁺ influx-induced activations of PI3K-Akt and PKC β -ERK/p38 pathways.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬理学一般

キーワード：インスリン受容体、IGF-I 受容体、IRS、GSK-3、mTOR、tau、Na_v1.7

1. 研究開始当初の背景

インスリンおよびインスリン様成長因子受容体シグナルは、記憶・学習に広く関与しており、脳の高次機能を維持している。アルツハイマー病やパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経疾患の患者において、インスリン/インスリン様成長因子受容体の減少が顕著にみられる。他方で、インスリンと糖尿病との関係は広く知られているが、近年の研究において、糖尿病患者は健常人に比べて、アルツハイマー病を発症しやすいことがわかってきた。近年、アルツハイマー病の革新的な治療法の1つとして、インスリンの点

鼻投与が注目されており、実際にアルツハイマー病患者において、記憶・学習の改善を認めている。インスリン様成長因子においても、動物実験で同様の効果を認めている(Lancet Neurol. 3:169-178. 2004、Trends Endocrinol Metab. 16:59-65. 2005、Psychoneuroendocrinology. 29:1326-34. 2004、Endocr Rev. 26:916-43. 2005)。細胞レベルにおいて、インスリン/インスリン様成長因子受容体シグナルは、神経回路網を構築(神経突起の軸索と樹上突起への分化、方向性の決定、ミエリン形成)し、さらに維持・修復を促している(Science. 300:502-505。

2003, J Cell Sci. 118:3653-3663. 2005)

2. 研究の目的

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に共通してみられるのが、脳内のインスリン受容体およびインスリン様成長因子受容体の減少である。インスリン/インスリン様成長因子受容体シグナルは、神経の新生・保護を促し、近年では、インスリンおよびインスリン様成長因子の点鼻投与(速やかに髄腔内へ移行する) 静脈内投与が、アルツハイマー病患者の記憶・学習を向上させることがわかってきた。しかし、その細胞内メカニズムについては、未だ不明な点が多い。本研究において、インスリン/インスリン様成長因子受容体シグナル分子の発現調節機構を解明することは、神経変性疾患治療に貢献できるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) ウェスタンブロット法

蛋白量: インスリン受容体、IGF-1 受容体、IRS-1、IRS-2、GSK-3、mTOR、ERK、p38、tau

リン酸化量: Tyr-IGF-1 受容体、Tyr-IRS-1、Tyr-IRS-2、Ser⁹-GSK-3、Ser²⁴⁴⁸-mTOR、Tyr-ERK1/ERK2、Thr/Tyr-p38、Ser³⁹⁶-tau

(2) 結合実験

125I-IGF-1 結合実験

(3) 蛋白合成率解析

35S-メチオニン/システイン メタボリックラベリング

(4) ノーザンブロット法

IGF-1 受容体 mRNA、IRS-1 mRNA、IRS-2 mRNA

(5) Nuclear Run-on Assay

IRS-1/IRS-2 遺伝子転写率

(6) ルシフェラーゼアッセイ

IGF-1 遺伝子転写率測定

(7) ²²Na⁺、⁴⁵Ca²⁺流入測定

4. 研究成果

(1) Hsp90 抑制: IRS 発現変動

ウシ副腎クロマフィン細胞に(神経堤由来)に Hsp90 阻害薬(ゲルダナマイシン、17-AAG)を処置すると、IRS-1 の発現は減少し、逆に IRS-2 の発現は増加した。

それぞれの発現変動は、遺伝子転写の低下および亢進によるものだった。

(2) GSK-3 活性抑制: Nav1.7 細胞膜発現増加

GSK-3 阻害薬(リチウム、SB216763)長期処置は、Nav1.7 細胞膜発現を増加させることにより、ベラトリジン(Na channel 活性化剤)による Na⁺細胞内流入を増加させ、次いで起こる Ca²⁺流入、カテコールアミン分泌を増加させた。

Nav1.7 細胞膜発現増加は、Nav1.7 遺伝子転写亢進によるものだった。

(3) IGF-1 受容体の発現調節機構の解明

ウシ副腎クロマフィン細胞において、IGF-1 刺激は negative feedback により下流シグナル分子 GSK-3 と mTOR を介して IGF-1 受容体の細胞膜発現および蛋白量を減少させた。(図1)

IGF-1 蛋白量減少は、GSK-3 を介した mRNA 崩壊の亢進および蛋白合成の低下、mTOR を介した蛋白合成の低下によるものだった。(図1)

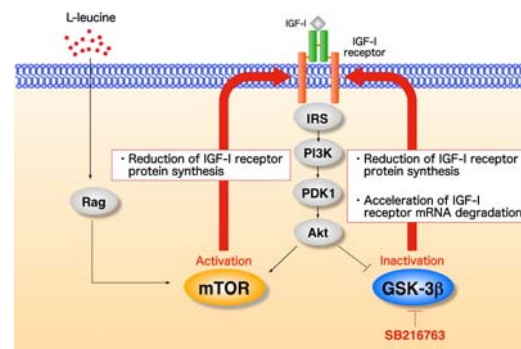


図1 IGF-1 受容体発現減少の機序

(4) Na_v1.7 チャンネルを介した Na⁺流入: tau リン酸化減少

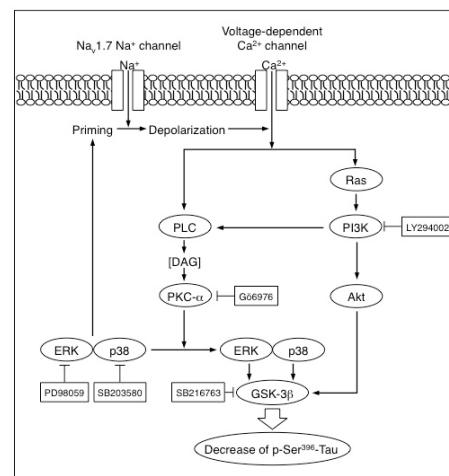


図2 細胞内 Na⁺流入: tau リン酸化減少

Na_v1.7チャンネルを高発現しているクロマフィン細胞において、Na⁺細胞内流入により次いで起こるCa²⁺流入は、PI3K~Akt、PKC-ERK/p38 経路を活性化し、p-Ser⁹-GSK-3 を増加 (GSK-3 活性抑制) させる。(図2)

の結果を受けて、GSK-3 の基質蛋白質である tau のリン酸化は減少する。(図2)

ERK および p38 の構成的なリン酸化を減少 (活性低下) させるとベラトリジンによる Na_v1.7 を介した Na⁺流入量は低下する。(図2)

IGF-1 受容体、IRS、GSK-3、Na_v1.7 はいずれも神経の形成過程において非常に重要な役割を担っており、本研究の成果(1)~(4)は今後、神経精神疾患 (神経形成異常) 治療応用 に貢献できうるものと考えられる。

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)

Nemoto T., Miyazaki S., Yanagita T., Wada A. et al (8名中1番目)

Na_v1.7-Ca²⁺ influx-induced increased phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 attenuate tau phosphorylation via glycogen synthase kinase-3 \cdot : priming of Na_v1.7 gating by ERK and p38.

European Journal of Pharmacology, 査読有、640巻、2010、20-28

Nemoto T., Yanagita T., Wada A. et al (8名中1番目)

Homologous posttranscriptional regulation of insulin-like growth factor-1 receptor level via glycogen synthase kinase-3 \cdot and mammalian target of rapamycin in adrenal chromaffin cells: effect on tau phosphorylation. *Neuropharmacology*, 査読有、58巻、2010、1097-1108

根本隆行、柳田俊彦、和田明彦

Glycogen synthase kinase-3、査読有、135巻、2010、171-172

Yoshikawa N., Nemoto T., Yanagita T., Chosa E., Wada A. et al (7名中2番目)

Distinct regulation of insulin receptor substrate-1 and -2 by 90-kDa heat-shock protein in adrenal chromaffin cells. *Neurochemistry International*, 査読有、56巻、2010、42-50

Yanagita T., Nemoto T., Wada A. et al (10名中3番目)

Chronic lithium treatment up-regulates cell surface Na_v1.7 sodium channels via inhibition of glycogen synthase kinase-3 in adrenal chromaffin cells: enhancement of Na⁺ influx, Ca²⁺ influx and catecholamine secretion after lithium withdrawal. *Neuropharmacology*, 査読有、57巻、2009、311-321

Kanai T., Nemoto T., Yanagita T., Wada A. et al (7名中2番目)

Na_v1.7 sodium channel-induced Ca²⁺ influx decreases tau phosphorylation via glycogen synthase kinase-3 \cdot in adrenal chromaffin cells.

Neurochemistry International, 査読有 54巻、2009、497-505

[学会発表](計18件)

根本隆行、インスリン受容体シグナルにおける、正と負の発現調節機構、第84回日本薬理学会年会、2011年3月22日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

柳田俊彦、インスリン受容体発現のHsp90とコシャペロンによる制御、第84回日本薬理学会年会、2011年3月24日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

村上学、電位依存性カルシウムチャンネル・欠損マウスにおけるエピネフリン分泌亢進、第84回日本薬理学会年会、2011年3月22日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

根本隆行、インスリンによる神経様突起伸長: PI3K/mTOR 経路を介した tau 蛋白合成促進、第63回日本薬理学会西南部会、2010年11月26日、鹿児島県民交流センター (鹿児島県)

Takayuki Nemoto、Posttranscriptional regulation of IGF-1 receptor via GSK-3 \cdot and mTOR in adrenal chromaffin cells、The 20th Japan-Korea joint Seminar Program、November 25-27、2010、Kagoshima Public Access Center (Kagoshima)

Toyoaki Maruta、 α_2 -adrenoceptor agonists inhibit tetrodotoxin-sensitive Na_v1.7 in adrenal chromaffin cells、The 20th Japan-Korea joint Seminar Program、November 25-27、2010、Kagoshima Public Access Center (Kagoshima)

根本隆行、インスリンは PI3K/mTOR 経路を介して tau 蛋白量を増加させる、第83回日本薬理学会年会、2010年3月17日、大阪国際会議場 (大阪府)

宮崎智、ERK と p38 による tau リン酸化、Na_v1.7 チャンネルの制御、第83回日本薬理学会年会、2010年3月17日、大

阪国際会議場（大阪府）
柳田俊彦、アルコールはインスリン受容体シグナルを抑制する、第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 18 日、大阪国際会議場（大阪府）

根本隆行、Glycogen synthase kinase-3・による insulin / insulin-like growth factor-I 受容体シグナル分子群の発現調節、第 62 回日本薬理学会西南部会、2009 年 11 月 27 日、リジェール松山（愛媛県）

宮崎智、Na_v1.7 Na⁺ チャネルによる tau リン酸化の制御、第 62 回日本薬理学会西南部会、2009 年 11 月 27 日、リジェール松山（愛媛県）

柳田俊彦、エタノールによるインスリン受容体シグナルの抑制、第 62 回日本薬理学会西南部会、2009 年 11 月 27 日、リジェール松山（愛媛県）

柳田俊彦、Function and cell surface expression of insulin receptor and IGF-I receptor in neuronal cells、3rd Annual Protein and Peptide Conference 2010、2010 年 3 月 21 日、北京（中国）

根本隆行、Insulin-like growth factor-I 受容体発現調節機構の解析、日本分子生物学会 第 9 回 春期シンポジウム、2009 年 5 月 11 日、ワールドコンベンションセンター・サミット（宮崎県）

宮崎智、ERK、p38 MAPK による Na_v1.7 Na⁺ チャネルの制御、日本分子生物学会 第 9 回 春期シンポジウム、2009 年 5 月 11 日、ワールドコンベンションセンター・サミット（宮崎県）

柳田俊彦、抗躁薬リチウムによる電位依存性 Na⁺ チャネルの機能・発現調節：GSK-3・非依存性の機能抑制と GSK-3・依存性の細胞膜発現増加、日本分子生物学会 第 9 回 春期シンポジウム、2009 年 5 月 11 日、ワールドコンベンションセンター・サミット（宮崎県）

根本隆行、Insulin / insulin-like growth factor-I (IGF-I) 受容体シグナル分子群発現調節機序の解析、宮崎 Neuroscience 研究会、2009 年 9 月 12 日、宮崎観光ホテル（宮崎県）

柳田俊彦、神経系のインスリン受容体シグナル分子群の機能・発現調節機構、トランスポーター研究会 第 3 回九州部会、2009 年 11 月 21 日、鹿児島大学桜ヶ丘キャンパス（医学部、歯学部）鶴陵会館（鹿児島県）

〔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

<http://miyamedyakuri.web.fc2.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 隆行 (NEMOTO TAKAYUKI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90506833

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

研究者番号：