

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390186

研究課題名(和文) 個体老化・代謝に関連する新規分子の解析と高齢化社会での医療への応用

研究課題名(英文) Analysis of novel molecule in aging and metabolism toward translational research

研究代表者

中神 啓徳(Nakagami, Hironori)

大阪大学・連合小児発達学研究所・寄附講座教授

研究者番号：20325369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円、(間接経費) 4,230,000円

研究成果の概要(和文)：アルファシヌクレイン(SNCA)は家族性パーキンソン病の原因遺伝子であり、特徴的な病理所見のレビー小体の構成蛋白である。我々は住民健診のサンプルを用いてSNCA濃度を測定したところ、年齢とともに血中濃度が低下、血中濃度が低いほどインスリン抵抗性であった。そこで、前脂肪細胞にSNCAを添加したところ、PI3キナーゼの活性化、Aktのリン酸化、細胞内への糖の取り込みが認められた。マウスを用いて糖の取り込みを検討したところ、SNCA静脈内投与による脂肪組織・骨格筋に糖の取り込みが亢進していた。SNCA欠損マウスは高脂肪食負荷下では野生型マウスに比べて軽度の肥満とインスリン抵抗性・耐糖能異常を認めた。

研究成果の概要(英文)：Here we show the function of alpha-synuclein(SNCA) in the glucose metabolism, which is a susceptible gene for Parkinson disease. In a transversal study in Japanese population, we found that serum SNCA was strongly inversely correlated with elevated seric insulin resistance indicators. Additionally, in SNCA knock-out mice only glucose metabolism is impaired in glucose and insulin response during dietary-induced insulin resistance. In vitro, treatment of recombinant SNCA activates PI3K/Akt pathway through Gab1 activation, independently of insulin receptor activation, leading to glucose uptake in 3T3-L1 cells. Also in vivo, injection of SNCA activates Gab1-Akt-glucose uptake pathway in adipose tissue and muscle thereby promoting glucose utilization in mice. Moreover, during insulin resistance, SNCA treatment decreased blood glucose levels thus recovering glucose utilization in tissues. These findings suggest serum SNCA potential for prevention or treatment against insulin resistance.

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：代謝学

キーワード：糖代謝 インスリン抵抗性 アルファシヌクレイン

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた我が国において、疾患発症予防を目指した老化研究はますます重要性を増しており、健康寿命の延長による医療費や福祉資源の有効活用につながる。近年、メタボリック症候群患者での交感神経系が活性化と脂肪由来のサイトカインとの相互活性化作用などが報告され、各臓器・組織の連関による代謝機構が協調的に作用していることが解明されている。

申請者らは次世代の生活習慣病治療標的分子の探索として独自の遺伝子機能スクリーニング法を確立し (*Human Gene Ther*, 2006) この手法を用いて血管病を機軸とした新規機能分子を同定してきた (日本循環器学会八木賞・若手研究奨励賞受賞)。その中で、我々は血管に存在する脱ユビキチン化酵素が血管リモデリングの制御分子であることを見出したが (*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, *Am J Pathol* 2008) さらにユビキチン化標的蛋白の解析を進めていく過程でパーキンソン病の原因遺伝子である  $\alpha$ -synuclein (SNCA) が血管内皮細胞にも発現しており、その遺伝子欠損マウスがメタボリック症候群のモデルマウスとなりうること、またヒト血中濃度での SNCA 濃度が血圧・脂質・肥満度などと逆相関するなどの興味深い知見を得るに至った。

2. 研究の目的

加齢はオールマイティーな疾患発症危険因子であり、現代の高齢化社会での疾患発症予防戦略ではこの老化による年次変化を視野に入れる必要がある。本研究はパーキンソン関連分子のアルファシヌクレイン (SNCA) が加齢とともに徐々に低下し、メタボリック症候群に関連性が認められたという我々の先行研究に基付き、確かな臨床情報をもつ疫学研究と細胞やマウスを用いた基礎的研究の両側面からの SNCA の分子解析をメタボリック症候群の病態に焦点を絞って解析する。本研究は単なる老化研究の新規関連分子の解明のみならず、脳と各臓器・組織の連関による代謝機構と個体老化の共通分子を通じた次世代治療標的分子・バイオマーカーの可能性を秘めている。

2. 研究の方法

1)メタボリック症候群の原因としての SNCA の分子解明

メタボリック症候群への SNCA の関与を大きく中枢性と末梢性に分けて検討を行う。中枢性からの検討では、SNCA 遺伝子欠損マウスおよび脳特異的な SNCA 過剰発現マウスを用いて、行動量・食事量・基礎代謝量・血圧を比較検討し、ドーパミンシグナルを中心に解析する。末梢性からの検討では、SNCA 遺伝子欠損マウスおよび血管内皮特異的な SNCA 過剰発現マウスに高脂肪食負荷下で糖代謝・脂肪酸代謝・血管内皮機能の比較検討を行い、

インスリンシグナルを中心に解析する。さらに骨髄移植の系を用いて野生型の骨髄を SNCA 欠損マウスに移植あるいは SNCA 欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植することにより、血中の SNCA 濃度とメタボリック症候群のフェノタイプとの関連を検討する。

老化関連分子として SNCA の解析とその臨床応用

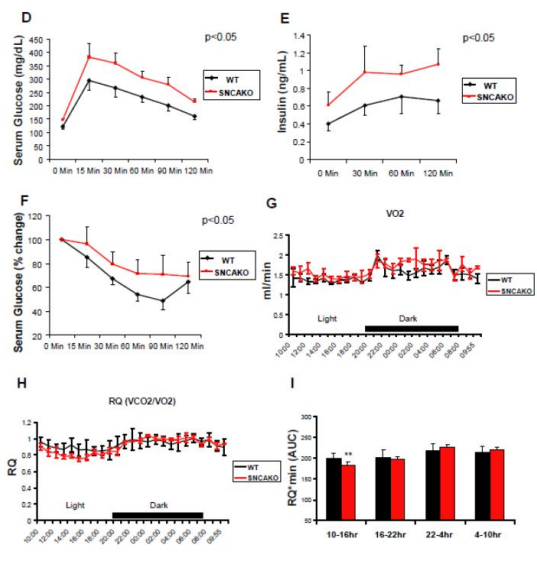
一般住民健診でのサンプルを用いた検診で、血中 SNCA 濃度は加齢とともに低下することが分かった。性差はなかった。個体老化・寿命との関連解析として、SNCA 遺伝子欠損マウスと野生型マウスの寿命・細胞老化・SIRT の分子機能の比較を行う。また SNCA の発現調節機構を転写・蛋白分解の両面から解析する。

3. 研究成果

SNCA と糖代謝の解析

SNCA 欠損マウスの解析において、高脂肪食負荷下での糖負荷試験で高血糖および高インスリン血症を認めたが、酸素消費量などの基礎代謝量の解析においては野生型との差を認めなかった。代謝関連分子標的として、筋・脂肪ではミトコンドリア脱共液蛋白質 (UCP) の定量評価、脂肪酸の  $\beta$  酸化に關与する CPT (カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ) 1 やアセチル CoA 関連分子の定量解析、肝では SCD-1 (Stearoyl Coenzyme A Desaturase-1)、fatty acid synthase, EVOVL6 (fatty acid elongase 6) などの脂肪酸関連酵素の発現を定量評価してみたが、野生型と SNCA 欠損マウスの間で変化は認めなかった (図 1)。

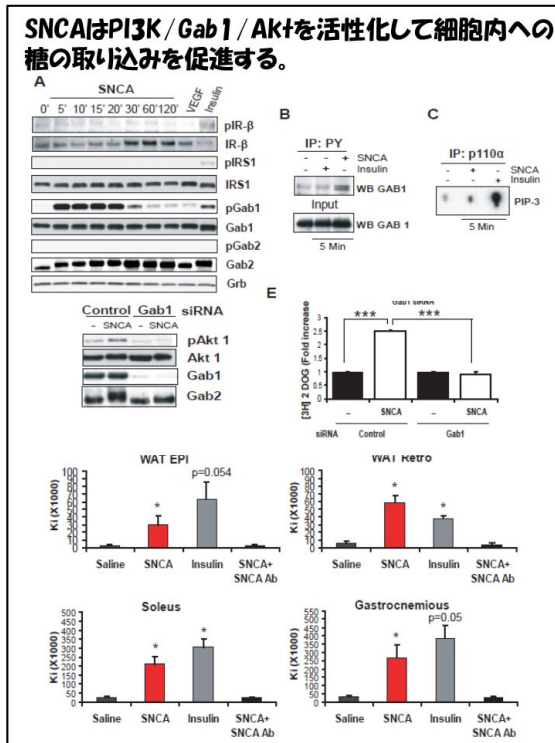
SNCA欠損マウスは耐糖能異常およびインスリン抵抗性を呈するが、酸素消費量などの基礎代謝は野生型と変化はなかった。



(図 1) SNCA 欠損マウスの特徴

そこで、SNCA とインスリンシグナルおよび細胞内への糖の取り込みに関して検討を行なった。前脂肪培養細胞を用いた検討で、組み換え型 SNCA 蛋白を添加することにより PI3 キナーゼおよびその下流の Akt の活性化が認められた。その活性化は濃度依存性であり、Glut4 のトランスポレーションを介したと考えられる細胞内への糖の取り込みも助長していた。また、上流シグナルとしては Gab1 が著明に活性化されていることを見出した。この SNCA による Akt の活性化および糖の取り込みの増加は、PI3kinase の阻害薬および Gab1 に対する siRNA を用いたノックダウンによって著明に抑制された。マウス個体での同様の現象を確認するために、中心静脈カテーテルを留置して SNCA の静脈内投与を行ったところ、脂肪組織および筋肉組織で Gab1 および Akt の活性化を認めた。さらにトリチウムラベルした 2-DG を用いて糖の取り込みを測定したところ、SNCA 投与により脂肪および筋肉組織で糖の取り込みが有意に上昇していることが示された。

すなわち、血中 SNCA は脂肪および筋肉組織に作用して PI3 キナーゼ・Akt を活性化して糖の取り込みを促進していることが示された (図 2)。



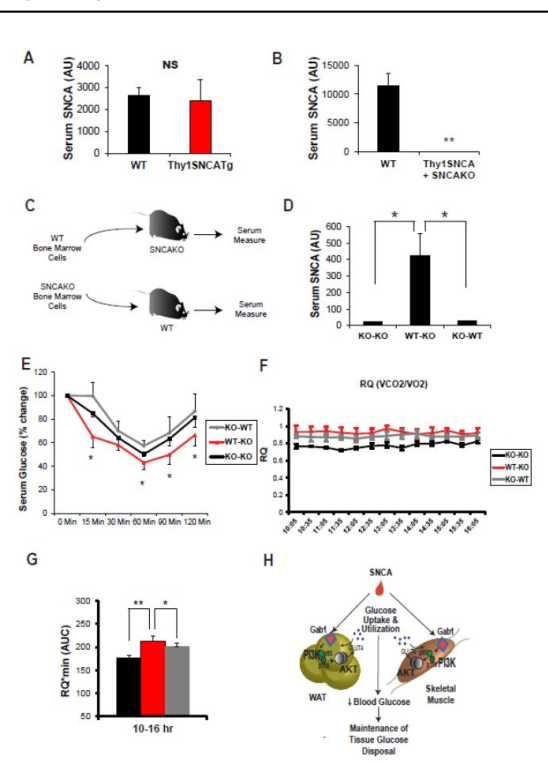
(図 2) SNCA の細胞内への糖取り込み作用

さらに詳細な検討としてグルコース法を用いて検討したところ、同様に脂肪組織および骨格筋での糖の取り込みが低下していることが明らかとなった。

この SNCA の糖取り込み増加作用を確認するために、糖尿病マウス (db/db) を用いた検討を行なった。興味深いことに、血中 SNCA 濃度をウエスタンブロット法で定量したところ、加齢とともにマウスでの血中 SNCA 濃

度が低下することが明らかとなった。また、db/db マウスでの血中 SNCA 濃度も野生型と比較して著明に低下していることが明らかとなった。そこで、組み換え型 SNCA 蛋白を静脈内投与したところ、血糖の有意な低下が認められた。すなわち、血中 SNCA の増加は糖尿病マウスの末梢組織への糖の取り込みを増加させて血糖を低下させる可能性が示唆された。

血中 SNCA の産生組織を調べるための検討を行なった。脳組織特異的な SNCA 過剰発現マウスを用いた検討では、血中 SNCA 濃度は野生型と変化がなかった。また、SNCA 欠損マウスに脳組織特異的な SNCA 過剰発現マウスを掛け合わせたマウスを用いた検討においても、血中 SNCA 濃度はほぼ検出されなかった。以上の結果から、SNCA は脳組織に豊富に発現しているが、血中 SNCA 濃度は脳組織以外の組織からの供給によって調整されていることが分かった。次に骨髄移植を行なった結果、野生型マウスの骨髄を SNCA 欠損マウスに移植したマウスでは血中 SNCA が豊富に存在することが分かった。逆に野性型マウスに SNCA 欠損マウスの骨髄を移植したマウスでは血中 SNCA 濃度は検出出来ず、このマウスの耐糖能は低下していることも分かった。すなわち、SNCA は赤血球や血小板に多く存在するが、これら骨髄由来細胞からの供給が血中 SNCA 濃度を規定していることが分かった (図 3)。



(図 3) 血中 SNCA の組織産生源の検討

### 臨床データとの比較

以上のマウスで得られた知見をヒト臨床サンプルのデータと比較検討をしてみた。端野・壮瞥町の血清サンプルを用いて SNCA



の血中濃度測定を実施したところ、正規分布には従わなかったため、SNCA の値を 4 群に分けて解析した。ヘモグロビン・ヘマトクリットと正の相関を示し、血圧・インスリン値と負の相関を示した。また加齢とともに SNCA の血中濃度が減少することをヒト臨床サンプルで確認した。すなわち、SNCA の低い患者インスリン抵抗性が高いという臨床データは SNCA 欠損マウスがインスリン抵抗性を呈することとも合致するため、血中 SNCA 濃度が単なるマーカーではなく機能的な側面も伴うことが明らかとなった (表 1)。

| Profile            | SNCA Grade   |              |              |              | P        |
|--------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
|                    | 1            | 2            | 3            | 4            |          |
| N                  | 288          | 288          | 288          | 288          |          |
| Serum SNCA         | 13.4 ± 0.4   | 35.2 ± 0.3   | 52.8 ± 0.3   | 95.1 ± 1.6   | <0.0001* |
| Age                | 64.9 ± 0.8   | 63.2 ± 0.8   | 62.8 ± 0.8   | 61.1 ± 0.8   | 0.0057   |
| Gender (Masculine) | 40.8%        | 40.3%        | 40.6%        | 40.6%        | 0.9995   |
| Height             | 155.7 ± 0.5  | 156.4 ± 0.5  | 157.3 ± 0.5  | 157.2 ± 0.5  | 0.1043   |
| Weight             | 58.7 ± 0.7   | 58.7 ± 0.7   | 58.6 ± 0.7   | 57.7 ± 0.7   | 0.633    |
| BMI                | 24.2 ± 0.2   | 23.9 ± 0.2   | 23.6 ± 0.2   | 23.6 ± 0.2   | 0.011    |
| Abdominal Circ.    | 83.4 ± 0.6   | 85.0 ± 0.5   | 85.2 ± 0.06  | 84.4 ± 0.6   | 0.126    |
| Glucose            | 99.1 ± 1.2   | 97.2 ± 1.2   | 96.2 ± 1.2   | 96.2 ± 1.2   | 0.325    |
| HbA1c              | 5.42 ± 0.04  | 5.39 ± 0.04  | 5.38 ± 0.04  | 5.35 ± 0.04  | 0.608    |
| IRI                | 6.00 ± 0.23  | 5.58 ± 0.27  | 5.04 ± 0.18  | 4.51 ± 0.18  | <0.0001* |
| HOMA1R             | 1.5 ± 0.06   | 1.39 ± 0.08  | 1.22 ± 0.05  | 1.10 ± 0.06  | <0.0001* |
| RBC                | 441.6 ± 2.7  | 447.3 ± 2.5  | 452.1 ± 2.4  | 454.2 ± 2.4  | 0.0019   |
| Hb                 | 13.45 ± 0.08 | 13.69 ± 0.08 | 13.76 ± 0.08 | 13.81 ± 0.08 | 0.0079   |
| Hct                | 41.37 ± 0.22 | 41.94 ± 0.22 | 42.30 ± 0.22 | 42.63 ± 0.22 | 0.0005*  |
| WBC                | 5.41 ± 0.08  | 5.36 ± 0.08  | 5.19 ± 0.09  | 5.28 ± 0.09  | 0.273    |
| Total Cholest      | 201.2 ± 2.0  | 199.7 ± 2.0  | 205.2 ± 1.9  | 202.6 ± 1.9  | 0.243    |
| Triglycerides      | 106 ± 3.0    | 108.4 ± 4.7  | 102.8 ± 3.0  | 101.8 ± 4.8  | 0.628    |
| HDL                | 52.4 ± 0.9   | 54 ± 0.8     | 54.8 ± 0.8   | 56.1 ± 0.8   | 0.011    |
| SBP                | 142.9 ± 1.4  | 137.8 ± 1.3  | 136.2 ± 1.3  | 134.5 ± 1.3  | <0.0001* |
| DBP                | 78.4 ± 0.7   | 77.0 ± 0.7   | 75.8 ± 0.7   | 75.1 ± 0.6   | 0.0023   |
| TP                 | 7.31 ± 0.02  | 7.37 ± 0.02  | 7.31 ± 0.02  | 7.40 ± 0.02  | 0.0186   |
| Uric Acid          | 5.29 ± 0.08  | 5.10 ± 0.08  | 5.23 ± 0.08  | 5.09 ± 0.08  | 0.1963   |
| BUN                | 15.7 ± 0.27  | 15.4 ± 0.25  | 15.3 ± 0.23  | 15.4 ± 0.22  | 0.676    |
| Creatinine         | 0.69 ± 0.02  | 0.70 ± 0.02  | 0.66 ± 0.02  | 0.67 ± 0.02  | 0.3078   |
| AST                | 26.3 ± 0.6   | 30.3 ± 3.3   | 24.9 ± 0.5   | 22.7 ± 0.5   | 0.0413   |
| ALT                | 23.4 ± 0.8   | 32.2 ± 6.7   | 23.3 ± 0.7   | 21.7 ± 0.8   | 0.1258   |

(表 1) 血中 SNCA 濃度 (4 群) と各種パラメーターとの相関

## 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)

Rodriguez-Araujo G, Nakagami H, Hayashi H, Mori M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Nakaoka Y, Takami Y, Komuro I, Morishita R, Kaneda Y. Alpha-synuclein elicits glucose uptake and utilization in adipocytes through the Gab1/PI3K/Akt transduction pathway. **Cell Mol Life Sci.** 2013 Mar;70(6):1123-33. (IF 5.62)

[学会発表](計 3 件)

中神啓徳 「Alpha-synuclein is associated with impaired glucose regulation and insulin resistance」第 19 回血管生物医学会シンポジウム 2011.12.10 東京

Hironori Nakagami, Gerardo Rodriguez-Araujo 「Alpha synuclein and the glucose metabolism」第 3 回 Molecular Cardiovascular Conference、2012.9.8、キロロ <ポスター>

中神 啓徳 「血中アルファシヌクレインと老化・糖代謝との関連解析」第 13 回日本抗加齢医学会総会、2013.6.28、横浜 <シンポジウム>

[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

中神 啓徳 (NAKAGAMI HIRONORI)  
大阪大学・その他の研究科・その他  
研究者番号：20325369

### (2) 研究分担者

樂木 宏実 (RAKUGI HIROMI)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号：20252679

勝谷 友宏 (KATSUYA TOMOHIRO)  
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・その他  
研究者番号：30311757

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：