

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893077

研究課題名(和文) 糖尿病で生じる高グルコース・高インスリン状態がアミロイド産生に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of high glucose and high insulin state on beta-amyloid production

研究代表者

徳武 孝允 (Tokutake, Takayoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：00707838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病(DM)がアルツハイマー病(AD)発症の後天的危険因子になることが多くの疫学研究で示されている。糖尿病で生じる高グルコース状態がADの病態に与える影響を明らかにするため、本研究を実施し次の知見を得た。1)高グルコース状態では、神経系培養細胞でアミロイド(A β)の産生が亢進する。2)高インスリン状態では、A β が増加する。

これらの知見から、DM患者でみられる高血糖・高インスリン血症は神経細胞でのA β の産生を増加させることで、AD病態を加速させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Numerous epidemiological studies have shown that patients with diabetes mellitus (DM) have increased risk of developing Alzheimer disease(AD). We conducted a research to verify high glucose condition in AD pathogenesis and here provide following findings. i) high glucose condition facilitates A β production in cultured neuronal cells. ii) high insulin state facilitates A β production.

These findings suggest that hyperglycemia and hyperinsulinemia occurring in patients with DM may accelerate AD pathogenesis by facilitating A β production in neurons.

研究分野：認知症学

キーワード：アルツハイマー型認知症 インスリン グルコース アミロイド

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は認知症の原因として最も頻度が高い疾患であるが、根本的な治療法や予防法は未だに確立されていない。アルツハイマー病を特徴づける病理学的所見は、神経細胞の脱落に加えて、アミロイド (A β) を主要構成成分とする老人斑およびリン酸化タウを主要構成成分とする神経原線維変化である。特にアルツハイマー病の病態において最も早期に生じるのは脳内 A β の蓄積であり、A β 蓄積からリン酸化タウ蓄積、神経細胞死にいたる「アミロイドカスケード」仮説を中心に、アルツハイマー病の治療方法の開発が進められている。一方、糖尿病やインスリン抵抗性がアルツハイマー病発症の後天的リスク因子となることが国内外の疫学調査から明らかにされている。糖尿病によるアルツハイマー病発症への影響は、動脈硬化、微小血管障害、糖毒性、インスリン抵抗性などさまざまな病態が関与することが示唆されているが、詳細な分子病態機序は未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

糖尿病 (2型) 患者で生じる高グルコース・高インスリン状態およびインスリン抵抗性がアルツハイマー病発症にかかわる機序について、特にアミロイドカスケード仮説の上流に位置する A β の蓄積などに着目し、その分子機序を解明することを目的とした。具体的には、糖尿病で生じる高グルコース状態、高インスリン状態を神経系培養細胞において再現し、A β 産生に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

スウェーデン型アミロイド前駆体蛋白 (APP swe) を安定発現するマウス神経由来細胞 (N2a 細胞) を、異なるグルコース濃度に調整した培養液を用いて培養し、A β 産生量をウエスタンブロットおよび ELISA により検討した。さらに、A β 40、42 について特異 ELISA を用いて定量解析を行った。

次に高グルコース状態に加え、高インスリン状態が付加される影響を考慮し、異なるインスリン濃度 (0~1000nM) を培養液に添加し、神経細胞が産生する A β 量を解析した。

高グルコース条件、高インスリン条件で N2a 細胞を培養した際のインスリンシグナル伝達について解析を行った。高インスリン条件と正常インスリン条件で細胞培養を行い、インスリン添加 (1 μ M) により生じるリガンド依存性のインスリンシグナル伝達を解析した。インスリンシグナル伝達の指標として、pAkt および pGSK3 をリン酸化特異的抗体で検出し、時間依存性の変化を免疫ブロットで解析した。

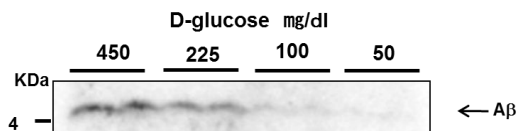
4. 研究成果

(1) 高グルコース状態が A β 産生に及ぼす影響

APP swe 安定発現 N2a 細胞を異なるグルコース濃度に調整した培養液で培養し、培養液中に存在する A β についてウエスタンブロットおよび ELISA による検討を行った。ウエスタンブロットおよび ELISA を用いた検討では、A β 42/40 の変化を認めなかったが、総 A β は、225mg/dL 以上の高グルコース状態で増加を認めた。(図 1)

より生理的な A β 分泌に及ぼす影響を検討するため、野生型 N2a 細胞においても同様の検討を行い、培養液中に分泌される内在性 A β を高感度 ELISA により検討した。N2a swe での実験結果と同様に、グルコース濃度依存性の A β 42/40 の変化は認めなかったが、高グルコース状態では総 A β 量が増加した。

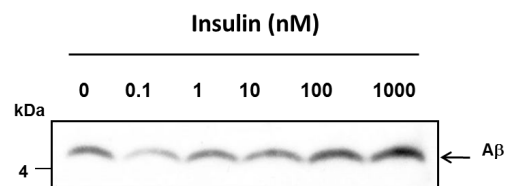
図1.高グルコースにおけるA β 産生



(2) 高インスリン状態が A β 産生に及ぼす影響

高インスリン状態における A β 産生量について検討を行った。APPswe 安定発現細胞を高インスリン状態で培養し、培養液中に存在する A β についてウエスタンブロットによる検討を行った。生理的なインスリン濃度を超える濃度 (10 nM 以上) において N2a swe 細胞培養液中の A β 量が増加する傾向を認めた。(図 2)

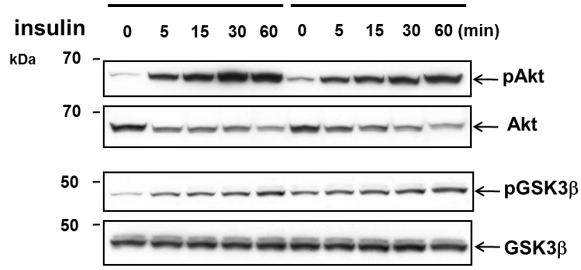
図2. 高インスリンにおけるA β 産生



(3) 高インスリン状態によるインスリン抵抗性の誘導

高グルコース条件、高インスリン条件 (10 nM) 下において N2a 細胞を培養した際のインスリンシグナル伝達について解析を行った。高インスリン条件培養下ではインスリン刺激に伴い時間依存性に増加する pAkt および pGSK3 の活性化が抑制される傾向を示した。(図 3)

図3. 高インスリン状態と
インスリンシグナル伝達
正常インスリン 高インスリン



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 4件)

- 1) Kasuga K, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A, Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T. Systematic review and meta-analysis of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17. *J Hum Genet.* (in press) (査読有)
- 2) Yajima R, Tokutake T, Koyama A, Kasuga K, Tezuka T, Nishizawa M, Ikeuchi T. ApoE- isoform-dependent cellular uptake of amyloid- is mediated by lipoprotein receptor LR11/SorLA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Jan 2;456(1):482-8. (査読有)
- 3) Tokutake T, Ishikawa A, Yoshimura N, Miyashita A, Kuwano R, Nishizawa M, Ikeuchi T. Clinical and neuroimaging features of patient with early-onset Parkinson's disease with dementia carrying SNCA p.G51D mutation. *Parkinsonism Relat Disord.* 20(2):262-4, 2014 (査読有)
- 4) 徳武孝允, 春日健作, 池内 健. 中枢神経におけるインスリンシグナルと認知機能. *糖尿病* 57:682-684, 2014 (査読無)

[学会発表](計 6件)

- 1) 徳武 孝允, 石川 厚, 吉村菜穂子, 西澤 正豊, 池内 健. SNCA p.G51D 変異を有する若年発症パーキンソン病患者の臨床像・画像の検討. 第33回認知症学会学術集会 2014年11月30日, パシフィコ横浜会議センター(神奈川県横浜市)
- 2) 徳武 孝允, 石川 厚, 吉村菜穂子, 西澤 正豊, 池内 健. SNCA p.G51D 変異

を同定した若年発症パーキンソン病患者の分子臨床遺伝学的解析. 第55回日本神経学会学術集会 2014年5月22日, 福岡国際会議場(福岡県 福岡市)

- 3) 笠原 壮, 徳武 孝允, 春日 健作, 須貝 章弘, 赤岩 靖久, 本間 篤, 藤田 信也, 大野 司, 田中 晋, 西澤 正豊, 池内 健. 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の臨床症状, 画像, バイオマーカーの多様性の検討. 第55回日本神経学会学術集会 2014年5月22日, 福岡市, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- 4) 徳武 孝允, 石川 厚, 吉村菜穂子, 宮下 哲典, 桑野良三, 西澤 正豊, 池内 健. Clinical and Neuroimaging Features of a Patient with Early-Onset Parkinson's Disease with Dementia Carrying SNCA p.G51D Mutation. American Academy of Neurology Annual Meeting 2014, 2014年4月29日, Pennsylvania (USA)
- 5) 徳武 孝允, 春日 健作, 須貝 章弘, 赤岩 靖久, 本間 篤, 藤田 信也, 大野 司, 田中 晋, 西澤 正豊, 池内 健. 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症の画像, 臨床症状, バイオマーカーの検討. 第32回認知症学会学術集会 2013年11月8日, キッセイ文化ホール(長野県松本市)
- 6) 徳武孝允, 関根有美, 須貝章弘, 赤岩靖久, 本間 篤, 藤田 信也, 大野 司, 田中 晋, 西澤 正豊, 池内 健. 脳アミロイドアンギオパチー関連炎症のバイオマーカー, 血中抗 A 抗体の検討. 第54回日本神経学会学術集会 2013年5月31日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

[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：
出願年月日：
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
徳武 孝允 (TOKUTAKE TAKAYOSHI)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：00707838

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし