

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18991

研究課題名(和文)脳由来インスリンの神経生理学作用解析

研究課題名(英文)Neurophysiological effects of brain-derived insulin

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、脳由来インスリンの存在を示唆する研究成果が相次いで報告されている。しかし脳由来インスリンの産生・分泌機序および生理機能については未だ不明である。本研究ではまずマウス脳におけるinsulin2の発現解析を行った。その結果、マウス脳内においてinsulin2 mRNAと前駆体が発現しており、インスリンがマウス脳内で合成されている可能性を示した。さらに神経細胞においてインスリンの分泌に関わっていることが予想されるアクチン細胞骨格の制御機構について解析を行った。その結果、アクチン重合因子の一つであるフォルミン蛋白質Fhod3が神経細胞のアクチン細胞骨格を制御していることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Recent reports show that brain-derived insulin exists in the brain. However, little is known of the production mechanism and physiological roles. In this study, we analyzed expression of insulin2 in mouse brain. As the result, insulin2 mRNA and precursor were expressed in mouse brain, suggesting the possibly that insulin2 is synthesized in mouse brain. We also analyzed the regulatory mechanism of actin cytoskeleton, which is expected to be involved insulin secretion in neurons. We obtained results suggesting that the formin protein Fhod3, one of the actin polymerization factors, controls the actin cytoskeleton of nerve cells.

研究分野：薬理学 神経科学

キーワード：Insulin2 アクチン細胞骨格 Fhod3

### 1. 研究開始当初の背景

これまで国内外の研究で、アルツハイマー病患者脳でインスリン受容体発現低下によるグルコース代謝障害が起こっておりそれに伴う神経細胞死が確認された。その病態生理学的所見は脳内で起こるインスリン抵抗性と位置づけられ、初めて「脳内の糖尿病 (3型糖尿病)」という概念が提唱された (Steen et al. J Alzheimers Dis 2005)。その後脳内のインスリン抵抗性を改善させるための基礎研究がアルツハイマー病の予防および治療を目的に世界中で行われている (Talbot et al. J Clin Invest 2012)。

アルツハイマー病因子のひとつとして脳内のインスリン抵抗性説が定着しつつある一方、最近になって脳内で産生されるインスリン (脳由来インスリン) の発現も低下しているといった研究結果が相次いで報告された。1967年以降、80以上の研究グループが、膵臓だけでなく脳内にもインスリン産生細胞が存在することについても言及しており、脳由来インスリンの神経生理および病態生理との関連が追求されている。2012年カナダの研究グループ Mehran らが記憶・学習を司る海馬領域で最もインスリンが産生されていることを明らかにし、同時に脳由来インスリンの存在を確定づけた (Mehran et al. Cell metabolism 2012)。2014年には九大の研究グループ Hokama らがインスリンに関わる遺伝子プロファイリング調査によりアルツハイマー病患者脳でインスリンのプロセッシング促進因子 PCSK1/2 の発現が著しく低下していることを明らかにし、アルツハイマー病態時インスリンの合成が低下していることを示唆した (Hokama et al. Cerebral Cortex 2014)。彼らの研究結果はアルツハイマー病における脳由来インスリンの重要性を示しているものの、アルツハイマー病治療及び予防を目的に脳由来インスリンの神経生理学的意義を解明しようとする基礎研究は未開拓である。

### 2. 研究の目的

私たちはアルツハイマー病主要因子アミロイドβが脳内で産生されるインスリン (脳由来インスリン) の合成を阻害し神経細胞死を誘発することをラット海馬を用いた in vitro 研究によりすでに見出している (Cell Signal 2014)。しかし実際に生体で脳由来のインスリン低下がアルツハイマー様の病態/行動変化をもたらすのか定かではない。そこで本

研究では、アルツハイマー病治療及び予防を念頭に置き、脳由来インスリンの産生/分泌機序および神経生理学的意義を確立する。本研究成果は、代謝障害や炎症反応に起因されるアルツハイマー病などの神経変性疾患の進行メカニズムを解明するための重要な基礎情報となることが予想される。

### 3. 研究の方法

げっ歯類ではヒトと違い2つのインスリン遺伝子 *Ins1* 及び *Ins2* が発現しており、脳内でインスリンペプチドとして合成されるのは *Insulin2* のみである。そこで成獣マウス脳を用いて(1)マウス脳内の *insulin2* の発現解析を行った。さらに、膵β細胞においてアクチン細胞骨格の再編がインスリン分泌の制御に関与していることが知られているため (Tomas et al. J Cell Sci 2006)、脳内のインスリン分泌に関わっている可能性がある(2) アクチン細胞骨格制御機構について解析を行った。解析方法は以下の通りである。

#### (1)マウス脳における *insulin2* 発現解析

成獣マウス脳より RNA を採取し、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) により *insulin2* mRNA の発現解析を行った。RT-PCRの際、使用したプライマーは先行論文で使用されたものとわれわれが独自で設計したものを使用した (Mehran et al. Cell Metabolism 2012)。いずれのプライマーもイントロンを挟むエキソン2からエキソン3をコードするもの (106bp、167bp) である。ポジティブコントロールとして、*insulin2* の発現が認められている膵臓および胸腺より採取した RNA を使用した (Fan et al. EMBO J 2009)。

#### (2)マウス脳におけるアクチン細胞骨格制御因子の発現解析

アクチン重合制御因子のひとつとして知られるフォルミンは二量体蛋白質であり、その分子構造的な特徴から自らが重合核となりアクチンの重合を促す。さらに二量体フォルミンは、重合により形成された直線状アクチン線維の伸長端に結合することによりその伸長を促進している。近年、分泌小胞の細胞内移動/細胞膜融合/小胞内物質放出にアクチン細胞骨格の再編が重要な役割を果たしていることが明らかにされ、そのアクチン細胞骨格の再編においてフォルミン蛋白質の関与が示唆されている (Tomas et al. J Cell

Sci 2006、Miklavc et al. J Cell Sci 2012)。そこで私たちは、フォルミン蛋白質の一つである Fhod3 に着目し、Fhod3 の脳内における発現について解析を行った。

<成獣マウス脳における Fhod3 蛋白質の発現解析>

成獣マウスの脳を大脳皮質、海馬、嗅球、視床、視床下部、小脳と各領域に分けて採取し、ウエスタンブロットにより Fhod3 蛋白質の発現を解析した。

<成獣マウス脳における Fhod3 発現細胞の同定>

Fhod3 遺伝子を LacZ に置換したノックインマウスを用いて中枢神経組織の LacZ 染色を行い、発現部位の同定を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)マウス脳における insulin2 発現解析

これまで本研究に関して、成獣ラットを用いて脳内のインスリン発現解析を行ってきた。本研究では、今後インスリン遺伝子への変異導入等の操作を行うにあたり、遺伝子改変操作が容易なマウスの脳内でもインスリンの発現が見られるのか解析を行った。その結果、成獣マウスの脳内で insulin2 mRNA の発現がみられた。さらにウエスタンブロット解析の結果、成獣マウス脳内においてわずかながら proinsulin の発現がみられた。以上の結果は、成獣マウス脳内でインスリンが産生されていることを示唆している。

##### (2)マウス脳におけるアクチン細胞骨格制御因子の発現解析

分泌小胞の細胞内移動／細胞膜融合／小胞内物質放出にアクチン細胞骨格の再編が重要な役割を果たしており、そのアクチン細胞骨格の再編においてフォルミン蛋白質の関与が示唆されていることから、脳神経におけるフォルミン蛋白質の候補として Fhod3 に着目した。Fhod3 は心臓と脳に発現しており、私たちが作製した Fhod3 ホモ欠損マウスは心臓形成不全による胎生期致死を示した。詳細な解析の結果、Fhod3 は心筋サルコメア内部に局在しており、心筋サルコメア成熟に伴うアクチン線維の再編に必須であった (Taniguchi, Takeya et al., J Biol Chem. 2009; Kan-o, Takeya et al. Biol Open. 2012)。さらに、Fhod3 ホモ欠損マウスに心臓特異的プロモーター制御下に Fhod3 を戻し発現させたレスキューマウスは、心臓形成がほぼ正常に進行して出生直前まで発達したが、神経

管閉鎖不全による外脳症を呈して生直後に死亡した (Kan-o, Takeya et al. Biol Open. 2012)。このことから Fhod3 がマウス胎生期の神経発達において必要不可欠であることが明らかとなったが、出生後の脳における Fhod3 の機能は未だ明らかでない。本研究では、Fhod3 の成獣マウス脳内での機能解析を進めるにあたりまず Fhod3 の脳内における発現解析をおこなった。その結果、成獣マウスにおいて Fhod3 は脳に発現していることが明らかとなり、大脳皮質領域に最も多く発現していることがわかった。さらに詳細に解析を進めた結果、大脳皮質内の特定領域の神経細胞に発現していることがわかった。以上の結果から、Fhod3 は成獣マウス大脳皮質の神経細胞においてアクチン細胞骨格形成に関与していることが示唆された。

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 根本隆行、Hikmawan Wahyu Sulistomo、武谷 立  
神経細胞におけるアクチン細胞骨格制御因子 Fhod3 の機能解析  
第 70 回日本薬理学会西南部会  
2017 年 11 月 21 日  
鹿児島県鹿児島市 (かごしま県民交流センター)
- ② 根本隆行、Hikmawan Wahyu Sulistomo、武谷 立  
マウス脳におけるアクチン重合因子 Fhod3 の発現  
第 90 回日本薬理学会年会  
2017 年 3 月 15 日-3 月 17 日  
長崎県長崎市 (長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホールアストピア)
- ③ 根本隆行、Hikmawan Wahyu Sulistomo、武谷 立  
大脳皮質におけるフォルミン蛋白質 Fhod3 の発現解析  
第 69 回日本薬理学会西南部会  
2016 年 11 月 26 日  
愛媛県松山市 (松山大学)
- ④ Hikmawan Wahyu Sulistomo, Takayuki Nemoto, Yohko Kage, Ryu Takeya  
Mammalian formin Fhod3 plays pivotal role in the brain development  
第 9 回トランスポーター研究会九州部会

2016年10月1日

宮崎県宮崎市（宮崎市民プラザ）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/pharmacology/>

#### 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) 研究協力者

武谷 立 (Takeya Ryu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50335981