

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19279

研究課題名(和文) インスリン抵抗性によるアルツハイマー病増悪機構の解析

研究課題名(英文) Exacerbating effects of insulin resistance on Alzheimer's disease

研究代表者

泉尾 直孝 (Izuo, Naotaka)

千葉大学・大学院医学研究院・日本学術振興会特別研究員(PD)

研究者番号：50722261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の危険因子であるインスリン抵抗性のADに対する作用について、モデルマウスを用いて検証した。変異インスリン受容体のノックインマウスと、ADモデルマウスを掛け合わせ、インスリン抵抗性ADモデルマウスを作製し、その表現型を調べた。このマウスは、老人斑の蓄積に影響を与えなかったが、行動解析により長期記憶の低下・不安の欠如・抑うつといった神経精神症状を呈することを明らかにした。オメガ-3脂肪酸は特に抑うつ症状について顕著な効果を示すことが明らかとなった。これらの成果は、ADの予防・治療戦略の開発に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insulin resistance is one of risk factors of Alzheimer's disease (AD). I investigated an exacerbating effects of insulin resistance on AD by phenotypic analyses on model mice. By crossbreeding of insulin resistant mice knocked in mutant insulin receptor and AD model mice, we generated insulin resistant AD model mice. This double knockin mice exhibited deficit of long term memory, decreased anxiety sensitivity and depression in behavioral analyses without affecting senile plaque pathology. By oral administration of Omega-3 fatty acids, insulin resistant AD model mice recovered from psychological symptoms, especially depression. These results would contribute to developing preventive and therapeutic strategies on AD.

研究分野：神経老化薬学

キーワード：アルツハイマー病 糖尿病 インスリン抵抗性 行動解析

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病 (AD) は、学習記憶能力の低下といった認知症状に加えて、不安や抑うつといった精神症状を合わせて発症する神経変性疾患である。AD では、臨床診断の約 15 年以上前から、既に老人斑の蓄積が始まっていることが、家族性 AD の大規模追跡研究から明らかになってきており、治療のみならず予防的介入の重要性も高まっている。

(2) AD の危険因子のひとつである糖尿病は、AD の発症リスクを 2 倍以上高めることが数々の疫学的研究より報告されている。さらに、日本の久山町研究から、AD 発症のリスクと強い相関を示すのは、空腹時血糖の高値ではなく、耐糖能異常であることが報告された。これらの疫学研究より、インスリン抵抗性が AD の発症リスクの上昇と関連することが示唆される。一方、AD 患者の脳内においてもインスリン抵抗性が生じていることが明らかとなっていることから、インスリン抵抗性と AD 病態との関連を明らかにすることは、治療的・予防的介入法を創出するうえで重要な手がかりとなる。

(3) Docosahexaenoic acid (DHA) および Eicosapentaenoic acid (EPA) などのオメガ-3 脂肪酸は、脂質異常症治療薬として臨床的に使用されている。特に DHA は、遊離脂肪酸受容体を介したインスリン抵抗性改善作用を有することが知られており、また一方、脳内においても豊富に存在する脂肪酸であることが知られている。AD においては、脳内の DHA が減少していることも報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、AD モデルマウスにインスリン抵抗性を負荷し、その表現型を解析することで、インスリン抵抗性と AD 病態との関係を明らかにする。

(2) 作製したインスリン抵抗性 AD モデルマウスに対し、オメガ-3 脂肪酸を投与し、その改善効果とそのメカニズムについて検証する。

## 3. 研究の方法

(1) インスリン抵抗性 AD モデルマウス

体内のインスリンシグナルを減弱させる一般的な方法としては、まず高脂肪食の負荷が挙げられる。この方法は、インスリン受容体の下流シグナルの病的変容を誘導する一方、体内・血中の脂質総量を極端に増加させる。また、他の方法としては、ストレプトゾトシンの投与によるすい臓細胞の破壊が挙げられる。この方法は、インスリンの分泌不全によるインスリンシグナルの低下を誘導できるが、持続的かつ極端な高血糖状態に

陥らせる。こういった方法を用いると、AD モデルマウスに対するインスリン抵抗性の作用を純粹に評価することができない。

そこで本研究では、所属研究室において作製された変異インスリン受容体 (P1195L) のノックインマウス (IR-KI) に着目した。このマウスでは、変異のホモ接合体は、代謝性ケトアシドーシスにより生後 3 日で死亡するが、ヘテロ接合体では、インスリン受容体の下流シグナルが 25%にまで低下しインスリン抵抗性を呈する。また、空腹時血糖は正常であるにもかかわらず、耐糖能異常を示すため、インスリン抵抗性のみを切り出した本研究に最適なモデルであるといえる。この IR-KI を AD モデルマウスと掛け合わせ、遺伝的にインスリン抵抗性を負荷することとした。AD モデルマウスとしては、AD 患者の前臨床段階をよく再現するモデルとして、ヒトアミロイドβ42 (Aβ42) を過剰産生するマウス (APP-KI) を使用した。これらのマウスを交配し、作製したインスリン抵抗性 AD モデルマウス (APP, IR-dKI) を解析した。APP-KI は、6 カ月齢から認知機能の低下を示すことが報告されていることを考慮し、IR, APP-dKI に対して、代謝解析を 3 カ月齢にて、行動解析を 4-5 カ月齢にて実施した。

(2) オメガ-3 脂肪酸の投与

オメガ-3 脂肪酸は、10 週齢から 20 週齢の 10 週間、300 mg/kg または 1500 mg/kg の用量で経口投与した。経口投与は、オメガ-3 脂肪酸を魚粉不含の MF 粉餌飼料に混合し、自由接種として実施した。オメガ-3 脂肪酸の酸化変性を避けるため、餌は週 3 回の頻度で交換した。また、上記 2 群に対し対照投与群を設定し、各 3 群において経口投与される脂質の総量が 1500 mg/kg ずつとなるようコーンオイルを用いて調整した。

## 4. 研究成果

(1) IR, APP-KI の表現型解析

実験群の親は、APP, IR-dKI および APP-KI の遺伝子型の組み合わせで交配し、実験群として APP-KI および APP, IR-dKI を作製した。母親の遺伝子型が APP-KI の場合、正常な授乳・哺育行動が観察された。一方、APP, IR-dKI の場合、半数以上の母親において、授乳・哺育行動の障害が認められた。授乳障害が認められた母親について解剖したところ、いずれの個体においても乳腺の発達は確認できたことから、授乳障害は射乳反射不全によるものと推察される。母親が授乳障害であった場合その新生児は死亡し、また哺育障害であった場合も、その新生児は成熟後に行動に影響を残す可能性が考えられる。そこで、母親が APP-KI であった個体についてのみ以降の解析を実施し、実験に使用できる個体数は減少することはやむを得ないものとした。

APP, IR-dKI は、空腹時血糖は正常である

ものの、耐糖能異常、高インスリン血症を示したことから、IR-KI で認められたインスリン抵抗性を切り出した表現型を保存していることが確認された。続いて行動試験を実施した。短期記憶の評価系である Y 字迷路試験では、APP, IR-dKI は交替反応の減少を示し、短期記憶の低下が示唆された。不安感受性の評価系である高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験では、APP, IR-dKI において、オープンアーム滞在時間の延長または中央部滞在時間の延長を認め、不安感受性の低下が示唆された。さらに抑うつ状態の評価系である強制水泳試験では、APP, IR-dKI において無動時間の延長傾向が認められ、抑うつ状態である可能性が示唆された。上述のように、APP, IR-dKI は様々な行動実験において異常を示したが、実験に用いたマウスの個体数が結論を下すには少ないと判断し、再現性の確認を実施することとした。

父親を APP, IR-dKI、母親を APP-KI と遺伝子型を固定して交配させることで、行動試験を実施するのに十分な個体数を実験群として確保することができた。今回の行動試験は、4-5 カ月齢の時点で実施した。Y 字迷路試験では、APP, IR-dKI における交替反応の減少は再現されず、短期記憶の低下は生じていないという結論に達した。さらに、新しく導入した長期記憶の評価系である場所指向性試験では、APP, IR-dKI における新規環境選択性の低下が認められ、長期記憶の低下が示唆された。さらに、不安感受性の評価系である明暗箱試験では、明所滞在時間の延長が認められ、不安感受性の低下が再現された。以上の結果より、インスリン抵抗性は AD 病態に対して、長期記憶の低下、不安感受性の低下を誘導することが明らかとなった。

次に、APP, IR-dKI における老人斑の蓄積について検討した。抗  $\beta$ 抗体による免疫染色を実施したところ、老人斑の蓄積は APP-KI と APP, IR-dKI のあいだで同程度であることが明らかとなった。以上の結果より、インスリン抵抗性は、AD 病態に対して老人斑の蓄積を加速することなく行動異常を誘導することが明らかとなった。

## (2) APP, IR-dKI に対するオメガ-3 脂肪酸の効果検証

オメガ-3 脂肪酸を 10 週間投与した APP, IR-dKI に対して、代謝解析を実施した。耐糖能異常を改善する効果は認められなかったが、300, 1500 mg/kg のいずれの投与用量においても、APP, IR-dKI で上昇した血中のインスリン濃度を低下させる作用が認められたことから、部分的なインスリン抵抗性の改善が示唆される。さらに、行動試験を実施した。高架式十字迷路試験では、300 mg/kg の投与量において、APP, IR-dKI において延長したオープンアーム滞在時間の短縮傾向が認められた。また強制水泳試験では、1500 mg/kg の投与量において、APP, IR-dKI にお

いて延長した無動時間の短縮が認められた。また、脳内に蓄積した老人斑に対する作用について検討したが、オメガ-3 脂肪酸に老人斑を減少させる効果は認められなかった。以上のことから、オメガ-3 脂肪酸は、インスリン抵抗性によって増悪された AD 病態に対し、特に抑うつ状態において改善作用を示すことが明らかとなった。

## (3) オメガ-3 脂肪酸のミクログリアに対する作用の検討

脳内免疫担当細胞であるミクログリアは、AD などの神経変性疾患やうつ病などの精神疾患において脳内炎症を誘導し、病態形成に関与していることが知られている。そこで、オメガ-3 脂肪酸のミクログリア炎症反応に対する作用について検証した。マウス初代培養ミクログリアに対し、炎症起因物質である Lipopolysaccharide (LPS) を処置すると、顕著な一酸化窒素 (NO) の培地中への遊離が観察された。オメガ-3 脂肪酸である DHA および EPA をそれぞれ培養ミクログリアへ処置したところ、LPS 誘発性 NO 遊離を、DHA は 2  $\mu$ M の濃度から、EPA は 10  $\mu$ M の濃度から抑制した。一方、飽和脂肪酸であるパルミチン酸は、NO 遊離抑制作用を示さなかった。ミクログリアにおける NO の遊離には、NF- $\kappa$ B の核内移行とそれに引き続く誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現上昇が関与していることが知られている。そこで、NF- $\kappa$ B の核内移行に対する DHA および EPA の作用について免疫染色により検討した。DHA, EPA はともに NF- $\kappa$ B の核内移行を抑制しなかった。DHA および EPA は、遊離脂肪酸受容体である GPR40 および GPR120 に結合することが知られている。また、各受容体のミクログリアにおける発現は免疫染色により確認することができた。そこで、各受容体のアゴニストをミクログリアに処置し、LPS 誘導性 NO 遊離に対する反応を検証したところ、GPR40 のアゴニスト GW9508 は有意な NO 遊離抑制作用を示した一方、GPR120 のアゴニスト GSK137646A は抑制作用を示さなかった。以上より、DHA は、GPR40 を介してミクログリアの炎症反応を抑制している可能性が示唆された。

さらに、マウスにおけるオメガ-3 脂肪酸の炎症抑制効果について検証した。LPS を腹腔内に 60  $\mu$ g 投与することで、強制水泳試験における無動時間の延長といった抑うつ症状を示すことが知られている。オメガ-3 脂肪酸の LPS 誘導性抑うつ反応に対する効果について検証した。LPS をマウスに投与すると、強制水泳試験における顕著な無動時間の延長が見られた。一方、オメガ-3 脂肪酸を 1500 mg/kg の用量で、LPS の投与 24 時間前および LPS と同時の 2 回投与した場合、LPS 誘導性の抑うつ反応は、完全に抑制された。以上のことから、個体レベルにおいても、オメガ-3 脂肪酸は強力な炎症抑制作用を示すこ

とが明らかとなった。

#### (4) まとめ

インスリン抵抗性は、AD 病態に対し、老人斑蓄積に作用することなく、長期記憶の低下・不安感受性の低下・抑うつ症状を誘導することが明らかとなった。オメガ-3 脂肪酸は特に抑うつ症状について顕著な効果を示すことが明らかとなった。またこのオメガ-3 脂肪酸の作用には、ミクログリア炎症反応に対する抑制作用が関与している可能性が示された。

これらの結果は、AD の予防・治療戦略を開発する上で、インスリン抵抗性が重要な介入標的であることを示したものである。さらなる研究により、今後そのメカニズムについて明らかにされることが期待される。また、既に臨床的に高脂血症治療薬として用いられているオメガ-3 脂肪酸が、インスリン抵抗性により増悪された AD 病態に対し改善効果を示したことは、生活習慣病治療における、AD 発症リスクを考慮した投薬設計を提案するものである。オメガ-3 脂肪酸の中樞神経系における作用についても、さらなる研究が期待される。

#### 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)

[学会発表](計4件)

(発表者) 泉尾 直孝, 笠原 千尋, 村上一馬, 入江 一浩, 清水 孝彦 (演題名) 全身性のインスリン抵抗性は老人斑非依存的にアルツハイマー病モデルマウスに行動異常を誘発する (学会名) 生体機能と創薬シンポジウム 2017 (発表年) 2017 年

(発表者) 泉尾 直孝, 笠原 千尋, 村上一馬, 入江 一浩, 清水 孝彦 (演題名) 全身性のインスリン抵抗性はアルツハイマー病モデルマウスに行動異常を誘発する (学会名) 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 (発表年) 2017 年

(発表者) 泉尾 直孝, 笠原 千尋, 山本有香, 清水 孝彦 (演題名) Docosahexaenoic acid is a potent anti-inflammatory mediator in microglia (学会名) 第40回日本基礎老化学会大会 (発表年) 2017 年

(発表者) 笠原 千尋, 泉尾 直孝, 横手 幸太郎, 清水 孝彦 (演題名) オメガ-3 脂肪酸はミクログリアの活性化を調節する (学会名) 第39回日本分子生物学会年会、(発表年) 2016 年  
本基礎老化学会大会 (発表年) 2017 年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

泉尾 直孝 (IZUO, Naotaka)

千葉大学・大学院医学研究院・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：50722261