

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15478

研究課題名(和文) アルツハイマー病におけるインスリンパラドックスの解明と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Insulin paradox and novel drug target in Alzheimer's disease.

研究代表者

岩坪 威 (Iwatsubo, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：50223409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)モデルマウスを用い、抗老化作用をもたらすカロリー制限ならびにIRS-2の欠損が、脳のアミロイド蓄積を抑制する分子機序の解明を目的に研究を行った。両モデルマウスにおいてアミロイド斑の主成分であるA $\beta$ ペプチドの脳内での代謝を解析した結果、A $\beta$ の産生や分解ではなく、凝集・蓄積の過程が抑制されている可能性を示す結果を得た。IRS-2を欠損した脳においても、インスリン刺激に対する下流シグナルの応答性や既知の抗老化関連シグナルは保たれていたことから、AD病態に抑制的な作用をもたらす分子機構として、古典的インスリンシグナル経路とは異なる、IRS-2特異的な分子経路の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Insulin signaling has been shown to regulate lifespan and the aging process. In this study, we aimed at elucidating the molecular mechanisms how caloric restriction and genetic disruption of IRS-2, the models of retarded aging, suppress amyloid deposition in the brains of Alzheimer's (AD) model mice. In vivo analyses revealed that neither production nor clearance of soluble A $\beta$  was altered, suggesting that the aggregation process was suppressed in these models. In IRS-2 deficient AD mouse brains, insulin-dependent activation of canonical insulin signaling proteins such as Akt was kept normal. The signaling pathways known to be involved in the anti-aging effect were also unaffected. Based on these results, the existence of an IRS-2-specific, canonical insulin signaling-independent molecular pathway that is responsible for anti-AD effect was suggested.

研究分野：神経病理学

キーワード：アルツハイマー病

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに、大規模疫学研究やモデル動物を用いた複数の研究から、2型糖尿病がアルツハイマー病(AD)発症の危険因子であることが示されてきた。血糖低下を担うインスリンに対する感受性が低下し、作用が十分に発揮されない「インスリン抵抗性」の獲得は、糖尿病の中心的な病態である。一方で、AD患者脳において、インスリンシグナルの低下を示唆する知見が報告されるなど、インスリン抵抗性は両疾患に共通の分子病態であると考えられてきた。これを基に、インスリン経鼻投与やインスリン抵抗性改善薬によるシグナル賦活化がADの新規治療法として期待されている。

一方で哺乳類を含む複数の動物種において、インスリン/IGF-1シグナル(IIS)の抑制は寿命延長やストレス抵抗性、抗老化を促し、生命に有益な影響を及ぼすことも知られている。我々はこれまでに、IIS抑制と同様の効果をもたらすと考えられているカロリー制限(CR)や、IISに必須のインスリン受容体基質(IRS)-2の遺伝的欠損により、ADモデルマウス脳において、AD病態の中心であるアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )ペプチドの蓄積が顕著に抑制されることを見出してきた。特に、IRS-2の欠損は末梢のインスリン抵抗性を示し、糖尿病様の病態を呈するにも関わらず、アミロイド病態に対しては保護的に作用した。

これらの知見より、IISがAD病態に対して正負いずれの影響を及ぼすのか、パラドックスは未だ解明されておらず、またIIS下流のどの因子がどのように脳内のAD病態の制御に寄与するのか、分子機序は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、脳内のインスリンシグナルはADに対し、正負いずれの作用を及ぼすのかという未解決の課題を主眼とする。特に、カロリー制限やIRS-2の欠損によるIISの障害がADモデルマウス脳のアミロイド蓄積を顕著に抑制する分子機序について、脳内で抗老化、抗タンパク質凝集作用に働きアミロイド蓄積の抑制に働くシグナル経路を解析するとともに、IIS障害がA $\beta$ の代謝過程におよぼす影響の分子レベルでの解明を目指す。得られた知見を基に、逆説的にインスリンシグナルの抑制を標的とする新規AD治療戦略創出の可能性を探索する。

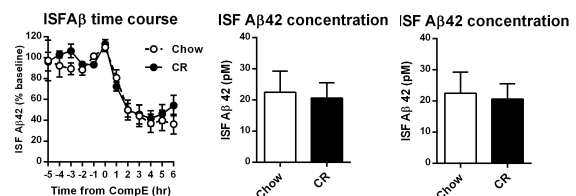
### 3. 研究の方法

本研究ではADモデルとして、生後12ヶ月頃より脳内にアミロイド斑の蓄積を生じるAPPトランスジェニックマウス(A7系統)を用いた。まず、IISの抑制がAD病態形成を阻害する分子機序を解明するため、IIS抑制・抗老化のモデルとしてカロリー制限(CR)あ

るいはIRS-2欠損ADモデルマウスを用い、脳内A $\beta$ の産生・クリアランス・凝集いずれの過程が変化しているのかを、*in vivo*, *in vitro*で検討した。また、古典的インスリンシグナル経路に関わる分子や、Nrf2ならびにHSF1シグナルを始めとするIIS下流で抗老化、ストレス抵抗性、プロテオスタシスへの関与が示されている既知のシグナル関連分子に着目し、IIS抑制モデルの脳における変化を解析する。

### 4. 研究成果

インスリンシグナルの変化がA $\beta$ の蓄積に及ぼす影響を検討するため、始めに3ヶ月齢のADモデルマウス(A7)に対し、カロリー制限(CR)を行った。CR群の作出には、同月齢の対照マウスの摂餌量を測定し、個別飼育したA7マウスに対し、その70%量の給餌を行った。12ヶ月間のCRの後、脳のアミロイド斑の蓄積面積を抗A $\beta$ 抗体を用いた免疫組織化学的解析で、また、A $\beta$ レベルを段階抽出した脳画分に対するELISA測定により解析した結果、CR群の脳ではアミロイド蓄積の顕著な抑制ならびに可溶性・不溶性A $\beta$ レベルの顕著な低下を認めた。そこでこのモデルマウスを用い、A $\beta$ の脳内動態の解析を行った。手法として、海馬に30kDaの分子量カットオフ値を持つ透析膜プローブを挿入し、覚醒状態で脳間質液(interstitial fluid: ISF)を継時的に回収可能な*in vivo*マイクロダイアリシス法を用いた。灌流に用いる人工脳脊髄液中に、A $\beta$ の前駆体APPからの切り出しを担う酵素である $\gamma$ セクレターゼの阻害剤Compound Eを添加し、急性にA $\beta$ 産生を抑制することで、A $\beta$ 濃度の低下より半減期も算出した。その結果、ISF中の可溶性A $\beta$ レベルならびにA $\beta$ のクリアランス速度はいずれも、CRにより有意に変化しなかった。ISF A $\beta$ は神経細胞から産生されたA $\beta$ レベルと相関すると考えられることから、これらの結果は、CRがA $\beta$ の産生やクリアランスには影響しない可能性を示す(下図)。



続いて、カロリー制限同様、加齢依存的にアミロイド蓄積を抑制するIRS-2欠損の効果について、同様の手法を用いて解析を行った。A7マウスでは約12ヶ月頃よりアミロイド斑の出現を認めるが、蓄積開始前の9ヶ月齢においても、既にIRS-2の欠損は脳内の可溶性・不溶性A $\beta$ レベルの低下をもたらすこと

を生化学的に見出していた。そこで、 $A\beta$  への有意な影響が認められる 9 ヶ月齢において、*in vivo* マイクロダイアリシス法による  $A\beta$  動態解析を行った。その結果、A7 マウスと比較して、IRS-2 欠損 A7 マウス脳で ISF  $A\beta$  レベルならびに半減期の顕著な差は認められなかった。これらの結果より、IRS-2 欠損においても、 $A\beta$  の産生やクリアランスには影響が無い可能性が示唆された。

$A\beta$  は神経細胞に発現する前駆体 APP の 2 段階の切断により生じ、細胞間隙に分泌される。このことから、*in vivo* において  $A\beta$  の産生への影響をより厳密に評価する手法として、近年、安定同位体  $^{13}C_6$ -Leucine による *in vivo* 標識と質量分析 (MS) を組み合わせた *de novo*  $A\beta$  産生量測定系 SILK (Stable isotope labeling kinetics) 法による測定が報告された。本研究では、これまでヒトで用いられた同手法のマウスへの応用を試みた。その結果、A7 マウスにおいては、MS 解析により目的の  $A\beta$  由来断片のピークは見出されたものの、定量的評価に十分な感度を得るには至らなかった。一方、 $A\beta$  の産生の指標となる酵素や、APP の切断産物の発現レベルをタンパク質レベルで検討した結果、有意な差は認められなかった。以上の結果、CR ならびにインスリンシグナル分子の遺伝的欠損はいずれもマウス脳内でアミロイド蓄積を抑制するが、 $A\beta$  の産生や分解過程には顕著な差は認められなかった。更に、 $A\beta$  産生・分泌への影響を評価する目的で、IRS-2 KO マウスの初代培養神経細胞を用い、培養上清中への  $A\beta$  分泌を測定した。この結果 *in vitro* においても、A7 に比して IRS-2 欠損 A7 マウス由来の培養で顕著な  $A\beta$  産生レベルの変化は認められなかった。

以上の結果を総合し、IIS 抑制によるアミロイド病態への低減効果は、産生やクリアランスへの影響によるものではなく、その後の  $A\beta$  の凝集・蓄積の変化によるものである可能性であると考えた。

続いて、IIS 阻害の下流で  $A\beta$  の脳内動態に影響を及ぼすシグナル経路について検討を行った。多くの生物種においてインスリンシグナルは老化の制御に関与し、その抑制は寿命延長やストレス耐性、タンパク質恒常性の亢進等の抗老化作用をもたらすことが報告されている。そこで、これまでに抗老化作用に関与が示されている複数のシグナル分子について、アミロイド蓄積に変化が認められる 9 ヶ月齢の IRS-2 欠損マウス脳におけるタンパク質発現ならびに活性化 (リン酸化) の変動を解析した。古典的インスリンシグナル経路の活性化を示す Akt のリン酸化について、恒常的発現レベルならびに脳室内へのインスリン投与に対する応答性を検討したが、IRS-2 欠損による影響は認められなかった。さらに下流の GSK3 $\beta$ 、FOXO、S6K1、4E-BP1 や、分子シャペロンの発現を司る HSF-1 とその下流遺伝子、酸化ストレス応答を司る Nrf2

や Keap1 と下流の抗酸化関連タンパク質、オートファジー関連等の分子について、ウェスタンブロットによりタンパク質レベルならびにリン酸化レベルを検討した。その結果、4E-BP1 のみ、タンパク質発現レベルが IRS-2 KO において有意に上昇していたが、その変化はごく軽微であった。

これまで、IRS-2 やインスリン受容体、IGF-1 受容体等 IIS 関連の複数の遺伝子改変マウスやカロリー制限でアミロイド病理形成が抑制されることが報告されてきた。しかし、IIS 抑制が  $A\beta$  の脳内代謝過程にどのように作用するかについては、未解明であった。本研究では *in vivo*、*in vitro* の複数の解析法を用い、 $A\beta$  の凝集が阻害される可能性を示した。また末梢組織と異なり、脳においては IRS-2 欠損によっても Akt など下流の canonical な IIS 経路の活性に変化が認められなかったことから、IRS-2 特異的な未知のシグナル変化が抗 AD 作用に関わっていると推測された。今後はより網羅的なアプローチも併せ、IIS 抑制がもたらす抗 AD 作用の実態を解明し、それを標的とした介入法へとつなげていく。

## 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 0 件)

[学会発表](計 5 件)

岩坪 威, アルツハイマー病: 超早期の治療に向けて, 第 52 回日本成人病(生活習慣病)学会学術集会, 2018 年

Takeshi Iwatsubo, Alzheimer's disease: from molecular pathology to prevention. 4th Federation of Asian-Oceanian neuroscience societies symposium, 2017 年

佐野 俊春, 若林 朋子, 松井 健太郎, 真野 絢子, 窪田 直人, 門脇 孝, 岩坪 威, IRS-2 の欠損が脳内アミロイド  $\beta$  動態に与える影響の検討, 第 36 回日本認知症学会学術集会, 2017 年

Kentaro Matsui, Kazuki Yamaguchi, Ayako Mano, Toshiharu Sano, Tadafumi Hashimoto, Tetsuya Kubota, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Tomoko Wakabayashi, Takeshi Iwatsubo, The relationship between insulin resistance and amyloid pathology in diabetic AD model mice. Neuroscience 2017, 2017 年

Wakabayashi T, Yamaguchi K, Matsui K, Hashimoto T, Kubota T, Kubota N, Kadowaki T, Iwatsubo T, Effects of diet-induced obesity and

diet control on insulin response and amyloid pathology in the brains of Alzheimer model mice. Neurobiology of Brain Disorders, Gordon Research Conference, 2016 年

〔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

岩坪 威 (IWATSUBO, Takeshi)  
東京大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：50223409

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )