

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24500442

研究課題名(和文) 神経細胞のインスリン抵抗性：改善因子・増悪因子の同定とその作用機序の解明

研究課題名(英文) Insulin resistance in neurons: identification of the improving or worsening factors and their intracellular mechanisms

研究代表者

柳田 俊彦 (YANAGITA, TOSHIHIKO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60295227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経におけるインスリン抵抗性が、認知症やアルツハイマー病に関与することが明らかとなり、神経のインスリンシグナルが、新たな治療標的として注目されている。本研究では、神経保護作用が報告されている薬物(ニコチン、エストラジオール、クルクミンなど)が、インスリンシグナルを増強させる一方、神経毒性が報告されている薬物(免疫抑制薬、アルコールなど)では、シグナルの減弱が見られることを見出し、その細胞内機序を明らかにした。

さらに、海馬ニューロンで合成されるインスリンは、分泌小胞に蓄えられ分泌刺激によって分泌されること、インスリン前駆体タンパク質の発現量が、アミロイドにより減少することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Dysregulated insulin receptor signaling (insulin resistance) may be involved in dementia and neurodegenerative disease (e.g. Alzheimer's disease), thus insulin receptor signaling being the major molecular targets of neuroprotective drugs. In the present study, we have demonstrated that the insulin receptor signaling was up- and down-modulated by several therapeutic drugs and bioactive agents (e.g. nicotine, curcumin, immunosuppressants and alcohol) via multiple intracellular mechanisms. Synthesized insulin in rat hippocampal neurons is secreted by depolarization, and the activation of glycogen synthase kinase-3 in Amyloid (1-42)-induced Alzheimer's model hippocampal neurons decreases the insulin synthesis.

研究分野：薬理学 神経科学

キーワード：インスリン抵抗性、インスリン受容体シグナル、神経変性疾患、海馬神経細胞、アミロイド、発現調節、ネガティブフィードバック、脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

脳・神経系において、インスリン受容体シグナルが、神経新生、神経突起の伸長、神経回路網の形成・維持・修復、記憶・学習などを促進すること (J Pharmacol Exp Ther. 299. 401-407. 2001; Science 300. 502-503. 2003; Neuron 42:877-879. 2004)、インスリン受容体とその下流のシグナル伝達分子の発現量や機能の異常が、痴呆、神経変性疾患 (アルツハイマー病など) の病態に關与していることが明らかとなってきた (Trend Pharmacol Sci. 23:288-293. 2002; J Pharmacol Sci 99:128-143. 2005)。さらに、糖尿病患者においてアルツハイマー病の発症が有意に増加するという臨床報告 (Neurology 53. 1937-1942. 1999、Lancet Neurology 5. 64-74. 2006) がきっかけとなり、糖尿病やアルツハイマー病モデル実験動物の脳において、インスリン抵抗性が起こっていることが明らかになってきた (Neuroscience 90. 737-745. 1999; Neurosci Biobehav Rev. 25. 311-323. 2001)。それを裏付けるように、インスリンを点鼻投与 (脳内に速やかに移行する) すると、実験動物のみならず、健常成人やアルツハイマー病患者においても、記憶・学習が改善されることが明らかとなった (Lancet Neurol. 3:169-178. 2004; Proc Natl Acad Sci U S A. 101. 3100-3105. 2004; J. Neurol. Sci. 245. 21-33. 2006)。

これらの知見は、認知症や神経変性疾患の予防や治療として、神経系のインスリン受容体シグナル異常を是正することの有効性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経系におけるインスリン抵抗性の改善を目指して、神経系のインスリン受容体シグナルを増強させる薬物・生理活性物質について、作用機序の詳細な解析を行う。

本研究の成果は、神経系のインスリン受容体シグナル分子の発現調節機構を解明するという学術的な意義だけでなく、認知症や神経変性疾患の発症を未然に防ぐ、あるいは、その進行を遅らせるような新たな予防法・治療法に関する重要な基礎情報を提供しうる。

## 3. 研究の方法

神経系のインスリン受容体シグナルを増強させる可能性をもつ薬物・生理活性物質・食品に含まれる成分について、(1) 培養細胞系における細胞内機序の *in vitro* 検討と、(2) 動物実験モデルラット・遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* 検討を行う。

(1) 発現が変動するインスリン受容体シグナル分子の同定と細胞内機序の解析  
培養細胞系 (神経堤由来のウシ副腎髄質細胞、PC12 細胞、海馬培養細胞、グリア細胞) を用いて、インスリン受容体、および、その下流のシグナル分子群の発現の変動とその細胞内機序を詳細に解析する。

インスリンシグナルの変動を確認済みで、その機序を解析中の薬物・生理活性物質

エストラジオール、  
クルクミン、  
レスヴェラトロール、  
Glucagon-like peptide-1、  
3系必須脂肪酸 (エイコサペンタエン酸、  
ドコサヘキサエン酸)、  
デキサメサゾン、  
シクロオキシゲナーゼ阻害薬、  
アルコール (アルコールのみ増悪因子)

(2) 動物実験モデルラット・遺伝子改変マウスにおける効果解析

インスリン抵抗性の改善が期待されるものについては、動物実験モデルラット (アルツハイマーモデルラット、I型/II型糖尿病モデルラット)、および遺伝子改変マウス (インスリン受容体、IRS-1/-2、GSK-3) に投与し、インスリン受容体シグナル伝達分子群の脳内における発現量、局在の変化や、その効果について解析する。さらに、学習・記憶・行動の変化について解析を行い、インスリンシグナル伝達分子の発現の変化との相関を検討する。

培養細胞系での解析を終了し、動物実験モデルでの解析を開始した薬物・生理活性物質

インスリン/リチウム  
ニコチン  
免疫抑制薬 (サイクロスポリン A / FK506)  
Heat shock protein 90 (Hsp90) 阻害薬

#### 4. 研究成果

神経のインスリン受容体シグナルが、神経新生や神経機能の維持・修復、学習・記憶に重要な役割を果たすこと、アルツハイマー病などの神経変性疾患において脳におけるインスリン抵抗性が起こっていることが明らかになってきた。本研究では、臨床で用いられている様々な薬物や生理活性物質、食事に含まれている成分などが、神経系のインスリン受容体シグナルに及ぼす影響について、詳細な解析を行い、(1)~(3)の研究成果を得た。また、インスリン受容体シグナルに伴う細胞機能の変動因子として、電位依存性 Na チャネルの機能・細胞膜発現量の変動、カテコールアミン分泌に及ぼす影響を解析し、派生的に (4)~(7)の研究成果を得た。

(1) 神経保護作用が報告されている薬物や生理活性物質(ニコチン、エストロジオール、クルクミン、ドコサヘキサエン酸、レスヴェラトロール など)は、インスリン受容体の下流のシグナル分子である IRS-1/IRS-2 の発現増加を介してインスリン受容体シグナルを増強させた。

(2) アルコールは、インスリンのインスリン受容体への結合を阻害することにより、インスリンシグナルを減弱させた。

(3) マウス培養海馬ニューロンにおけるインスリンの生合成と分泌機構ならびに、それらに対するアミロイド 1-42 の及ぼす影響について pHluorin [pH7.4(細胞外の環境を反映)で発光、pH5.0(分泌小胞内の環境を反映)で消光] 付加インスリンの発現系をもちいて可視化検討した結果、(i) 海馬ニューロンで合成されるインスリンは、分泌小胞に蓄えられ、脱分極後の細胞内カルシウム濃度上昇に伴って細胞外に分泌されること (ii) インスリンの前駆体タンパク質であるプロインスリンの発現量が、アミロイド 1-42 による Glycogen synthase kinase-3 の活性変動を介して減弱することが明らかとなった。

(4) Endothelin-1 により電位依存性 Nav1.7 チャネルの細胞膜発現が低下し、その結果、Nav1.7 刺激によっておこるカテコラミン分泌やタウ蛋白の脱リン酸化が減少した。

(5) Orexin と Orexin 受容体が、培養ウシ副腎髄質細胞に発現していること、さらに、Orexin により受容体を刺激すると、カテコールアミン分泌が抑制される一方、Orexin と Orexin 受容体の発現が減少する(ネガティブフィードバック機構が存在する)ことを明らかにした。

(6) Tumor necrosis factor- $\alpha$  が、培養ウシ副腎髄質細胞ならびにラット後根神経節細胞において電位依存性 Nav1.7 チャネルの細胞膜発現量 mRNA 増加を介して増加させる

ことを明らかにした。これらの反応は炎症による痛みの惹起に関連している可能性が示唆された。

(7) ヘモグロビン由来ペプチド RVD-ヘモプレッシンのラット脳室内投与はボンベシンにより惹起される中枢性副腎髄質系賦活に対し脳内カンナビノイド CB1 受容体を介して抑制的に作用することを明らかにした。

#### 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)

[雑誌論文](計 7件)

1. Tanaka K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Nakamura K, Taniuchi K, Dimitriadis F, Yokotani K, Saito M. Brain RVD-haemopressin, a haemoglobin-derived peptide, inhibits bombesin-induced central activation of adrenomedullary outflow in the rat. Br J Pharmacol. 2014 171(1):202-213. (査読有)

2. Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Yanagita T, Maruta T, Fujita H, Koshida T, Yonaha T, Wada A, Sawaguchi A, Murakami M. New insights concerning insulin synthesis and its secretion in rat hippocampus and cerebral cortex: amyloid-1-42-induced reduction of proinsulin level via glycogen synthase kinase-3. Cell Signal. 2014 26(2): 253-259. (査読有)

3. Tamura R, Nemoto T, Maruta T, Onizuka S, Yanagita T, Wada A, Murakami M, Tsuneyoshi I. Up-regulation of Nav1.7 sodium channels expression by tumor necrosis factor- $\alpha$  in cultured bovine adrenal chromaffin cells and rat dorsal root ganglion neurons. Anesth Analg. 2014 118(2): 318-324. (査読有)

4. Nakamura K, Shimizu T, Yanagita T, Nemoto T, Taniuchi K, Shimizu S, Dimitriadis F, Yawata T, Higashi Y, Ueba T, Saito M. Angiotensin II acting on brain AT1 receptors induces adrenaline secretion and pressor responses in the rat. Sci Rep. 2014 28;4:7248. (査読有)

5. Nemoto T, Yanagita T, Maruta T, Sugita C, Satoh S, Kanai T, Wada A, Murakami M. Endothelin-1-induced down-regulation of Nav1.7 expression in adrenal chromaffin cells: attenuation of catecholamine secretion and tau dephosphorylation. FEBS Lett. 2013 587(7): 898-905. (査読有)

6. Nemoto T, Toyoshima-Aoyama F, Ueda Y, Ohba T, Yanagita T, Watanabe H, Shirasaka T, Tsuneyoshi I, Ishida Y, Hirota K, Sawaguchi A, Murakami M. Involvement of the orexin system in adrenal sympathetic regulation. Pharmacology. 2013;91(5-6):250-8. (査読有)

7. Sakuma M, Shirai Y, Yoshino K, Kuramasu M, Nakamura T, Yanagita T, Mizuno K, Hide I, Nakata Y, Saito N. Novel PKC-mediated phosphorylation site(s) on cofilin and their potential role in terminating histamine release. Mol Biol Cell. 2012 23(18): 3707-3721. (査読有)

〔学会発表〕(計 14件)

1. 丸田豊明, 根本隆行, 藤田皓, 吉永砂織, 柳田俊彦, 武谷立  
グルコースのNa<sup>+</sup>チャネル抑制効果について  
第68回日本薬理学会西南部会  
2015年11月21日  
海峡メッセ下関(山口県下関市)

2. 柳田俊彦, 根本隆行, 豊嶋典世, 丸田豊明, 越田智広, 澤口朗, 武谷立  
神経系におけるインスリンシグナル:インスリン受容体シグナル分子群の発現変化とインスリン生合成の変動  
生体制御・創薬研究ワークショップ  
(シンポジウム講演)  
2014年3月15日  
プラザNヴァリエホール(鹿児島県鹿児島市)

3. 根本隆行, 豊嶋典世, 柳田俊彦, 藤田皓, 越田智広, 丸田豊明, 澤口朗  
海馬ニューロンにおけるインスリン合成と分泌  
第87回日本薬理学会年会  
2014年3月19-21日  
仙台国際センター(宮城県仙台市)

4. 柳田俊彦, 根本隆行, 豊嶋典世, 丸田豊明, 越田智広, 澤口朗, 武谷立  
神経系のインスリンシグナル:インスリン生合成とインスリン受容体シグナル分子群の発現調節機構  
日本トランスポーター研究会九州部会  
(シンポジウム講演)  
2014年11月22日  
産業医科大学 ラマツィーニホール  
(福岡県北九州市)

5. 根本隆行, 豊嶋典世, 吉永砂織, 丸田豊明, 柳田俊彦, 澤口朗, 武谷立  
アミロイドによる海馬ニューロンのインスリン発現低下メカニズム  
第67回日本薬理学会西南部会  
2014年11月23日  
産業医科大学 ラマツィーニホール  
(福岡県北九州市)

6. 柳田俊彦, 根本隆行, 佐藤伸矢, 丸田豊明, 吉川教恵, 杉田千秦, 村上学  
Heat shock protein 90 オリゴマーによるInsulin受容体, Insulin-like growth factor-1受容体のホモ2量体化調節機構  
第86回日本薬理学会年会  
2013年3月21-23日  
福岡国際会議場(福岡県福岡市)

7. 根本隆行, 柳田俊彦, 杉田千秦, 和田明彦, 村上学  
Endothelin-1による電位依存性Nav1.7チャネルの発現低下  
第86回日本薬理学会年会  
2013年3月21-23日  
福岡国際会議場(福岡県福岡市)

8. 根本隆行, 柳田俊彦, 藤田皓, 西村沙樹, 越田智広, 與那覇哲, 丸田豊明, 田村隆二, 村上学  
ロイシンによるカテコールアミン産生機序解明: LAT~mTORシグナルの関与  
第8回トランスポーター研究会年会  
2013年6月15-16日  
熊本大学薬学部(熊本県熊本市)

9. 清水孝洋, 田中健二郎, 柳田俊彦, 根本隆行, 中村久美子, 谷内恵介, 横谷邦彦, 齋藤源顕  
ヘモグロビン由来ペプチド RVD-ヘモプレッシンは脳内カンナビノイドCB1受容体を介してボンベシンによる中枢性副腎髄質系賦活を抑制する  
第66回日本自律神経学会総会  
2013年10月24-25日  
愛知県産業労働センターウインクあいち  
(愛知県名古屋市)

10. 清水孝洋, 田中健二郎, 柳田俊彦, 根本隆行, 中村久美子, 谷内恵介, 横谷邦彦, 齊藤源頭

ヘモグロビン由来ペプチド RVD-ヘモプレッシンのラット脳室内投与はポンベシンにより惹起される中枢性副腎髄質系賦活に対し脳内カンナビノイド CB1 受容体を介して抑制的に作用する

第 66 回日本薬理学会西南部会

2013 年 11 月 16 日

福岡大学薬学部 (福岡県福岡市)

11. 根本隆行, 豊嶋典世, 柳田俊彦, 藤田皓, 越田智広, 澤口朗

ラット海馬ニューロンにおけるプロインスリン発言はアミロイド により低下する: GSK-3 の関与

第 66 回日本薬理学会西南部会

2013 年 11 月 16 日

福岡大学薬学部 (福岡県福岡市)

12. Yanagita T., Nemoto T., Satoh S., Yoshikawa N., Maruta T., Murakami M.

Neuronal insulin receptor signaling: regulateon by therapeutic drugs and bioactive agents.

International Conference and Exhibition on Neurology & therapeutics

(シンポジウム講演)

2012 年 5 月 14-16 日

Embassy Suites (Las Vegas USA)

13. 根本隆行, 柳田俊彦, 杉田千秦, 村上学

Endothelin-1-induced down-regulation of Nav1.7 expression in adrenal chromaffin cells: attenuation of catecholamine release and tau dephosphorylation.

日本トランスポーター研究会九州部会

2012 年 9 月 1 日

福岡県歯科医師会館(福岡県福岡市)

14. 根本隆行, 柳田俊彦, 杉田千秦, 和田明彦, 村上学

Endothelin-1 による電位依存性 Nav1.7 チャネルの発現低下

第 65 回日本薬理学会西南部会

2012 年 11 月 23 日

熊本大学薬学部(熊本県熊本市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Yanagita T, Nemoto T, Satoh S, Yoshikawa N, Maruta T, Shiraishi S, Sugita C, Murakami M.

Neuronal insulin receptor signaling: a potential target for the treatment of cognitive and mood disorders.

Mood Disorder. Kocabasoglu N (eds).

InTech. 2013. P263-287

〔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

柳田 俊彦 (YANAGITA TOSHIHIKO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 60295227

(2)研究分担者

根本 隆行 (NEMOTO TAKAYUKI)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 90506833

村上 学 (MURAKAMI MANABU)

弘前大学・医学部・教授

研究者番号: 80302090

(3)連携研究者

( )

研究者番号: