

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461341

研究課題名(和文)APP修飾認知症モデル動物における脳内インスリン作用と認知機能障害機序の解析

研究課題名(英文)Evaluation of the association between intracerebral insulin action and cognitive impairment in animal models of Alzheimer disease

研究代表者

河島 淳司(Kawashima, Junji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70467984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インスリン抵抗性モデルマウスであるIRS1ノックアウト(IRS1KO)マウスと、アルツハイマー病モデルマウスであるAPP23トランスジェニック(APP23Tg)マウスおよびヒト変異APPノックイン(APP NL/F KI)マウスをそれぞれ掛け合わせ、APP23Tg・IRS1KOマウスとAPP NL/F KI・IRS1KOマウスを作成した。

APP23Tg・IRS1KOマウスにY字迷路試験を行ったが、6ヶ月齢、12ヶ月齢、18ヶ月齢、24ヶ月齢、いずれの月齢においてもそれぞれのマウス群で認知機能に差を認めなかった。APP NL/F KI・IRS1KOマウスでも同様の結果であった。

研究成果の概要(英文)：We generated Alzheimer disease model mice with insulin resistance by mating IRS1 knockout (IRS1KO) mice with the Alzheimer disease model mice, APP23 transgenic (APP23Tg) mice or human mutant APP knock-in mice (NL/F KI), respectively.

It was not significant difference in cognitive function determined by Y maze test between APP23Tg (-)-IRS1 wild type (WT) mice, APP23Tg(+)-IRS1WT mice, APP23Tg(-)-IRS1KO mice and APP23Tg(+)-IRS1KO mice.

It was not significant difference in cognitive function determined by Y maze test between APPWT-IRS1WT mice, NL/F homo KI-IRS1WT mice, APPWT-IRS1KO mice and NL/F homo KI-IRS1KO mice.

研究分野：代謝・内分泌

キーワード：認知症 インスリン抵抗性

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会となった日本において、認知症を有する患者の増加が深刻な社会問題となっている。以前より糖尿病患者では脳血管性認知症の発症リスクが高いことが知られていたが、最近ではアルツハイマー型認知症 (AD) の発症リスクも高くなることが示されており (Biessels GJ, et al. *Lancet Neurol*, 2006, Matsuzaki T, et al. *Neurology*, 2010) AD の発症に耐糖能異常が関与している可能性が示唆されている。

AD では長期記憶が強く障害されるのが特徴であるが、この長期記憶の形成に重要な役割を担っているのが海馬であり、AD 患者の脳では海馬が萎縮していることがわかっている。AD の発症には、細胞外に分泌されたアミロイド (A β) が凝集し、細胞外に蓄積することと、GSK3 (glycogen synthase kinase 3) の活性上昇に伴う Tau タンパクの過剰リン酸化によって神経原線維変化が形成されることの両者が重要であると考えられている。

高血糖により早期から AD モデルマウスの認知機能障害が惹起されること (Takeda S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010) Tau タンパクのリン酸化が増強し、神経原線維変化がより早期から出現すること (Ke YD, et al. *PLoS One*, 2009) A β プラークの数が増加すること (Jolivalt CG, et al. *Exp Neurol*, 2010) などが報告されていることから、糖尿病が AD 発症に与える影響因子として高血糖が重要な要因の一つと考えられているが、その他にも高インスリン血症、インスリン抵抗性、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、脳内でのインスリンシグナル異常などが候補として挙げられている。

インスリンがインスリン受容体に結合すると、インスリン受容体自らの自己リン酸化が起こり、下流へと刺激が伝達される。インスリン受容体からのシグナルを細胞内に伝達する役割を担っている代表的なタンパクが Insulin receptor substrate (IRS) であり、主な IRS タンパクとして IRS-1 と IRS-2 が知られている。我々が作製した IRS-1 を欠損させたマウス (IRS-1 ノックアウトマウス) は、成長障害の他にインスリン抵抗性に伴う高インスリン血症、耐糖能異常を認めることが知られている (Araki E, et al. *Nature*, 1994)。一方、IRS-2 を欠損させたマウス (IRS-2 ノックアウトマウス) は成長障害をわずかに認め、インスリン抵抗性と著しい高血糖を呈することが報告されている (Withers DJ, et al. *Nature*, 1998)。インスリン刺激は、骨格筋において IRS タンパクを介してグリコーゲン合成に関わる GSK3 (glycogen synthase kinase 3) をリン酸化し、不活化することでグリコーゲン合成を促進するが、脳においてもインスリンは IRS-1 を介して GSK3 をリン酸化することが解明されてきた。脳における IRS タンパクの報告として、IRS-2 ノッ

クアウトマウスではコントロールマウスと比較して神経細胞増殖が低下し、脳が小さくなるが、IRS-1 ノックアウトマウスでは神経細胞増殖が低下しているにもかかわらず、脳の大きさは体に比し大きいことがわかっている (Schubert M, et al. *J Neurosci*, 2003)。また、IRS-2 ノックアウトマウスの脳では Tau タンパクの過剰リン酸化が起きていることが報告されている (Schubert M, et al. *J Neurosci*, 2003) が、IRS-1 ノックアウトマウスの脳における Tau タンパクのリン酸化状態については報告されていない。

アルツハイマー型認知症 (AD) 発症における IRS-1 タンパクの関連性に関する報告として、AD 患者の脳では糖尿病がない状態でも IRS-1 のセリンリン酸化が増加して、インスリンシグナル伝達が障害されていること (Talbot K, et al. *J Clin Invest*, 2012) ラット海馬の primary culture において可溶性の A β オリゴマーが IRS-1 のセリンリン酸化を誘導すること (Bomfim TM, et al. *J Clin Invest*, 2012) が明らかとなったことから、脳内における IRS-1 を介したインスリン抵抗性を主体とした糖代謝障害が AD の発症・進展に起因している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

AD モデルマウスにおける脳内インスリンシグナルを検討した報告は少なく、IRS-1 を欠損させたマウス (IRS-1 ノックアウトマウス) における認知機能について検討された研究は見当たらないため、AD と脳内インスリンシグナル異常に焦点を当て、脳内でのインスリンシグナル、特に IRS-1 が記憶形成障害ならびに AD の発症・進展に寄与すると仮定し、IRS-1 ノックアウトマウスにおける記憶形成障害のメカニズムを分子レベルで解析することを目的とする。

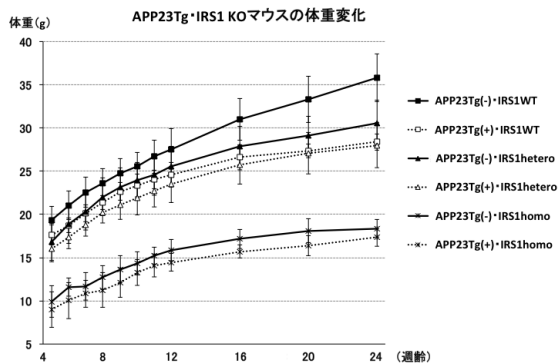
3. 研究の方法

本研究では、AD モデルマウスと IRS-1 ノックアウトマウスを用いて AD 発症・進展に対する IRS-1 の影響を解析するため、AD モデルマウスである APP23 過剰発現マウス (APP23Tg マウス) とヒト変異 APP ノックインマウス (APP NL/F KI マウス) を使用する。この 2 種類の AD モデルマウスと IRS-1 ノックアウトマウス (以下 IRS1 KO マウス) をそれぞれ交配し、IRS-1 欠損 AD モデルマウスを作成した後、これらのマウスの認知機能について Y 字迷路試験などを用いて評価する。

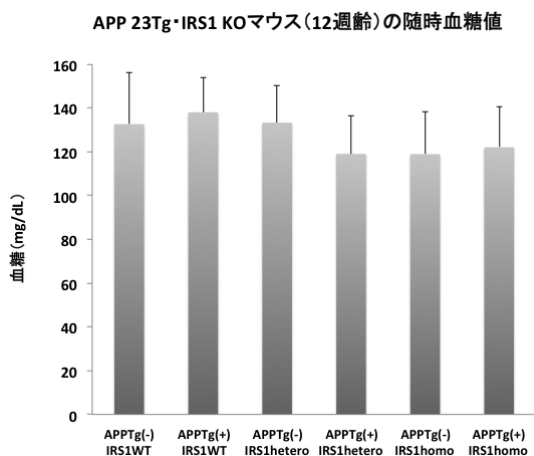
4. 研究成果

IRS1 KO マウスと、AD モデルマウスである APP23 トランスジェニックマウス (以下 APP23Tg マウス) およびヒト変異 APP ノックインマウス (以下 APP NL/F KI マウス) をそれぞれ掛け合わせ、APP23Tg・IRS1 KO マウスと APP NL/F KI・IRS1 KO マウスを作成した。(1) オスの APP23Tg・IRS1 KO マウスにおい

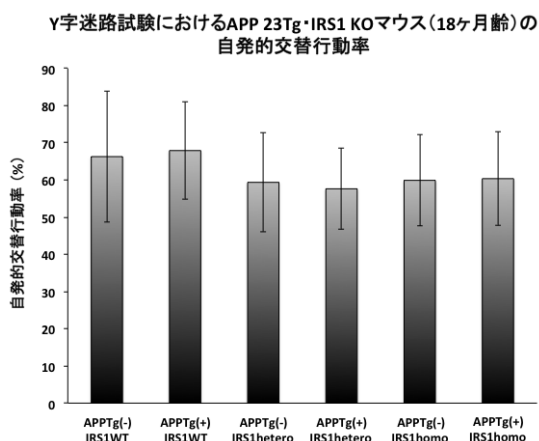
て、IRS1 Wild type (WT) マウスでは APP23Tg(-) マウスと比べて APP23Tg(+) マウスで有意に体重が少なく、体重増加が緩やかであった。一方、IRS1 hetero KO マウスおよび IRS1 homo KO マウスでは APP23Tg(-) と APP23Tg(+) マウスで体重に差が認められなかった。



6 週齢、12 週齢における血糖値は APP23Tg の有無、IRS1 遺伝子の種類 (WT、hetero もしくは homo) にかかわらず、いずれのマウス群でも差が認められなかった。



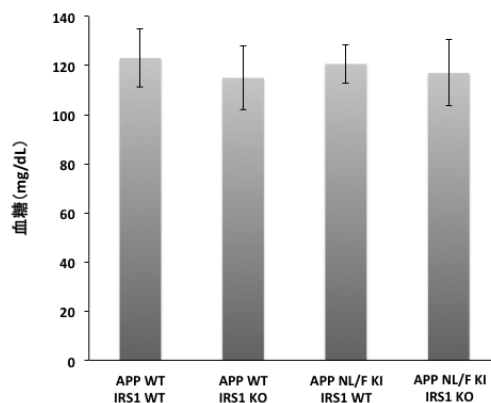
Y 字迷路試験を用いた認知機能を行い、6 ヶ月齢、12 ヶ月齢、18 ヶ月齢、24 ヶ月齢での認知機能の評価したが、自発的交替行動率 (Percent alternation) は、いずれの月齢においてもそれぞれのマウス群で差を認めなかった。



(2) オスの APP NL/F KI · IRS1 KO マウスにおいて、ヒト変異 APP ノックインの遺伝子タイプ (WT、hetero ノックインもしくは homo ノックイン) にかかわらず、IRS1 KO マウスは IRS1 WT マウス及び IRS1 hetero KO マウスと比べ有意に体重が少なかった。また、IRS1 WT マウス、IRS1 hetero KO マウスおよび IRS1 homo KO マウスそれぞれについて APP ノックインの遺伝子タイプ別に体重を比較した場合は、いずれの群においても差を認めなかった。

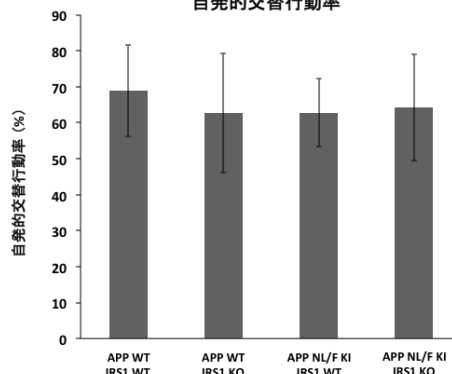
6 週齢、12 週齢における血糖値は全てのマウス群で差が認められなかった。

APP NL/F KI · IRS1 KO マウス (♂20 週齢) の随時血糖値



これらのマウスに Y 字迷路試験を行い、6 ヶ月齢、12 ヶ月齢、18 ヶ月齢での認知機能の評価したところ、自発的交替行動率はいずれの月齢においてもそれぞれのマウス群で差を認めなかった。

Y字迷路試験におけるAPP NL/F KI · IRS1 KO マウス (♂18ヶ月齢) の自発的交替行動率



本研究では、マウスによりストレスのかからない試験である Y 字迷路試験を選択し、認知機能の評価したが、今後は水迷路試験を用いて評価する予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

河島 淳司 (KAWASHIMA, Junji)
熊本大学大学院 生命科学研究部・助教
研究者番号：70467984

(2) 研究分担者

荒木 栄一 (ARAKI, Eiichi)
熊本大学大学院 生命科学研究部・教授
研究者番号：10253733

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()