

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告

栄養代謝調節経路の変容による認知機能低下発症機構の解明に関する研究 (21-3)

主任研究者 田口 明子 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部 (部長)

研究要旨

中年期の肥満・2型糖尿病は、認知症のリスク要因の一つとして広く知られるようになったが、最近の研究から、高齢期では、肥満は認知症を抑制する一方で、体重減少・低栄養が認知症を誘導する重要な要因であることが明らかとなってきた。先行研究から、栄養エネルギー代謝調節経路インスリンシグナルの主要調節分子であるインスリン受容体基質1の特定セリン残基のリン酸化の亢進がアルツハイマー病(AD)患者死後脳で発見されていたが、これらの変化が脳のどのような細胞で生じているのか、また、栄養代謝と認知機能の調節における当該分子の脳での役割については不明である。本研究では、当該分子を介した脳インスリンシグナルと認知機能および体系的栄養エネルギー代謝の相互関係の解明を介して、認知症の根本的な発症機序に迫ることを目標としている。

2型糖尿病を誘導した次世代型ADモデルマウスの解析から、認知機能が正常な中年期以前と認知機能障害が生じる中年期以降の栄養エネルギー代謝、認知機能および脳の当該分子の変化は異なることを見出した。他方、我々は、グリア細胞における当該分子の不活性化が糖代謝異常と認知機能障害を誘導することを突き止めたが、この時の脳でのシグナル分子の変容は、AD患者死後脳解析結果と一部重複することを明らかにした。これらの結果から、当該分子の脳、特にグリアでの機能は、全身の栄養エネルギー代謝と認知機能の調節に密接に関与することが示唆された。

主任研究者

田口 明子 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部 (部長)

分担研究者

柴山 雄大 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部 (研究員)

辻 竜平 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部 (研究員)

王 蔚 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部 (外来研究員)

田之頭大輔 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部 (外来研究員)

A. 研究目的

栄養エネルギー代謝調節経路インスリンシグナルの主要調節分子であるインスリン受容体基質 1 (IRS1) の特定セリン (Ser) のリン酸化の亢進が AD 患者死後脳で発見されていたが、これらの変化が脳のどのような細胞で生じているのか、また、栄養代謝と認知機能の調節における脳 IRS1 の役割については不明な部分を多く残している。

本研究では、2 型糖尿病を誘導した若齢および中年期の次世代型 AD モデル (APPKI) マウス、グリア特異的 IRS1 欠損マウスの各種変異マウスの認知機能と栄養代謝について検討すると共に、AD 患者死後脳における網羅的なシグナル分子の変化についての解析から、脳 IRS1 と認知機能および体系的栄養エネルギー代謝の相互関係を明らかにし、根本的な認知症発症機序を理解することを目的とする。

B. 研究方法

1. 2 型糖尿病付加 AD モデルマウスおよびグリア特異的 IRS1 欠損マウスの作製：

- 1)-1 2 型糖尿病誘導若齢期 AD モデルマウスの作製： APPKI マウスに 4 週齢から 16 週齢まで高脂肪食 (60kcal% 脂肪含有量) を投与し作製。
- 1)-2 2 型糖尿病誘導中年期 AD モデルマウスの作製： APPKI マウスに 4 週齢から 37 週齢まで高脂肪食 (60kcal% 脂肪含有量) を投与し作製。
- 2) グリア特異的 IRS1 変異マウス：アストロサイト特異的 hGFAP-Cre マウスと floxedIrs1 マウスの交配後 6 週齢でタモキシフェンを投与し、成体アストロサイト特異的欠損マウスを作製。

2. ヒト疾患組織：AD 患者死後脳：

神経原線維変化ステージ V, VI の前頭前野、運動野を使用 (新潟大学脳研から供与)。

3. 糖代謝調節経路および関連シグナルの解析：

各種マウスから脳および糖代謝関連末梢組織を分離後ホモジネートした細胞溶解液を用いて、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA 法および質量分析法により解析を行った。

4. 組織学的解析：

各種マウスから脳および末梢組織を分離、固定、脱水後、切片を作製した。神経細胞新生、神経炎症等を査定するため、特異的な各種抗体およびその他標的分子の抗体を用いた免疫組織学的解析を行い評価した。

5. 行動解析：

自発活動量、空間認知記憶、長期記憶をオープンフィールド試験、Y 字迷路試験、T 字水迷路試験、モリス水迷路試験、受動回避試験により解析した。

6. 代謝パラメーター解析：

体重、血糖値は週毎に測定し、血中ホルモン値はELISA解析により測定した。糖代謝能はグルコース耐性試験およびインスリン耐性試験により評価した。血中脂質については生化学検査によって評価した。深部体温は直腸温度により評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験管理規程及び国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験管理細則に準ずる。動物実験での使用個体数は綿密に実験計画を立てた後、必要最小限に留め、実験終了後はすみやかに麻酔により安楽死させる。動物実験は、国立長寿医療研究センターの動物実験委員会での審査を受けて実施する。また、その愛護に留意し、痛みを防止するため適切な麻酔薬などを用いて実験を行う。実験動物数は最小限に留め、屠殺は法令で決められた方法に準拠する。

C. 研究結果

1. 2型糖尿病がAD病態へ与える影響についての検討

APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスは、6ヶ月齢から認知機能障害を発症することが報告されている(Saito et al. 2014)。我々はこれまでに、高脂肪食(HFD)付与による生理的2型糖尿病モデルマウスは、中年期以降で認知機能の低下を示すことを明らかにしている(Tanokashira et al. 2018; 2019; Wang et al. 2019)。そのため、HFD付与APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスを作製し、2型糖尿病がAPPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスの表現型を増悪化するのかについて明らかにするため、①認知機能が正常な若齢期のAPPKI^{NL-GF/NL-GF}にHFDを付与したYoung (Yg) HFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスと②認知機能障害が誘導される中年期のHFD付与APPKI^{NL-GF/NL-GF} (Middle-agedHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウスを作製した。

① 2型糖尿病付与若齢APPKI^{NL-GF/NL-GF} (YgHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウス：

2型糖尿病付与若齢APPKI^{NL-GF/NL-GF} (YgHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウスは、YgHFD-WTマウスと同様に有意な体重増加を示し、同程度の高インスリン血症を示したが、YgHFD-WTマウスより重篤な耐糖能異常を呈することが分かった。さらに、Yg HFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスでは体温調節異常が観察され、さらに興味深いことに、餌の種類に関係無くYg-APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスでは血中ケトン値の顕著な低下が観察されることが明らかになった。しかしこの時、観察されたこれらの栄養代謝異常は、APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスの若齢期から上昇が見られるアミロイドβ (Aβ40, Aβ42) 値へ影響を与えず記憶学習能にも障害を誘導しなかった(Wang et al. in press)。

② 2型糖尿病付与中年期APPKI^{NL-GF/NL-GF} (Middle-agedHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウス：

2型糖尿病付与中年期APPKI^{NL-GF/NL-GF} (Middle-agedHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウスは、YgHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスとは対照的に、HFDの付与による2型糖尿病、脂質異常に対して抵抗性を示し良好な栄養代謝機能を保持するが、一方で顕著な体温調節障害を発症し、認知機能障害の進行を示すことが分かった。しかしこの時、HFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}マウスと

同様にA β 値に変化は見られず、さらに、ミクログリアの活性化も見られないが、AD患者死後脳で発見された脳IRS1Serリン酸化の亢進が起きていることを明らかにした (Tanokashira et al. 投稿準備中)。

2. 認知機能・栄養エネルギー代謝の調節におけるアストロサイト IRS1 の役割についての検討

アストロサイトは、脳のエネルギー栄養代謝調節を担う中心的役割を果たしているが、認知機能障害を呈する2型糖尿病モデルマウスの脳では、老化と類似のアストロサイトの変化が観察される。これらの結果と脳/神経特異的 IRS1 欠損は顕著な変化を誘導しない (未発表データ) という結果に鑑み、アストロサイト特異的 IRS1 欠損 (GFAP-IRS1K0) マウスを作製した。これまでに、GFAP-IRS1K0 マウスでは、体重、随時血糖値に変化は見られ無いが、若齢期で耐糖能異常を示すと共に認知機能障害およびアストロサイトの老化様形態異常が観察され、ミトコンドリア関連因子と脳の糖代謝関連分子群および海馬の乳酸値の顕著な変化が惹起されていることを見出した。

3. AD 患者死後脳を用いた解析

AD患者死後脳を用いた先行研究においてIRS1の特異的Serリン酸化の亢進が発見されたことから、脳IRS1の認知症への関与が示唆されているが、日本国内で得られたAD患者死後脳で同様の変化が見られるのか、さらに、IRS1の変容および関連シグナル経路因子の変化についても未だ明らかでは無い。また、IRS1と相補的に機能するIRS2の解析に必要な特異的で信頼性の高い解析ツールが普及していないことから、AD死後脳でのIRS2の変化についても確かな知見は無い。我々は、ヒトでも使用可能な非売品のIRS2抗体を保持しており (共同研究者である米国ハーバード大学医学部Morris White 博士から分与)、IRS2については本抗体を用いて解析を行った。AD患者死後脳 (新潟大学脳研より分与) を用いた解析から、高度な神経細胞脱落と神経原線維変化 (NFT) が進んだ段階の検体で、IRS1/2の両タンパク質が顕著に低下していることを見出した。興味深いことに、この時、IRS1/2上流のインスリン受容体および下流のAkt、MAPKなどのKinasesに有意な変化は見られないことから、IRS1/2の減少は特有の変化である可能性が考えられる。一方で、IRS1/2の減少に連動する変化として、糖代謝調節因子およびエネルギー代謝関連分子の有意な変化が観察された。

D. 考察と結論

1. 若齢期 APPKI マウスは、2型糖尿病の誘導に対して脆弱であることから、A β の蓄積は、栄養エネルギー代謝異常を誘導する可能性が示された。これは、糖尿病が認知症の危険であると共に、認知症が糖尿病の発症に関与するのでは? という一つの可能性を支持する知見となった。一方、栄養代謝異常の亢進が惹起されてもA β 値、認知機能、脳IRS1の特異的Serリン酸化に変化が無かったことから、少なくとも、APPKI マウスにお

ける認知機能障害誘導には、栄養代謝異常に加え、“加齢“という要因が必要である可能性が示された。

2. 中年期以降の APPKI マウスは、若齢期と異なり 2 型糖尿病の誘導に対して抵抗性を示したことから、 $A\beta$ の蓄積は、加齢に伴うエネルギー代謝の低下に抑制的に働く可能性が示された。一方で、認知機能および脳 IRS1 については相加的レベルであるが変化の亢進が見られた際、 $A\beta$ 値に変化は無かったことから、これらの変化の亢進は、 $A\beta$ 値および栄養代謝調節とは独立した機序で誘導されたことが示唆された。
3. アストロサイトの IRS1 は、脳での特異的なエネルギー代謝経路とミトコンドリア機能維持に影響を与えることを一つの端緒として全身の栄養エネルギー代謝調節に影響を与え、糖代謝異常を誘導する可能性が示された。また、アストロサイトの IRS1 は、海馬の神経細胞新生と認知機能に影響を与えることから、当該経路を介した未知の認知機能調節機序が存在する可能性が示された。
4. AD 患者死後脳で観察される糖代謝シグナル主要調節因子の特異的变化は、神経原線維変化の進行ステージで顕著に観察されることから、この特異的变化は、Tau の活性化に関与することが示唆された。また、糖代謝調節因子およびエネルギー代謝関連分子に有意な変化が見られたことから、インスリンシグナルの AD 発症機序への関与の可能性も考えられる。興味深いことに、観察されたこれらの変化の一部は、アストロサイト特異的 IRS1 欠損マウスの脳でも見られることから、重複して見られる糖代謝調節因子およびエネルギー代謝関連分子の変容は、認知症の根本的で未知な発症機序に関与する可能性も考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanokashira D, Wang W, Maruyama M, Kuroiwa C, White MF, Taguchi A. Irs2 deficiency alters hippocampus-associated behaviors during young adulthood. Biochem Biophys Res Commun. 559:148-154 2021 doi:10.1016/j.bbrc.2021.04.101
- 2) Wang W, Tanokashira D, Maruyama M, Kuroiwa C, Saito T, Saido TC, Taguchi A. Young APPKI^{NL-G-F/NL-G-F} mice display high-fat diet-induced metabolic disturbances and specific disorders associated with brain energy homeostasis. BioRxiv 2021 doi:10.1101/2021.12.21.473697
- 3) 田口明子, 石塚公子. 全身性の代謝・炎症から腸内細菌、プロテオスタシスの影

響まで-精神神経疾患と栄養エネルギー代謝障害-
実験医学 39(9):1331-1336, 2021

2. 学会発表

- 1) 田口明子. 神経疾患と栄養エネルギー代謝障害 Neurological disorders and impaired nutritional energy metabolism
第 75 回日本栄養・食糧学会大会 2021 年 7 月 4 日 (Web 開催:招待講演)
- 2) 王蔚、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、Morris F White, 田口明子
グリア細胞インスリンシグナルを介した代謝異常・認知機能障害発症機序の解明
第 63 回日本老年医学会学術集会 2021 年 6 月 11～7 月 4 日 (Web 開催)
- 3) 王蔚、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、Morris F White, 田口明子
栄養代謝および認知機能の調節におけるグリアインスリンシグナルの役割についての検討 第 36 回日本糖尿病合併症学会 2021 年 10 月 8～11 月 8 日 滋賀県大津市 (Web 発表)
- 4) 田口明子、王蔚、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、Morris F White
グリアインスリンシグナルを介した認知機能障害発症機序の解明
第 40 回日本認知症学会学術集会 2021 年 11 月 27 日 東京 (Web 発表)
- 5) 田之頭大輔、王蔚、丸山めぐみ、黒岩智恵美、斉藤貴志、西道隆臣、田口明子
認知症の発症・進行における脳インスリンシグナルの役割
第 47 回日本神経内分泌学会学術集会 2021 年 10 月 30 日 奈良市 (Web 発表)
- 6) Daisuke Tanokashira, Wei Wang, Megumi Maruyama, Chiemi Kuroiwa, Morris White, Akiko Taguchi. IRS2 deficiency accompanied by type 2 diabetes exerts a negative impact on hippocampal-dependent cognitive function
Society for Neuroscience 2021, November 11～12, 2021 (Web presentation)
- 7) 田之頭大輔、王蔚、丸山めぐみ、黒岩智恵美、斉藤貴志、西道隆臣、田口明子.
脳 IRS1 修飾変化を介する認知機能障害の発症・進行機構の解明
Elucidation of the mechanism of onset and progression of cognitive dysfunction mediated by alterations in neural IRS1 modification
第 44 回日本分子生物学会年会 2021 年 12 月 2 日 横浜市 (Web 発表)
- 8) Akiko Taguchi, Ryuhei Tsuji, Wei Wang, Daisuke Tanokashira, Megumi Maruyama, Chiemi Kuroiwa. Effects of glial insulin signaling deletion on cognitive functions
第 99 回日本生理学会大会 2022 年 3 月 17 日 仙台市 (Web 発表)
- 9) 辻竜平、田之頭大輔、王蔚、丸山めぐみ、黒岩智恵美、斉藤貴志、西道隆臣、田口明子. 2 型糖尿病が脳インスリンシグナルとアルツハイマー病態に与える影響

2022 年日本農芸化学会 2022 年 3 月 18 日 (Web 開催)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし