

糖尿病に伴う認知機能障害誘導機構の解明（26－35）

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

研究要旨

年間全体について

従来の認知症研究は、主として病気発症後を対象に既存仮説を基盤として進められてきたが、発症機構は未だ不明で本質的な認知症治療薬も存在しない。認知症は発症までに長い年月をかけて進行することから、認知症の発症前段階を研究対象とし、発症への移行誘導機構を明らかにすることが求められている。近年、糖尿病は認知機能障害を誘導し、認知症の発症を促進する重要なリスク要因であることが、我が国の久山町研究をはじめとする近年の大規模な臨床研究と疾患モデル動物を用いた解析から明らかにされている。これらの知見から、認知機能は脳内だけで管理される訳では無く、糖尿病のような代謝障害の影響を強く受け、体系的に調節される可能性が考えられる。そのため、糖尿病による認知症誘導機構の解明が、本疾患発症の根本的な分子機序解明の手がかりとなり、新たな予防・治療法の開発へと繋がることに期待が持たれている。

本研究では、糖尿病からの体系的な作用が、認知機能障害を誘導するメカニズムとして、糖尿病関連血中因子に着目し、その探索を行い、同定した血中因子が認知機能へ与える影響について解析し、その作用機序を解明することを介して、認知症発症前段階から認知症発症への移行メカニズムの根本原理に迫り、認知症の新たなバイオマーカーの創出と臨床応用へと進展させることを目的としている。

平成 26 年度について

本研究課題主任研究者は、平成 27 年 1 月 1 日付けで国立長寿医療研究センターに着任したが、本年度は、まだ本センター内に研究スペースが無かったため、全実験は、主任研究者の前所属である宮崎大学で行い、異動による研究の遅れが最小限になることを目標とした。我々は、糖尿病を伴い認知症発症前段階を反映する有用なモデル動物として、生理的糖尿病モデル(DIO)マウスの利用を確立し、糖尿病による体内環境の変化が認知機能へ与える影響を解析するためのマウスを用いたスクリーニング系を構築した。本研究では、この実験系を用いて、糖尿病が、認知機能に関与する海馬の神経細胞新生および認知機能行動へ与える影響を解析し、加えて、これらの変化に関与する糖尿病関連血中因子の同定とその機能解析を行い、認知機能障害発症の根本的メカニズムに迫ることを目的とした。

平成 27 年度について

本年度は、本研究に使用する全マウス系統の体外受精による搬入と繁殖の開始による本格的な実験開始のためのセットアップを第一の目的とした。また、本研究で使用する DIO マウスについても、本センターでの繁殖を開始し、本センター繁殖の DIO マウスを用いた実験が行える環境作りを目指した。昨年度までの研究結果から、糖尿病を伴い認知症発症前段階を反映する有用なモデル動物として主任研究者らが使用を確立した DIO マウスの脳インスリンシグナルが認知機能の変化と連動することを明らかにしていた。我々は、糖尿病による認知機能の低下と脳インスリンシグナルの変化を導く体系的な作用として、血中因子を介した経路の関与について精査するため、DIO マウスの血中で変化する血中因子を同定し、血中因子の認知機能および脳インスリンシグナルへの影響を解析し、その機能を解明することにより、認知機能障害誘導機構の根本的分子機序に迫ることを目的とした。

平成 28 年度について

本年度は、昨年度から行ってきた全系統の凍結精子を用いた体外受精が平成 28 年 1 月に完了し、繁殖を開始した後、平成 28 年 7 月から実験に使用可能なマウスの数が徐々に揃ってきたため、本格的に実験を開始することを第一の目的とした。昨年度からセンターで繁殖を開始した DIO マウスを用いた解析を行い、宮崎大学で繁殖した DIO マウスを用いた実験結果との比較から、確かな結果を導くことを目指した。さらに、昨年度 DIO マウスから同定した血中因子 A の既存拮抗薬 (AAD1) が DIO マウスの認知機能へ与える影響について精査することを目的の 1 つとした。また、6 ヶ月齢で認知機能障害を呈する次世代型アルツハイマーモデル (APPKI) マウス (理研 BSI・西道研との共同研究) も数は少ないものの、実験に使用できマウスを得ることができたことから、これらのマウスの脳インスリンシグナルがどのように変化するのか精査することを目指した。一方、認知機能障害を呈することが報告される 1 型糖尿病モデルとしての使用を検討していた既存の薬剤性 STZ モデルマウスを作成・解析を行い、DIO マウスで観察される変化との比較から、糖尿病が導く認知機能障害の分子機序についてさらに深く理解することを本年度の重要な目的とした。

主任研究者

田口 明子 国立長寿医療研究センター統合加齢神経科学研究部 (部長)

分担研究者

澤本 和延 名古屋市立大学大学院医学研究科 再生医学分野 (教授)

研究期間 平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

A. 研究目的

糖尿病が認知症、特に AD の危険因子であることが、国外および我が国の久山町研究をはじめとする多くの臨床と基礎研究から明らかになっている。これらの知見から、認知機能は、脳内だけで管理されるわけではなく、糖尿病による影響を長い時間受け体系的に調節される可能性があることから、糖尿病による AD 前段階から発症までの誘導機構の解明が、本疾患発症の分子機序解明の手がかりとなり、早期診断を可能性にするバイオマーカーやサロゲートマーカーの同定および創薬へと繋がることに期待が持たれている。しかしながら、糖代謝異常を伴い AD の前段階（前認知症）を反映する有用なモデル動物は確立されていない。最近、主任研究者らは、本モデルマウスとして、遺伝子は無損傷で糖代謝異常を伴い認知障害が進行する 2 型糖尿病の生理的モデル（Diet Induced Obesity: DIO）マウスの利用を確立し、体系的な認知機能調節機構の検討として、認知機能を低下させる DIO マウスの血中因子の存在の確認・同定およびその分子基盤の解析のためのスクリーニング系を構築した。主任研究者のこれまでの研究から、インスリンシグナルの主要な調節因子である IRS2（Insulin Receptor Substrate 2）の脳での低下は、個体の寿命を延長し、老化を遅延することが明らかとなっていた。これらの結果から、糖代謝調節経路でもある IRS2 シグナルの脳での亢進が、糖尿病を伴う認知機能の低下および認知機能障害全般に関与する可能性が考えられるが、明らかでは無い。本研究は、糖尿病からの体系的な作用が、認知機能障害を誘導するメカニズムとして、糖尿病関連血中因子に着目していることから、糖尿病を付随する前認知症モデルとして我々が利用を確立した DIO マウスの血液から、変化する血中因子を探索し、同定血中因子が、認知機能へ与える影響とその作用機序を解析することを介して認知障害発症の根本的メカニズムに迫ることを目的とする。

B. 研究方法

年間全体について

1. 研究試料の準備：本研究に使用するマウスは、DIO マウスをはじめとして、遺伝的変異マウス 6 種類が存在するが、本格的な研究を開始するためには、まず、これらの全系統のマウスをセンターの動物施設へ搬入し、繁殖を開始することが必要とされたことから、各種マウスの凍結精子と野生型メスマウスを用いた体外授精を行い、マウスの再作成、コロニーの繁殖から開始した。本研究課題は H26 年 1 月から開始されたものであるが、体外受精によるマウスの搬入が終了したのは H28 年 1 月であったため、全期間の半分以上が本研究を開始するための準備となった。

2. 脳 IRS2 シグナルについての解析：最近の主任研究者の研究から、新たな長寿モデル動物として報告された脳特異的 IRS2 欠損（BIrs2ko）マウスが、老化に伴う認知機能の低下を抑制することが明らかになったことから（論文投稿準備中）、認知機能の低下と脳 IRS2 の変化が連動する可能性が考えられる。これらのことから、各種モデルマウスの海馬のタンパク質を用いた生化学的解析を行い脳の IRS2 シグナルの変化について検討した。

3. 加齢に伴う神経炎症と神経細胞新生についての解析：各種マウスの脳を用いた免疫組織学的解析から、海馬の神経細胞新生および神経炎症について調査した。
4. 血中因子の探索と測定：DIO マウスの血中因子の探索と同定因子の血中における濃度測定については、タンパク質多項目同時解析および ELISA 法より精査した。
5. 薬剤性および新規糖尿病マウスの作製：2 型糖尿病モデルである DIO マウスに加え、1 型糖尿病モデルとして、膵臓特異的障害薬ストレプトゾトシン (STZ) の投与により、薬剤性 1 型糖尿病モデルである STZ マウス及び新規の 1 型糖尿病モデルマウスとして Ins1-DTA マウスを cre-lox システムによる遺伝的手法を用いて作製した。また同 cre-lox システムにより、新規 2 型遺伝的モデルマウスである Ins1-Irs2ko マウスを作製した。
6. 行動解析：使用、作製したマウスの認知機能を査定するため、水 T 字迷路 (Water T-Maze) テスト、パッシブアボイダンステストを導入し、海馬依存性および海馬-前頭葉関連認知機能について精査した。
7. 脳内インスリン測定法の確立：脳内インスリン値の測定はこれまで確立されていないため、高分子回収プローブを用いたマイクロダイアリスにより、マウスの脳内インスリン値の測定について検討した。
8. 同定血中因子および関連薬投与マウス：DIO マウス血中から同定した血中因子の 1 つである血中因子 A が認知機能へ与える効果を観察するため、若齢マウスの腹腔内および尾静脈から A を投与して作製した。また、血中因子 A の既存拮抗薬の投与が DIO マウスの認知機能へ与える効果を査定するため、DIO マウスの尾静脈あるいはオスモティックポンプを用いてマウスを作製した。

平成 26 年度について

平成 26 年度は、国立長寿医療研究センター内における当研究部の実験スペースがまだ決定されていなかったことから、旧所属でかつ非常勤講師を兼任する宮崎大学医学部で実験を実施した。

1. 脳海馬 IRS2 シグナルの動向：糖尿病を付随する認知機能の低下に伴う脳 IRS2 シグナルの動向を調べるために、DIO マウスの脳から海馬を分離し、海馬のトータルタンパク質を用いた生化学的解析を行った。
2. 海馬神経細胞新生の変化：海馬の細胞増殖能と神経細胞新生の変化を調べるために、BrdU パルスラベル法および神経細胞新生の細胞種類および各分化ステージ特異的発現マーカーを用いた免疫染色法により解析を行った。
3. 神経炎症と神経細胞の形態および活動性の変容：老化様の作用を有することが示唆される糖尿病がこれらの変化に与える影響を調べるために、神経炎症を誘導するミクログリア特異的マーカー (Iba1)、新生神経細胞特異的マーカー (Dcx) それぞれを用いた免疫染色と新生神経細胞の形態変化についての観察から評価を行った。
4. 認知機能における変化：糖尿病が記憶学習能へ与える影響を精査するために、海馬依存

的記憶学習能行動解析である Water T maze (WTM)テストを行い、正解率によって成績を評価した。

平成 27 年度について

27 年度は、国立長寿医療研究センターでの研究環境がまだ完全には整っていなかったため、主任研究者の前所属であり、共同研究機関である宮崎大学医学部で残る実験を行うと共に、国立長寿医療研究センターでの研究環境のセットアップと本実験に至る準備を主にを行った。

1. 研究に使用するマウスの体外受精による搬入と繁殖の開始：本研究に使用するマウスは、DIO マウスをはじめとして、遺伝的変異マウス 6 種類が存在するが、本格的な研究を開始するためには、まず、これらの全系統のマウスをセンターの動物施設へ搬入し、繁殖を開始することが必要とされた。DIO マウスに関しては、4 週齢の野生型マウスに高脂肪食の付加を開始し、半年以上を待って使用を開始した。遺伝的変異マウスについては、個体での搬入が不可能であったため、順次、全系統のオスから精子を分離、凍結し、これらの凍結精子と野生型メスマウスを用いて体外受精を行い、目的マウスのヘテロ接合体を作製した。全系統の凍結精子を用いた体外受精を順次行い、平成 28 年 1 月に完了した。生まれてきたマウスの遺伝型を PCR で確認し、人工授精の成功した個体を選別した。人工授精が成功したヘテロ接合体はさらに野生型マウスと繁殖させ、同遺伝型マウスの繁殖によるコロニーの作成をそれぞれの系統に対して行い、繁殖を開始した。
2. 脳海馬 IRS2 シグナルの動向：昨年度は、宮崎大学で、糖尿病を付随する認知機能の低下に伴う脳 IRS2 シグナルの動向を調べるために、DIO マウスの脳から海馬を分離し、海馬のトータルタンパク質を用いた生化学的解析を行っていたが、本センターの動物施設でも新たに DIO マウスの繁殖を開始したため、本センター繁殖 DIO マウスを用いた同解析を開始した。また、他使用マウス（4. 血中因子 A 投与マウス等）の同解析も行った。
3. タンパク質多項目同時解析および ELISA 法を用いた既存血中因子の探索：DIO マウスと野生型マウスの血清/血漿を用いたタンパク質多項目同時解析および ELISA 法より複数の血中因子を得た。しかしながら、他の候補因子の存在も否定できないため、同方法を用いて、さらに分泌因子のスクリーニングを継続する予定である。
4. 単離候補因子投与マウスの作成：DIO マウスから同定した血中因子の 1 つ血中因子 A が認知機能へ与える影響について検討するため、血中因子を若齢野生型マウス尾静脈内あるいは腹腔内へ投与して、A 投与マウスを作成した。
5. 海馬神経細胞新生の変化：海馬の細胞増殖能と神経細胞新生の変化を調べるために、BrdU パルスラベル法および神経細胞新生の細胞種類および各分化ステージ特異的発現マーカーを用いた免疫染色法により解析を行った。

平成 28 年度について

昨年度、体外受精により搬入した全系統のマウスの繁殖が開始された状況で、国立長寿医療研究センターでは実験ができる十分な環境にまだ無かったため、H28 年度も宮崎大学お

よび国立長寿医療研究センターの両機関で研究を実施した。

1. 研究に使用するマウスの体外受精による搬入と繁殖：昨年度から行ってきた全系統の凍結精子を用いた体外受精は、平成 28 年 1 月に完了し、生まれてきたマウスの遺伝型を PCR で確認し、人工授精の成功した個体を選別した。人工授精が成功したヘテロ接合体はさらに野生型マウスと繁殖させ、同遺伝型マウスの繁殖によるコロニーの作成をそれぞれの系統に対して行い、研究に使用する全系統のセットアップを行った。繁殖を開始し、平成 28 年 7 月から実験に使用可能なマウスの数が徐々に揃ってきたため、本格的に実験を開始することが可能となった。
2. 新たな糖尿病モデルの作製：2 型糖尿病モデルである DIO マウスに加えて、1 型糖尿病モデルマウス二種を作成した。
 - a) STZ マウス：野生型マウスの腹腔内に膵臓ベーター細胞特異的障害薬であるストレプトゾトシン (STZ) を投与して、薬剤性 1 型糖尿病モデルを作成した。
 - b) 遺伝的 1 型糖尿病モデル (Ins-DTA) マウスの作製：最近、当研究部で作製した floxed-stop-DTA (ジフテリアトキシシン A) マウスと新規膵 β 細胞特異的 Ins1-Cre マウスの交配により、インスリン欠乏型の新たな 1 型糖尿病モデル (Ins1-DTA) マウスを作製し、繁殖を開始した。
3. 血中因子 A 拮抗薬 (AADI) 投与マウスの作成：血中因子 A の拮抗薬である AADI が DIO マウスの認知機能へ与える影響について精査するため、尾静脈内投与あるいはオスモティックポンプを用いて DIO へ AADI を投与し、認知機能へ与える影響について検討した。
4. 脳海馬 IRS2 シグナルの動向：昨年度から、本センターの動物施設でも新たに繁殖を開始した DIO マウスに加え、新たに作成した STZ マウスの脳から海馬を分離し、海馬のトータルタンパク質を用いた生化学的解析を行った。また、体外受精後、繁殖を行ってきた次世代型アルツハイマーモデル (APPKI) マウス (理研脳科学総合研究センター・西道グループとの共同研究) の個体も数匹使用できたため、本解析を行った。
5. タンパク質多項目同時解析および ELISA 法を用いた既存血中因子の探索：DIO マウスと野生型マウスの血清/血漿を用いたタンパク質多項目同時解析および ELISA 法より複数の血中因子を得ていたが、同定した因子に対して、新たに本センターで繁殖を開始した DIO マウスの血液を用いた ELISA 解析を開始した。
6. 行動解析：各種マウスの認知機能を査定するため、水 T 字迷路 (Water T-Maze) テスト、パッシブアボイダンステストを行い、海馬依存のおよび海馬-前頭葉関連認知機能について精査した。
7. 脳内インスリン測定法の確立：高分子回収プローブを用いたマイクロダイアリシスにより、DIO マウス、STZ マウスの脳内インスリン値の測定について検討した。
8. 新規遺伝的 2 型糖尿病モデル (Ins-Irs2ko) マウスの作製：
新たな 2 型糖尿病モデルとして、floxed IRS2 マウス (体外受精により導入) と新規膵 β 細胞特異的 Ins1-Cre マウスの交配により、新規遺伝的 2 型糖尿病モデル (Ins-Irs2ko) マ

ウスの作製を行った。現在、遺伝子型の確認を行いながら、繁殖を行っている。

(倫理面への配慮)

年間全体について

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および宮崎大学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および宮崎大学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、センターおよび学内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

年間全体について

1. 同定血中因子が認知機能へ与える影響

(1) 血中因子 A 投与による解析

糖尿病の発症に伴い認知機能障害が進行する生理的 2 型糖尿病のモデル (Diet Induced Obesity: DIO) マウスから同定した複数の血中因子の中で、認知機能の低下を呈する老齢マウスの血中でも同様の変化 (増加) が観察された血中因子 A に特に着目し解析を行った。これまでの結果から、血中因子 A の若齢野生型 (WT) マウスへの連続投与および慢性投与は、若齢 WT マウスの認知機能の低下と脳インスリン様シグナルの亢進を誘起することを明らかにした。

(2) 血中因子 A 拮抗薬 (AAD1) 投与による解析

血中因子 A の既存拮抗薬 (AAD1) が認知機能へ与える影響を検討するため、AAD1 を DIO マウスに連続および慢性投与を行った結果、DIO マウスの認知機能の低下は有意に改善し、脳インスリン様シグナル亢進の抑制も観察された。これまでの研究から、血中因子 A を介した脳インスリン様シグナルネットワークの亢進が認知機能障害と連動し、AAD1 による本シグナルネットワーク亢進の抑制が認知機能の改善に貢献することが示唆された。

2. 糖尿病が認知機能へ与える影響

(1) 2 型糖尿病モデルを用いた解析

a) 生理的 2 型糖尿病モデル (DIO) マウスを用いた解析 :

これまで我々は、DIO マウスで観察される認知機能の低下 (6 ヶ月齢) と連動して、脳インスリン様シグナルが亢進することを明らかにしていた。しかしながら、本センターで繁殖した 6 ヶ月齢の DIO マウスの認知機能は、宮崎大学での同解析と同じく、有意に低下していた。しかしながら、DIO マウスの脳インスリンシグナルの変化については、宮

崎大学で見られた顕著な変化は、観察することができなかった。

b) 新規遺伝的 2 型糖尿病モデル (Ins-Irs2ko) マウスの作製 :

DI0 マウスは遺伝子が無欠損であることは、認知機能の変化に連動する脳インスリン様シグナルを指標として解析を行っている我々にとっての利点でもあるが、一方で、前述(1)の通り、本マウスは、飼育環境の影響を強く受け、症状、変化が一定では無いことが最大の問題であり欠点とも言える。この問題のバックアップおよび解消のため、脳インスリン様シグナルは無欠損の新規遺伝的 2 型糖尿病モデルとして、新規膵 B 細胞 Cre マウスを用いた膵 B 細胞特異的 IRS2 欠損 (Ins-IRS2ko) マウスを新しく作製した。

(2) 1 型糖尿病モデルと認知機能障害

a) 薬剤誘導 1 型糖尿病モデル (STZ) マウスを用いた解析 :

2 型糖尿病だけではなく、低血糖の頻発を含む不良な血糖値制御が起因と示唆される 1 型糖尿病に付随する認知機能低下から認知症への移行にも関心が高まっているため、薬剤(ストレプトゾトシン)投与によりインスリン欠損型の 1 型糖尿病モデル (STZ) マウスを作製し解析を行った。本マウスの海馬を用いた生化学的解析から、脳インスリン様シグナルが 2 型糖尿病モデル同様に亢進していることを突き止めた。

b) 新規遺伝的 1 型糖尿病モデル (Ins-DTA) マウスの作製 :

STZ は膵 β 細胞だけでなく脳にも直接的な損傷を与えることが最近報告され問題視されており、脳の解析結果の解釈が難しくなっている。この問題を解決するため、我々は、最近当研究部で作製した floxed-stop-DTA (ジフテリアトキシン A) マウスと新規膵 β 細胞特異的 Ins1-Cre マウスの交配により、インスリン欠乏型の新たな 1 型糖尿病モデル (Ins1-DTA) マウスを作製した。本マウスが 1 型糖尿病様の高血糖を呈することを確認しており、予備実験結果から、本マウスの脳、海馬インスリン様シグナルは、STZ 同様に顕著に亢進していることが判った。現在繁殖を行っており、数が集まり次第、STZ マウス同様の解析を行い、それぞれの結果を比較検討することにより、精度および信頼性の高い結論を導くことができると考える。

3. 次世代型 AD モデルマウスを用いた解析

6 ヶ月齢で認知機能障害を呈する次世代型アルツハイマーモデル (APPKI) マウス (理研 BSI・西道研との共同研究) の海馬を用いた生化学的解析から、本マウスの脳インスリン様シグナルは、糖尿病モデルマウスと同様に亢進していることが判った。

4. 脳内インスリン測定法の確立

高分子回収プローブを用いたマイクロダイアリシスによるマウスの脳内インスリン値の測定により、2 型糖尿病モデルマウスの脳内インスリン値は、血中同様対照群に比べ高い傾向にあることが示唆された。

平成 26 年度について

研究環境の状況：本研究課題主任研究者は平成 27 年 1 月 1 日付けで国立長寿医療研究センターに着任したが、本年度は、まだ本センター内に研究スペースが無かったため、全実験は、主任研究者の前所属である宮崎大学で行った。

研究結果：

1. 脳海馬 IRS2 シグナルの動向：DIO マウス海馬 RNA を用いた定量的 PCR 法による解析から、同齢野生型 (WT) マウスに比べ、IRS2 の発現は有意に増加し、下流の負の制御因子である PTEN の発現は顕著に低下することが判った。また、同マウス海馬タンパク質を用いたウェスタンブロッティングによる解析からも、IRS2 と下流因子 Akt および Akt のリン酸化は、DIO マウス海馬で顕著に上昇しており、さらに IRS2 の下流シグナルである MAPK および mTOR の各々のリン酸化も DIO マウス海馬で有意に増加していることが判った。
2. 海馬神経細胞新生の変化：DIO マウスの海馬歯状回の BrdU 陽性細胞および細胞増殖マーカー Ki67 あるいは Sox2 陽性細胞数は同齢 WT マウスに比べ、明らかに減少していた。さらに、幼弱神経細胞マーカー Dcx 陽性でかつ BrdU 陽性の新生幼弱神経細胞 (Dcx+/BrdU+) 数、成熟神経細胞マーカー NeuN 発現細胞数は、ともに WT マウスに比べ DIO マウス海馬で顕著に低下しており、一方、グリア細胞マーカー S100B 陽性でかつ BrdU 陽性の新生グリア細胞 (S100B+/BrdU+) 数は DIO マウス海馬で増加傾向にあった。
3. 神経炎症と神経細胞の形態および活動性の変容：WT マウスと DIO マウス海馬におけるミクログリアマーカー Iba1 陽性細胞数に差は見られなかったが、細胞体が肥大した活性化型ミクログリアの数は DIO マウス海馬で突出して増加していた。また、Dcx 陽性幼弱神経細胞の樹状突起の複雑性・パターン形成について精査した結果、DIO マウス海馬における幼弱神経細胞の樹状突起の分岐の複雑性が有意に低下していることが明らかとなった (未発表データ)。
4. 認知機能における変化：5 日間の WTM テストを行った結果、WT マウスの正解率は 2 日目 (正解率 73%) から日ごとに上昇し、4 日目で 100% に達したが、一方で、DIO マウスの 2~4 日の正解率は 38~78% に留まったことから、DIO マウスの記憶学習能は同齢 WT マウスに比べ顕著に低下していることが判った (未発表データ)。

平成 27 年度について

研究環境の状況：本研究課題主任研究者は平成 27 年 1 月 1 日付けで国立長寿医療研究センターに着任したため、長寿医療研究開発費を使用した本研究は開始から 12 ヶ月が経過したところである。しかしながら、平成 27 年 1 月~ 4 月の間は、国立長寿医療研究センター内における当研究部の実験スペースがまだ決定されていなかったため、旧所属であり非常勤講師を兼任する宮崎大学医学部で実験を実施した。平成 27 年 5 月に実験スペースが決定し、

同時期に流動研究員が赴任したため実験室環境のセットアップを開始した（6～8月の間に研究室内の暗室、低温室の工事も行って頂いた）。動物実験に関しては、マウス遺伝子工学の専門家でもある当研究部生理学研究部徳永室長が9月1日付けで着任したため、徳永室長の主導で本研究に使用する全マウス系統の体外受精を平成28年1月に完了させ、繁殖を開始することができた。

研究結果：

1. 血中因子の同定：DIOマウス血中より、複数の血中因子を同定した。
2. 血中因子が認知機能へ与える影響：同定した血中因子の1つである因子Aの若齢マウスへの投与により、若齢マウスの海馬特異的認知機能が低下することをWTMテストにより明らかにした。
3. 脳インスリンシグナルの変化：血中因子Aを投与した若齢マウスの脳海馬を使った生化学的解析から、インスリンシグナルが亢進していることを見出した。
4. 海馬神経新生の変化：血中因子Aを投与した若齢マウスの脳を使った免疫組織学的解析から、海馬の神経新生が低下していることが判った。

平成28年度について

研究環境の状況：昨年度から行ってきた全系統の凍結精子を用いた体外受精は、平成28年1月に完了し、生まれてきたマウスの遺伝型をPCRで確認し、人工授精の成功した個体を選別した。人工授精が成功したヘテロ接合体はさらに野生型マウスと繁殖させ、同遺伝型マウスの繁殖によるコロニーの作成をそれぞれの系統に対して行い、研究に使用する全系統のセットアップを行った。繁殖を開始し、平成28年7月から実験に使用可能なマウスの数が徐々に揃ってきたため、本格的に実験を開始することが可能となった。

研究結果：

1. 生理的2型糖尿病モデル（DIO）マウスを用いた解析：本センターで繁殖した6ヶ月齢のDIOマウスの認知機能は、宮崎大学での同解析と同じく、有意に低下していた。しかしながら、DIOマウスの脳インスリンシグナルの変化については、宮崎大学で見られた顕著な変化は、観察することができなかった。
2. 薬剤性1型糖尿病モデルを用いた解析：薬剤誘導1型糖尿病モデル（STZ）マウスを用いた解析：STZマウスの海馬を用いた生化学的解析から、脳インスリン様シグナルが2型糖尿病モデル同様に亢進していることを突き止めた。
3. 次世代型ADモデルマウスを用いた解析：6ヶ月齢で認知機能障害を呈する次世代型アルツハイマーモデル（APPKI）マウス（理研BSI・西道研との共同研究）の海馬を用いた生化学的解析から、本マウスの脳インスリン様シグナルは、糖尿病モデルマウスと同様に亢進していることが判った。
4. 血中因子A拮抗薬（AAD1）投与による解析：AAD1をDIOマウスに連続および慢性投与を行った後、行動解析を行った結果、DIOマウスの認知機能の低下は有意に改善し、脳インスリン様シグナル亢進の抑制も観察された。これまでの研究から、血中因子Aを介した脳イ

ンスリン様シグナルネットワークの亢進が認知機能障害と連動し、AAD1 による本シグナルネットワーク亢進の抑制が認知機能の改善に貢献することが示唆された

5. 脳内インスリン測定法の確立：高分子回収プローブを用いたマイクロダイアリスによるマウスの脳内インスリン値の測定により、2 型糖尿病モデルマウスの脳内インスリン値は、血中同様対照群に比べ高い傾向にあることが示唆された。

D. 考察と結論

年間全体について

研究環境の状況についての考察と結論

本研究課題主任研究者は、平成 27 年 1 月 1 日付けで国立長寿医療研究センターに着任したため、本長寿医療研究開発費を使用した本研究期間は、実質的には 2 年 3 ヶ月である。平成 27 年 1 月～ 4 月の間は、当センター内に当研究部の研究室スペースがまだ決定されていなかったため、前所属である宮崎大学医学部で実験を実施した。平成 27 年 5 月に研究室のスペースが決定し、6～8 月の間で研究室内の暗室、低温室の工事が行われると同時に研究室の実験環境セットアップを開始した。動物実験に関しては、本研究に使用するマウスシステムを含む全システムの移動が浄化後搬入となったため、全システムの凍結精子を用いた体外受精を順次行い、平成 28 年 1 月に完了した。以後、各々システムの仔マウスの遺伝子型の解析からシステム作製の成功を順次確認後、繁殖を開始し、平成 28 年 7 月から実験に使用可能なマウスの数が徐々に揃ってきたため、本格的に実験を開始した。

研究内容についての考察と結論

1. 血中因子を介した体系的な認知機能調節機構

(1) 血中因子 A 投与による解析：

これまでの結果から、若齢 WT 個体における血中因子 A の上昇は、DIO マウス同様の認知機能の低下と脳インスリン様シグナルの亢進を惹起することが確認された（現在特許申請準備中、論文投稿準備中）。

(2) 血中因子 A 拮抗薬（AAD1）投与による解析：

これまでの結果から、異分野の既存拮抗薬（AAD1）は、新たな認知機能改善薬としてのポテンシャルを有する可能性が考えられる（現在特許申請準備中、論文投稿準備中）。

2. 糖尿病が認知機能へ与える影響

(1) 2 型糖尿病モデルと認知機能障害：

a) 生理的 2 型糖尿病モデル（DIO）マウスを用いた解析

これまで我々は、DIO マウスで観察される認知機能の低下（6 ヶ月齢）と連動して、脳インスリン様シグナルが亢進することを明らかにしていた。しかしながら、本センターで繁殖した同マウスの認知機能および脳インスリンシグナルの顕著な変化が、主任研究者

の前所属で観察されたタイムポイントでは見られなかったため、複数のタイムポイントで観察を行った。結果的に、以前とは異なったタイムポイントでDIOマウスにおける同様の変化が見られたが、以前と比べ個体差が大きく、結果の傾向は同じであっても変化の割合が低い場合があり、依然として表現型が安定では無いため、さらに個体数を上げて実験を行うことを強いられている。本問題の原因は、飼育環境の違いに因るものであるが、その原因の1つと予想されるマウスのケージサイズについて、マウスの一部を小ケージ（一般ケージ）に移動し、環境を変えて維持を行っている。マウスの数が揃い次第、6ヶ月齢を中心に複数のタイムポイントで解析を行い、表現型の安定性について精査する予定である。

b) 新規遺伝的2型糖尿病モデル(Ins-Irs2ko)マウスの作製

DIOマウスは遺伝子が無欠損であることは、認知機能の変化に連動する脳インスリン様シグナルを指標として解析を行っている我々にとっての利点でもあるが、一方で、前述(1)の通り、本マウスは、飼育環境の影響を強く受け、症状、変化が一定では無いことが最大の問題であり欠点とも言える。この問題のバックアップおよび解消のため、脳インスリン様シグナルは無欠損の新規遺伝的2型糖尿病モデルとして、新規膵B細胞Creマウスを用いた膵B細胞特異的IRS2欠損(Ins-IRS2ko)マウスを新しく作製した。今後は、DIOマウスと同時に本マウスの解析を行い、両マウスの結果を比較検討し、これまでの結果を精査する予定である。

(2) 1型糖尿病モデルと認知機能障害:

a) 薬剤誘導1型糖尿病モデル(STZ)マウスを用いた解析

本解析結果から、認知機能の低下と脳インスリン様シグナルの亢進は、糖尿病性認知機能障害に共通に見られる分子機序であることが示唆された。また、2型糖尿病だけでは無く、低血糖の頻発を含む不良な血糖値制御が起因と示唆される1型糖尿病に付随する認知機能低下から認知症への移行にも関心が高まっている。本問題は、高血糖とインスリン抵抗性のどちらが認知機能へ影響を与えるのか？という未解決な最大の疑問と重複するものである。本実験結果は、この疑問の回答にもなるもので、解析結果から、認知機能の低下と脳インスリン様シグナルの亢進は、インスリンアクションとは独立に誘起され、高血糖が認知機能低下に密接に関与することが示唆された。さらに、脳におけるインスリン様シグナルの主要なリガンドはインスリンでは無い可能性が示された。これらの結果は、これまで明らかでは無かった糖尿病と認知症の関連性の一端を脳のインスリン様シグナルをインターフェイスとして解き明かしたこれまでには無い新しい知見である。

b) 新規遺伝的1型糖尿病モデル(Ins-DTA)マウスの作製

STZは膵β細胞だけでなく脳にも直接的な損傷を与えることが最近報告され問題視されており、脳の解析結果の解釈が難しくなっている。この問題を解決するため、我々は、最近当研究部で作製したfloxed-stop-DTA(ジフテリアトキシンA)マウスと新規膵β細胞特異的Ins1-Creマウスの交配により、インスリン欠乏型の新たな1型糖尿病モデル(Ins1-DTA)

マウスを作製した。本マウスが1型糖尿病様の高血糖を呈することを確認しており、予備実験結果から、本マウスの脳、海馬インスリン様シグナルは、STZ同様に顕著に亢進していることが判った。現在繁殖を行っており、数が集まり次第、STZマウス同様の解析を行い、それぞれの結果を比較検討することにより、精度および信頼性の高い結論を導くことができると考える。

3. 次世代型ADモデルマウスを用いた解析

解析結果から、糖尿病の付随しないADの発症にも脳インスリンシグナルの変化が付随することから、脳インスリンシグナルは、糖尿病性認知機能障害だけではなく、認知機能調節を支持する本質的な分子基盤の一端である可能性が考えられる。

4. 脳内インスリン測定法の確立

予定外の研究の進歩として、当研究部では高分子回収プローブを用いたマイクロダイアリシスによるマウスの脳内インスリン値の測定に成功した。元来、正常時の脳内インスリン濃度についての確かな知見は無く、糖尿病時における脳内インスリン値の動向についても未だ明らかでは無かった。今回の測定から、2型糖尿病モデルマウスの脳内インスリン値は、血中同様対照群に比べ高いことが示唆された。前述の通り、1型糖尿病モデルマウスの脳インスリン様シグナルは亢進することから、脳ではインスリン以外の液性因子が脳インスリン様シグナルの主要な活性化リガンドとして作用している可能性があり、因子Aはその候補の1つと考えられる。そのため、本測定方法を用いて、脳内の因子A値の変化についても検討を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成26年度

- 1) Runtuwene L, Noguci K, Tokunaga A, Kobayashi T, Nakai K, Eshita Y.;
Vector competence of *Aedes aegypti* to dengue virus Urban Pest
Management 4(1), 1-14, 2014
- 2) 田口明子：インスリン様シグナルとアルツハイマー病-認知機能調節における
脳インスリン様シグナルの役割-. *医学のあゆみ* 249(6):535-538, 2014
- 3) 田口明子：脳の老化とインスリン様シグナル.
脳 21, Vol. 17No. 2 110-115, 2014

平成 27 年度

- 1) Mamada N, Tanokashira D, Hosaka A, Kametani F, Tamaoka A, Araki W. Amyloid β -protein oligomers upregulate the β -secretase, BACE1, through a post-translational mechanism involving its altered subcellular distribution in neurons. *Mol Brain*. 8(1):73. 2015
- 2) Tada H, Takahashi T. : Estrous Cycle-Dependent Phasic Changes in the Stoichiometry of Hippocampal Synaptic AMPA Receptors in Rats. *PLoS One*, 10: e0131359, 2015
- 3) Tanokashira D, Motoki K, Minegishi S, Hosaka A, Araki W. LRP1 Downregulates the Alzheimer's β -Secretase BACE1 by Modulating Its Intraneuronal Trafficking. *eNeuro*. 2(2):0006-15. 2015.
- 4) Tanokashira D, Araki W. : LRP1 Downregulates the Alzheimer's β -Secretase BACE1 by Modulating Its Intraneuronal Trafficking. *eNeuro*, 2: 0006-15, 2015.
- 5) Kawakami E, Tokunaga A, Ozawa M, Sakamoto R, Yoshida N. ; The histone demethylase Fbxl11 plays an essential role in embryonic development by repressing cell-cycle regulators. *Mechanisms of Development* 135, 31-42, 2015
- 6) Tokunaga A, Anai H, Hanada K. : Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. *Cell Mol Life Sci*, 73: 523-533, 2016

平成 28 年度

- 1) Takahashi M, Tsukamoto Y, Kai T, Tokunaga A, Nakada C, Hijiya N, Uchida T, DaaT, Nomura T, Sato F, Mimata H, Matsuura K, Moriyama M. ; Downregulation of WDR20 due to loss of 14q is involved in the malignant transformation of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 107(4):417-23, 2016.
- 2) Tada H, Tokunaga A, Tanokashira D, Kurata E, Taguchi A. : Role of metabolic signaling in the regulation of cognitive functions. *Biomedical Gerontology*, 40(2) 9-14, 2016.
- 3) Hijiya N, Tsukamoto Y, Nakada C, Tung NL, Kai T, Matsuura K, Shibata K, Inomata M, Uchida T, Tokunaga A, Amada K, Shirao K, Yamada Y, Mori H, Takeuchi I, Seto M, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M. ; Genomic loss of DUSP4 contributes to the progression of intraepithelial neoplasm of pancreas to invasive carcinoma. *Cancer Res*. 76: 2612-2625, 2016.
- 4) Kai T, Tsukamoto Y, Hijiya N, Tokunaga A, Nakada C, Uchida T, Daa T, Iha H, Takahashi M, Nomura T, Sato F, Mimata H, Ikawa M, Seto M, Matsuura K, Moriyama M. ; Kidney-specific knockout of Sav1 in the mouse promotes hyper-proliferation of renal tubular epithelium through suppression of the Hippo pathway. *J Pathol*. 239(1):97-108, 2016.
- 5) Tada H, Miyazaki T, Takemoto K, Takase K, Jitsuki S, Nakajima W, Koide M, Yamamoto

- N, Komiya K, Suyama K, Sano A, Taguchi A, Takahashi T.; Neonatal isolation augments social dominance by altering actin dynamics in the medial prefrontal cortex. *PNAS*, 113(45): E7097-E7105, 2016
- 6) Fujimori K, Tezuka T, Ishiura H, Mitsui J, Doi K, Yoshimura J, Tada H, Matsumoto T, Isoda M, Hashimoto R, Hattori N, Takahashi T, Morishita S, Tsuji S, Akamatsu W, Okano H.; Modeling neurological diseases with induced pluripotent cells reprogrammed from immortalized lymphoblastoid cell lines. *Mol Brain*, 9(1):88. DOI 10.1186/s13041-016-0267-6, 2016.
- 7) Takemoto K, Iwanari H, Tada H, Suyama K, Sano A, Nagai T, Hamakubo T, Takahashi T.; Optical inactivation of synaptic AMPA receptors for artificial memory erasure. *Nat Biotechnol*, 35(1):38-47, 2017
- 8) Tanokashira D, Mamada N, Yamamoto F, Taniguchi K, Tamaoka A, Lakshmana MK, Araki W.; The neurotoxicity of amyloid β -protein oligomers is reversible in a primary neuron model. *Mol Brain*. ; 10(1):4. 1186/s13041-016-0284-5, 2017

2. 学会発表

平成 26 年度

- 1) 福岡屋航、倉田栄子、中里雅光、田口明子：糖尿病は海馬 IRS2 シグナルを介して神経新生・認知機能を低下させる。
第 57 回日本糖尿病学会総会：2014 年 5 月 22-24 日, 大阪市、日本
- 2) Akiko Taguchi, Manabu Makinodan, Wataru Fukuokaya, Eiko Kurata, Gabriel Corfas, and Morris White: Neural IRS2 deficiency prevents age-related cognitive decline. The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.
Sep 11~13, 2014, Yokohama, Japan
- 3) 田口明子、牧ノ段学、Gabriel Corfas, and Morris White: 認知機能調節における脳 IRS2 の機能
第 29 回日本糖尿病合併症学会 2014 年 10 月 3-4 日, 東京、日本
- 4) 田口明子：海馬神経細胞新生と記憶学習能調節における脳 IRS2 の役割
第 29 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2015 年 2 月 13-14 日 京都、日本

平成 27 年度

- 1) 田口明子：脳インスリン様シグナルと認知機能障害
第 88 回日本内分泌学会学術総会, 2015 年 4 月 24 日, 東京(招待講演)
- 2) 田口明子：糖尿病と認知症、特にインスリンの功罪について
第 3 回郡山糖尿病と血管障害研究会, 2015 年 6 月 17 日, 郡山市 (招待講演)
- 3) 田口明子：インスリンシグナルをインターフェイスにした糖尿病、老化、認知症の新たな相関 日本老年医学会

- 第9回老年医学サマーセミナー, 2015年7月30日, 軽井沢(招待講演)
- 4) 田口明子: 認知機能調節における脳インスリン様シグナルの役割
第14回関西・中部認知症研究会, 2016年3月5日, 名古屋(招待講演)
- 5) Akiko Taguchi: Inductive mechanism of cognitive impairment through neural insulin-like Signaling- How does glucose metabolism disorders affect cognitive function?
The 11th International Symposium on Geriatrics and Gerontology,
Feb 6 2016, Obu, Japan (招待講演)
- 6) 田口明子, 牧ノ段学, Gabriel Corfas, Morris White
代謝調節シグナルを介した成体脳海馬神経細胞新生・認知機能調節機構
第11回成体脳のニューロン新生懇談会, 2015年11月14日, 名古屋
- 7) 徳永暁憲、川上絵理、濱田文彦、田口明子、吉田進昭
ヒストン脱メチル化酵素 Fbx111 による神経分化制御機構の解析
第11回成体脳のニューロン新生懇談会, 2015年11月14日, 名古屋
- 8) 山本耕裕、福岡屋航、川邊健士朗、倉田栄子、田口明子
糖尿病は海馬インスリンシグナルを介して成体海馬の神経細胞新生・
認知機能を低下させる
第11回成体脳のニューロン新生懇談会, 2015年11月14日, 名古屋
- 9) 徳永暁憲、福岡屋航、川邊健士朗、倉田栄子、山本耕裕、田口明子
糖尿病における認知機能障害と海馬インスリンシグナルの関連
第30回日本糖尿病合併症学会, 2015年11月28日, 名古屋
- 10) Hirobumi Tada, Akinori Tokunaga, Wataru Fukuokaya, Eiko Kurata, Akiko Taguchi.
Hippocampal insulin-like-signaling induces impairment of cognitive function and adult neurogenesis in diabetic model mice.
第8回 NAGOYA グローバルリトリート, 2016年2月12日, 大府市
- 11) 徳永暁憲、福岡屋航、川邊健士朗、倉田栄子、山本耕裕、田口明子
海馬インスリン様シグナルを介した糖尿病随伴認知機能障害の発症機序の解明
第30回日本糖尿病・肥満動物学会, 2016年3月11日, 大宮
- 平成28年度
- 1) 田口明子: 認知機能障害に伴う中枢神経系特異的インスリンシグナルの変容.
第51回糖尿病学の進歩 2017年2月17-18日、京都市、日本 (招待講演)
- 2) Akiko Taguchi: Altered hippocampal insulin-like signaling correlates with diabetes-related cognitive decline.
Memory Mechanisms in Health and Disease, Zing Conferences,
Dec 5-8, 2016, Tampa, Florida, USA.

- 3) 田之頭大輔、福岡屋航、川邊健士朗、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、倉田栄子、田口明子
アルツハイマー病発症における海馬インスリン様シグナルの関与.
第31回日本糖尿病合併症学会 2016年10月7-8、仙台、日本
- 4) 田之頭大輔、田口明子
糖尿病に伴う認知機能低下と海馬 IRS2 シグナルとの関連.
第35回認知症学会学術集会, 2016年12月1-3、東京、日本
- 5) 田之頭大輔、徳永暁憲、多田敬典、柏田舞波、佐治多美子、田口明子
アルツハイマー病発症における海馬 IRS2 シグナルの関与.
第31回日本糖尿病・肥満動物学会 2017年2月10-11日、横浜市、日本
- 6) 多田敬典、徳永暁憲、田之頭大輔、佐治多美子、柏田舞波、田口明子
糖尿病に伴う認知機能障害における前頭葉・海馬神経ネットワーク制御機構の解析.
第31回日本糖尿病・肥満動物学会 2017年2月10-11日、横浜市、日本
- 7) 徳永暁憲、多田敬典、田之頭大輔、佐治多美子、柏田舞波、田口明子
糖尿病随伴認知機能障害の発症過程における海馬インスリン様シグナルの変容.
第31回日本糖尿病・肥満動物学会 2017年2月10-11日、横浜市、日本
- 8) Hirobumi Tada, Akinori Tokunaga, Daisuke Tanokashira, Mana Kashiwada, Tamiko Saji, Akiko Taguchi
Mechanisms of cognitive impairment induced by altering the insulin-like signaling in the prefrontal cortex of diabetic model mice.
第94回日本生理学会大会 2017年3月28-30日、浜松市、日本

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

平成26年度

1) なし

平成27年度

1) 職務発明認定1件（現在特許申請書準備中）

平成28年度

1) 平成27年度 職務発明認定1件（現在特許申請書準備中）
弁理士より要求の追加実験実施中。終了後、出願予定。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし