

## 〈研究課題〉脳内インスリン抵抗性に着目したアルツハイマー病の新規病態解析

代表研究者	新潟大学脳研究所遺伝子機能解析学分野 教授	池内 健
共同研究者	新潟大学医歯学総合病院	特任助教 春日健作
	新潟大学医歯学総合病院	医員 徳武孝允

### 【まとめ】

「末梢臓器の恒常性の破綻がアルツハイマー病の病態に関与する」という仮説に基づいた研究計画を立案し、以下の知見をえた、1) 高グルコースおよび高インスリン状態において神経細胞はアミロイドβ (Aβ) を過剰産生する、2) Aβ存在下では神経細胞はリン酸化タウを誘導する、3) Aβ依存性タウリン酸化にインスリンシグナル異常が介在する。これらの知見から、脳内インスリン抵抗性がアルツハイマー病の病態に関与することが示唆された。

### 1. 研究の目的

アルツハイマー病の患者脳では、細胞外に分泌された可溶性 Aβが神経細胞内の異常タウ・リン酸化を介して細胞障害をおこすことが知られている。しかしその機序は不明であり、アルツハイマー病の病態解明に向けた重要な課題として認識されている。本研究は、末梢臓器の恒常性の破綻の原因となる糖尿病がアルツハイマー病の病態に及ぼす影響に着目し、アルツハイマー病の神経細胞障害メカニズムを解明することを目的とした。

### 2. 研究方法と経過

アミロイド前駆体タンパク (APP) を安定発現する Neuro2a 細胞 (APPswe) に異なるグルコース濃度およびインスリンを含む培養液を用い培養した。培養液中の Aβの量をウエスタンブロットおよびサンドイッチ ELISA を用いて解析した。

次に、Aβ産生亢進依存性の異常タウリン酸化を再現できる培養細胞アッセイ系構築した。このアッセイ系は、ドナー細胞に APPswe を過剰発現する HEK293 細胞を、レシピエント細胞に内在性タウを発現するラット初代神経培養細胞を共培養する新規システムである。共培養後にレシピエント細胞の細胞ライセイトを回収し、各種リン酸化タウ抗体 (pSer202/Thr205, pThr231, pThr231/Ser235)、非リン酸化タウ抗体 (Tau-1)、総タウ抗体 (Tau-5) を用いて内在性のタウの挙動を検証した。さらに、インスリン刺激後の Akt, GSK3βのリン酸化を特異抗体により免疫プロットで検討し、神経細胞内におけるインスリンシグナル伝達を評価した。

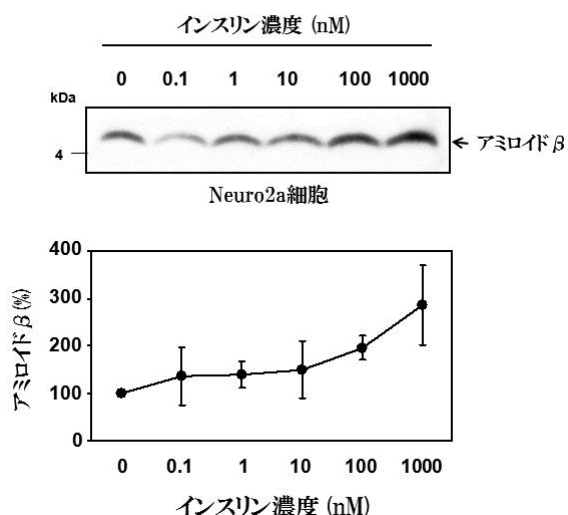
### 3. 研究の成果

#### (1) 高グルコースおよび高インスリン状態が Aβ産生に及ぼす影響

APP を安定発現する N2a 細胞 (APPswe 細胞) の培養液のグルコース濃度を、50, 100, 200, 400 mg/mL と変化させ、培養液中に分泌される Aβを定量した。グルコース濃度が上昇するに従い、培養液中の Aβ量が増加した。

次に、APPswe 細胞に 0 ~ 1,000nM のインスリンを添加し、24 時間後の培養液中の Aβを定量した。培養液中の Aβはインスリンの濃度依存性に増加した(図1)。

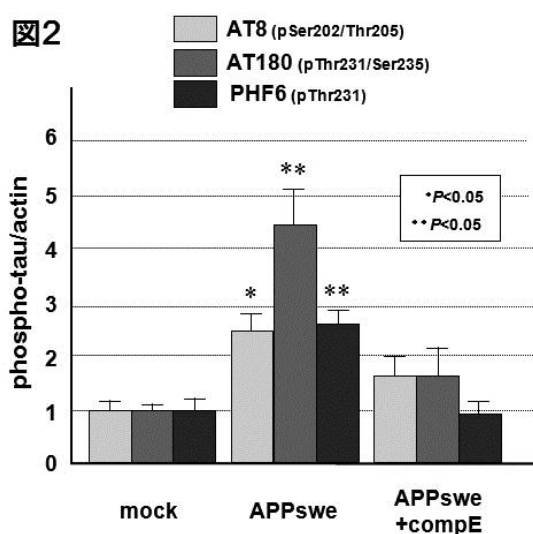
図1



## (2) Aβ依存性タウ・リン酸化の誘導

ドナー細胞に APP<sub>swe</sub> を発現させ細胞外 Aβ を増加させた共培養条件下でレシピエント細胞（ラット初代神経培養細胞）の内在性タウのリン酸化を検討した。3種類のリン酸化タウを認識する抗体を用いた検討では、リン酸化タウは過剰 Aβ 存在下では有意に増加した（図2）。一方、非リン酸化タウ、総タウは過剰 Aβ 存在下でも変化しなかった。Aβ 産生を阻害する γセクレターゼ阻害剤を添加すると、リン酸化タウの誘導は認めなかった。

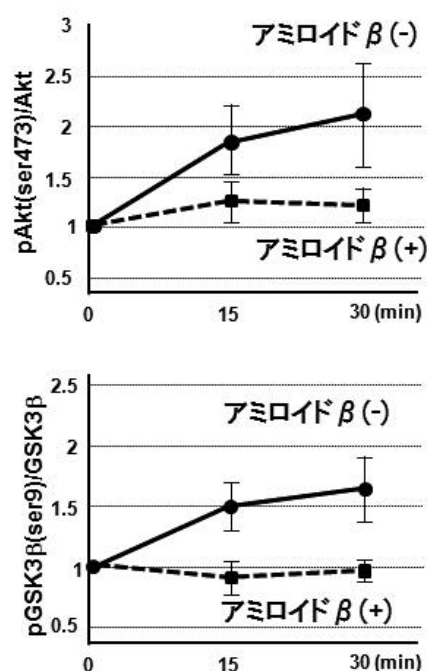
図2



## (3) Aβ依存性タウ・リン酸化におけるインスリンシグナル伝達

異常タウ・リン酸化を誘導する過剰 Aβ を産生するドナー細胞との共培養状態で、インスリンを 1μM を培養液に添加しインスリンシグナル伝達経路にある Akt, Gsk3β のリン酸化を検討した。Aβ を過剰に産生するドナー細胞との共培養においては、対照となるドナー細胞と比較してリン酸化 Akt (pSer473), リン酸化 GSK3β (pSer9) のインスリン依存性の活性化が抑制されていた（図3）。

図3



## 4. 今後の課題

本研究から高グルコース・高インスリン状態により神経細胞の Aβ 産生が亢進する可能性が示唆された。この点は、糖尿病（2型）で生じる高インスリン状態、高グルコース状態が脳内のアミロイド蓄積を誘発している可能性があると思われる。また、一旦 Aβ の過剰産生が生じると神経細胞内でインスリン抵抗性が惹起され、GSK3β の抑制不全によるリン酸化タウの亢進が生じることが示唆された。この点からは、神経細胞におけるインスリンシグナル伝達の改善が、リン酸化タウの抑制につながる可能性がある。例えば、インスリ

ン受容体の発現を誘導する，あるいはインスリン抵抗性を改善させる薬剤は，タウのリン酸化抑制に効果を示す可能性がある．これらの点を探索していくことで，アルツハイマー病の新たな治療標的が今後見出されることが期待される．

#### 5. 研究成果の公表方法

本研究内容は，第 55 回日本神経学会において報告予定である．また追加実験を行い英文原著論文として公表することを目指します．