

博士論文

代謝ストレスおよびインスリンシグナル障害がアルツハイマー病
モデルマウス脳における A β 蓄積に及ぼす影響の解析

松井 健太郎

論文題目

代謝ストレスおよびインスリンシグナル障害がアルツハイマー病
モデルマウス脳における A β 蓄積に及ぼす影響の解析

所属

東京大学大学院 医学系研究科 脳神経医学専攻

神経病理学分野

指導教員

岩坪 威 教授

申請者

松井 健太郎

目次

| | |
|-----------------------------------|----|
| 略語一覧..... | 5 |
| 要旨..... | 8 |
| 第 1 章 序文..... | 9 |
| 1-1 アルツハイマー病の特徴及び病理 | |
| 1-2 アミロイド仮説 | |
| 1-3 A β の蓄積を規定する因子 | |
| 1-4 アルツハイマー病のモデル動物 | |
| 1-5 糖尿病 | |
| 1-6 インスリンシグナルの作用機序 | |
| 1-7 インスリン抵抗性とその作用機序 | |
| 1-8 2 型糖尿病と AD の疫学的相関 | |
| 1-9 2 型糖尿病と AD を繋ぐメカニズム | |
| 1-10 本研究の目的 | |
| 第 2 章 方法..... | 27 |
| 2-1 代謝負荷による AD 病態への影響検討用モデルマウスの作出 | |
| 2-1-1 AD モデルマウス | |
| 2-1-2 糖尿病モデルマウス | |
| 2-2 マウスの解析方法 | |

2-3 代謝性指標の解析方法

2-3-1 インスリン抵抗性試験 (Insulin tolerance test: ITT)

2-3-2 ELISA 法による血漿インスリンの測定

2-4 マウス脳タンパク質の生化学的解析

2-4-1 脳タンパク質の段階抽出

2-4-2 A β ELISA

2-4-3 使用抗体

2-4-4 ウェスタンブロット解析

2-5 マウス脳 mRNA 発現量の生化学的解析

2-5-1 組織からの total RNA 抽出

2-5-2 定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) 法による定量的解析

2-6 ELISA による酸化ストレスの測定

2-7 インスリンシグナルを遺伝的に阻害した AD モデルマウスの作出

2-8 IRS-2 欠損マウスの生化学的検討

2-9 免疫組織化学的検討

2-9-1 パラフィン切片の作製

2-9-2 免疫組織化学染色

2-9-3 A β 斑蓄積の評価

2-10 小胞体ストレス応答性の評価方法

2-11 統計解析

第 3 章 結果.....43

3-1 糖尿病合併 AD モデルマウスの作出

3-2 HFD 負荷による末梢及び中枢のインスリン応答性への影響

3-3 HFD 負荷が脳内 A β 量ならびにアミロイド斑蓄積に及ぼす影響

3-4 IRS-2 欠損 AD モデルマウスの作出、及び代謝性指標の評価

3-5 IRS-2 欠損が脳内 A β 量ならびにアミロイド斑蓄積に及ぼす影響

3-6 IRS-2 欠損 AD モデルマウスに対する代謝負荷が AD 病理に及ぼす影響

3-7 IRS-2 欠損 A7 マウスに対する代謝負荷が末梢のストレス反応に及ぼす影響

3-8 HFD 負荷によるシグナル分子の活性変化

3-9 HFD 負荷による小胞体ストレス応答性の評価

第 4 章 考察.....59

4-1 インスリンシグナル障害が A β に及ぼす影響について

4-1-1 HFD 負荷が末梢及び中枢のインスリンシグナルに与える影響について

4-1-2 HFD 負荷が A β 量に与える効果とその要因

4-1-3 IRS-2 の遺伝的障害がインスリンシグナルに与える影響について

4-1-4 IRS-2 欠損が A β 量に与える効果とその要因

4-1-5 HFD 負荷または IRS-2 欠損が認知機能に及ぼす影響について

4-1-6 *Irs2*^{-/-};A7 マウスに対する代謝負荷の効果について

4-2 ストレス反応亢進が糖尿病病態と AD 病理に及ぼす影響について

4-2-1 代謝負荷及び IRS-2 欠損が末梢のストレス反応に及ぼす影響について

4-2-2 代謝負荷が中枢の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルの分子レベルに与える影響

4-3 代謝負荷が炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルの応答性に及ぼす影響

4-4 小胞体ストレス反応の抑制が AD 病理を改善させる可能性について

4-5 結語

引用文献.....81

図表

謝辞

略語一覧

以下、本文の記載順に略語の正式名称を記す。

IRS: insulin receptor substrate

CTF: C terminal fragment

ADAM: a disintegrin and metalloproteinase

CSF: cerebrospinal fluid

BBB: blood brain barrier

KLK7: kallikrein-7

IGF: insulin-like growth factors

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

GSK: glycogen synthase kinase

FoxO: forkhead box O

NF- κ B: nuclear factor-kappa B

TNF α : tumor necrosis factor α

IL-6: interleukin-6

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

Keap1: kelch-like ECH-associated protein 1

Nrf2: nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

SAPK/JNK: stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase

LPS: lipopolysaccharide

IKK: I κ B kinase

I κ B α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha

MAP2: microtubule-associated protein 2

AMPK: AMP-activated protein kinase

IRE1: inositol requiring 1

PERK: PKR-like endoplasmic reticulum kinase

XBP1: X-box binding protein 1

TRAF: TNF receptor associated factor

eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2 α

ATF: activating transcription factor

CRE: cAMP responsive element

PBS: phosphate buffered salts

TBS: Tris-buffered saline

RIPA: radio-immunoprecipitation assay

SDS: sodium dodecyl sulfate

DMSO: dimethyl sulfoxide

ELISA: enzyme-linked immune sorbent assay

PVDF: polyvinylidene difluoride

PCR: polymerase chain reaction

PYCARD=ASC: apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

NLRP3: NACHT, LRR and PYD domeins-containing protein 3

CHOP: C/EBP homologous protein

BiP: immunoglobulin heavy chain-binding protein

PFA: paraformaldehyde

HRP: horseradish peroxidase

AUC: area under the curve

TACE: TNF α convertase

要旨

2 型糖尿病とアルツハイマー病 (AD) の関係について、実験的・臨床的検討が行われてきたが、脳内のインスリンシグナルの変化とアミロイド β (A β) の蓄積メカニズムとの関係は不明である。そこで本研究では、高脂肪食 (HFD) 負荷マウス、またはインスリン受容体基質 2 型 (IRS-2) 遺伝子欠損マウスという、インスリン抵抗性を示す 2 種類の糖尿病モデルマウスを AD モデルマウスと交配し、その病態を比較検討した。HFD 負荷 AD モデルマウス脳における A β 蓄積には、インスリンシグナルの低下ではなく、その上流で生じている代謝ストレスが関与する可能性が示された。更に、AD モデルマウス脳では、HFD 負荷により小胞体ストレス応答性の低下が生じている可能性が示唆された。

第1章 序文

本研究において私は、近年複数の大規模疫学的研究により示唆されている、2型糖尿病がアルツハイマー病のリスクを高めるという2つの疾患の関係に病因メカニズムの観点から着目し、実験的手法を用いてその原因を解明することを目標に検討を行った。

初めに、アルツハイマー病について概説を行う。

1-1 アルツハイマー病の特徴及び病理

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は、高齢者に生じる認知症として最も頻度が高く、不可逆的に進行する神経変性疾患である。ADの主な臨床症状として、記憶障害・見当識障害・判断力の低下などが挙げられ、病理学的特徴としては、脳の萎縮・老人斑の蓄積・神経原線維変化の出現が挙げられる。

脳の萎縮は神経細胞の死滅に伴い、大脳の広範囲にわたって起こる。神経原線維変化は、微小管結合タンパク質の一つであるタウタンパクが高度にリン酸化され、神経細胞内に蓄積した線維状の凝集体を指す。神経原線維変化は老人斑蓄積後に生じるが、タウのリン酸化が神経原線維変化形成の原因なのか、それとも結果なのかは明らかとなっていない。

老人斑は、アミロイドβペプチド (Aβ) が脳間質に凝集・蓄積して形成されたものである。Aβは分子量約4kDaのタンパク質で38-43個のアミノ酸からなり、1回膜貫通型のアミロイド

前駆体タンパク質 (Amyloid- β precursor protein: APP) が、 β -、 γ -secretase と呼ばれる2種類のプロテアーゼにより段階的に切断を受けることにより産生される。APP は非 A β 産生経路と A β 産生経路の2種類の経路により代謝を受けることが知られている (De Strooper *et al.*, 2010) (Fig. 1)。

非 A β 産生経路では、APP が A β 配列の16番目で α -secretase による細胞外切断を受け、細胞外領域 sAPP α が分泌される。次いで膜貫通部位を含むカルボキシ末端 (C 末) 側断片 (CTF α) が膜内配列切断アスパラギン酸プロテアーゼである γ -secretase による切断を受け、p3 と呼ばれる約 3 kDa の短いペプチド断片が細胞外に分泌される。神経細胞における主たる α -secretase として、ADAM9、10、17 の3種類の膜貫通型メタロプロテアーゼが機能することが *in vivo* で確認されている (Buxbaum *et al.*, 1998; Koike *et al.*, 1999; Lammich *et al.*, 1999)。この非 A β 産生経路は、AD 発症に対して防御的な経路と考えられている。

一方 A β 産生経路では、APP が1回膜貫通型アスパラギン酸プロテアーゼである BACE1 と呼ばれる β -secretase によって細胞外切断を受け、細胞外領域に sAPP β が分泌される。その後連続して、C 末側断片 (CTF β) が γ -secretase により膜貫通領域内の細胞質側から段階的に切断され、A β が産生される。A β の主な分子種としては、第40番目のアミノ酸である Val で終わる A β 40 と、第42番目のアミノ酸である Ala で終わる A β 42 が知られている (Suzuki *et al.*, 1994)。通常、神経細胞からは A β 40 が A β 42 に比べて10倍近く産生される (Asami-Odaka *et al.*, 1995) が、A β 42 の方が *in vitro* で凝集性が高く (Jarrett *et al.*, 1993)、AD 患者脳においても初期から優位に蓄積することが知られている (Iwatsubo *et al.*,

1994)。

1-2 アミロイド仮説

上述のように、AD では早期病変として老人斑の蓄積が始まり、その数十年後に神経原線維変化、神経細胞の脱落が順に生じる (Hardy and Selkoe, 2002)。老人斑に蓄積する A β は不溶性の線維状の重合体、即ちアミロイド線維の構造をとっている。

AD の大部分は孤発性に発症するが、一部に常染色体優性遺伝形式をとる家族性 AD (familial AD: FAD) の発症が認められ、その原因遺伝子として APP をコードする APP 遺伝子、presenilin-1 (PS1) をコードする *PSEN1* 遺伝子、presenilin-2 (PS2) をコードする *PSEN2* 遺伝子が同定されている。これらの FAD の原因となる遺伝子変異は、A β の産生量または凝集性を高める性質を示すことが明らかとなっている。

APP 遺伝子の点突然変異は A β 配列近傍に集中して存在する。 γ -secretase による切断を変化させ、A β 42 の産生比率を上昇させる Austrian 変異 (T714I) や Florida 変異 (I716V) (Kumar-Singh *et al.*, 2000; Eckman *et al.*, 1997)、APP の BACE1 による切断を高め総 A β 産生量を上昇させる Swedish 変異 (K670N/M671L) などが知られている (Mullan *et al.*, 1992)。また、A β 配列内にも Tottori 変異 (D678N) や Italian 変異 (A673V)、Arctic 変異 (E693G) など複数の FAD 変異が存在し、多くの場合 A β の凝集性に影響を与えると考えられている (Hori *et al.*, 2007; Di Fede *et al.*, 2009; Nilsberth *et al.*, 2001)。更に、認知機能低

下に対して防御的に作用する protective 変異として、A β 産生を低下させる Icelandic 変異 (A673T) が同定された (Jonsson *et al.*, 2012)。この変異は β -secretase による切断効率を低下させることが示されており、A β 産生量の変化がアルツハイマー病の発症リスクを規定する可能性を示唆している。一方、大多数の FAD は *PSEN1* 遺伝子または *PSEN2* 遺伝子上の点突然変異に連鎖している (Levy-Lahad *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995)。PS1 及び PS2 は A β の C 末端側を切断する γ -secretase 複合体の活性サブユニットであり、これまでに報告されている PS 上の変異はいずれも通常の γ -secretase と比較して A β 42 の産生比率を特異的に増加させることが共通している (Borchelt *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1998)。

このように、FAD 変異の多くが A β 産生量増加または凝集性促進の効果を持っている。このような遺伝学的な論拠から、AD の原因は A β であるというアミロイド・カスケード仮説 (アミロイド仮説) が提唱された (Hardy and Higgins, 1992; Selkoe, 2001) (Fig. 2)。ただし、老人斑の出現部位は神経細胞脱落の生じる部位と必ずしも一致せず、臨床的な認知症の程度と老人斑の出現頻度との相関が弱いことも報告されていることから (Arriagada *et al.*, 1992)、老人斑形成は必ずしも AD における神経細胞死と直接的な因果関係があるとは限らないと考えられている。

また、初代培養神経細胞に対して凝集した A β は毒性を示すことが知られている (Yankner *et al.*, 1990)。更に近年、A β 凝集過程の中間体である可溶性 A β オリゴマーが毒性を有するとするオリゴマー仮説が提唱された。A β オリゴマーを初代培養細胞に投与すると樹状突起スパイン形成の異常が見られ (Shankar *et al.*, 2007)、ラットへの脳室内投与によ

り学習行動が低下するなど (Cleary *et al.*, 2005)、複数の知見がこの仮説を支持している。

1-3 A β の蓄積を規定する因子

細胞外腔に存在する A β の量は、A β の産生、分解、凝集のバランスによって決定される。このいずれかに異常が生じると、A β 濃度が上昇し、平衡が凝集・蓄積に傾く結果アミロイド蓄積が起こると考えられる。

1-2 で述べたとおり、FAD においては主に凝集性の高い A β 分子種の産生が亢進されることが引き金となっていることが明らかとなっており、アミロイド仮説の支持につながっている。一方で、遺伝子変異を伴わない孤発性 AD の患者に関しては、A β 代謝のいずれの過程が変化しているのかについて、いくつかの可能性が示されている。一つには、脳において BACE1 の発現量及び活性量の上昇 (Li *et al.*, 2004)、脳脊髄液 (CSF) 中の BACE1 活性の増加と AD 病態の程度との間に相関関係が見られるという報告がある (Mulder *et al.*, 2010)。これらの結果は、AD 患者の大多数を占める孤発性の症例においても A β の産生亢進が生じている可能性を示唆する。また、脳内の可溶性 A β は生理的条件下において、複数の A β 分解酵素または血液脳関門 (BBB) を介した排出輸送によってクリアランスを受けることが示唆されている。A β 分解酵素に関しては、neprilysin (NEP) や insulin-degrading enzyme (IDE)、エンドセリン変換酵素、KLK7 などが同定されている。NEP や IDE に関しては、AD 患者脳において mRNA 量の低下が示されているほか (Pérez *et al.*, 2000)、APP Tg

マウスに過剰発現させることによりアミロイド斑蓄積が抑制されることが報告されている (Leissring *et al.*, 2003)。また、AD 患者脳における KLK7 の mRNA 量は低下することに加え、AD モデルマウスにおける KLK7 の欠損が A β 蓄積を増加させることが示されている (Kidana *et al.*, 2018)。一方、A β はグリア細胞による貪食作用を受けることが知られており、ミクログリア上に発現している scavenger receptor が A β 線維の貪食に寄与していることが示されているほか (Paresce *et al.*, 1996)、アストロサイトが *in vitro* において凝集した A β を結合し分解することが報告されている (Wyss-Coray *et al.*, 2003)。更に、代謝標識法を用いた検討により、AD 患者では A β 産生率が変化しない一方で A β クリアランスが低下することが報告されている (Mawuenyega *et al.*, 2010)。以上のことから、A β 分解能の低下も AD 発症に寄与している可能性が示唆されている。

1-4 アルツハイマー病のモデル動物

上記の結果を受け、FAD の遺伝子変異を持つヒトの APP や presenilin-1 の遺伝子を脳内の神経細胞特異的に過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg マウス) が作出された。APP Tg マウスでは、Swedish 変異型 APP を発現する Tg2576 マウスや、Indiana 変異 (V717F) 型 APP を発現する PDAPP マウスなどが広く知られている (Games *et al.*, 1995; Hsiao *et al.*, 1996)。これらのマウスでは、大脳皮質に老人斑様のアミロイド斑が生じ、記憶・学習障害が認められた (Chen *et al.*, 2000)。その他、Swedish 変異型 APP と FAD 変異

(A246E) 型 PS1 を発現した Tg マウスである APP/PS1 マウスでは、アミロイド斑の増加や記憶・学習能力の低下が認められる (Borchelt *et al.*, 1997)。また、FAD 変異を有する APP と PS1、タウを三重発現させた 3x Tg -AD マウスでは、アミロイド斑に加えタウ蓄積が観察されている (Oddo *et al.*, 2003)。これらの Tg マウスは、現在 AD 病態を再現するモデルとして広く用いられており、その表現型は AD 発症に A β 42 の増加が重要であることをいずれも示唆している。

本研究においては、当研究室で作出された APP Tg マウスである A7 マウスを用いて検討を行った (Yamada *et al.*, 2009)。A7 マウスは、Thy1.2 プロモーターの下流で Swedish、Austrian の二重変異を持つ APP を神経細胞特異的に過剰発現するマウスであり、A β 42 と A β 40 が同程度の比率で産生されるという特徴をもつ。他の APP Tg マウスと比べてもこの A β 42 産生比率は非常に高く、FAD における A β 42 の影響を充分評価できると考えられる。更に APP の過剰発現レベルは内因性の 1.4 倍程度であり、PS1 などの膜タンパク質も過剰に発現しないため、タンパク質の過剰発現による人工的变化を最低限にとどめることが可能である。なお、A7 マウスでは 12 か月齢前後より大脳皮質や海馬にアミロイド斑が蓄積する。

続けて、本研究においてアルツハイマー病との関係を探求する対象となる、糖尿病ならびにインスリンシグナルと各種ストレスシグナル (酸化ストレス、炎症性ストレス及び小胞体ストレス) について概説を行う。

1-5 糖尿病

糖尿病とは、血液中のグルコース濃度（血糖値）の調節を行うインスリンの作用が低下することにより高血糖状態が続く代謝性疾患である。随時または空腹時の血糖値、ヘモグロビン A1c (HbA1c;グリコヘモグロビン) の割合が基準値以上である場合、糖尿病と診断される。2016 年の国民健康・栄養調査により、国内の糖尿病有病者は 1000 万人超と推定されている。糖尿病が進行し高血糖状態が持続することにより全身の様々な臓器が障害を受けるが、特に神経障害、眼球の網膜出血（網膜症）、腎機能の低下（腎症）は三大合併症と呼ばれている。

糖尿病には 1 型と 2 型の 2 つの病型が存在する。1 型糖尿病は、インスリン分泌を担う膵臓の β 細胞が破壊され、インスリン分泌が極度に低下することで発症する。自己免疫性の病因が主体であり、突発的に幼児や若年で発症することが多い。一方、2 型糖尿病は生活習慣病の 1 種とされ、肝臓・筋肉・脂肪細胞などでインスリン感受性が低下するインスリン抵抗性が慢性的に生じ、 β 細胞による代償性のインスリン分泌が減弱する結果、発症する。発症の要因は、遺伝的素因・運動不足・食事等の環境などにより大きく規定される。その他、他の病気や特定の薬の影響で起こる糖尿病、妊娠をきっかけに起こる糖尿病(妊娠糖尿病)が存在する。本研究では、これらのうち AD との関連が示唆されている 2 型糖尿病に着目した。

1-6 インスリンシグナルの作用機序

インスリンは膵 β 細胞から産生される血糖降下作用のあるホルモンであり、生体内において肝臓・骨格筋・脂肪組織等の様々な臓器に働き、グルコース輸送や遺伝子発現、細胞形態変化などの様々な影響を細胞に及ぼす。インスリンのシグナル伝達は、インスリン受容体 (IR) または IGF1 受容体 (IGF1R) のチロシンキナーゼ基質の活性化によって始まる。これらの受容体の酵素活性によって、インスリン受容体基質 (IRS) のチロシンキナーゼドメイン及び Shc (src homology and collagen) ペプチドドメインなどの基質タンパク質のリン酸化が促される。IRS には 4 種類のアイソフォームが知られているが、糖尿病との関係においては IRS-1 と IRS-2 が特に重要である。IRS-1 は広範な組織に発現しており、主に骨格筋におけるグルコース取り込みを担っている。IRS-2 は肝臓、膵 β 細胞、血管内皮細胞に多く発現しており、肝臓におけるグリコーゲン合成や膵 β 細胞の増殖に関与している。

IRS の下流では、Sh2 (src homology 2) 部位を有するいくつかのタンパク質が結合し、主に代謝作用に関与する PI3K 経路と、細胞増殖作用に関与する MAPK 経路が活性化される (Fig. 3)。PI3K 経路では、PI3K が活性化されることでセリン・スレオニンキナーゼである Akt がリン酸化され、更に下流では GSK3 β を筆頭に多様な分子がリン酸化を受ける。この経路のシグナル伝達により、細胞膜での糖輸送を担うグルコーストランスポーター (GLUT4) は細胞内から細胞表面膜へ移行し、グルコースを細胞内に取り込むことで血糖値の上昇を抑制する。また、FoxO1 を介した肝臓における糖新生抑制や生存シグナルの伝達、NF- κ B を介した抗酸化作用などにも作用する (van der Heide *et al.*, 2006)。AD 病態との関連として

は、GSK3 β の活性化によりタウがリン酸化されることが知られている (Ishiguro *et al.*, 1993)。

また、インスリンは脳においても機能を有することが知られている。脳で機能するインスリンは主に末梢血中から血液脳関門のインスリン受容体によるトランスサイトーシスを通して脳に取り込まれると考えられている (Baura *et al.*, 1993)。しかし、脳においてインスリンの mRNA 発現が認められるとの報告も複数あり (Young, 1986; Devaskar *et al.*, 1994)、脳由来のインスリンが存在する可能性も残されている。インスリン受容体は脳に広く発現しており、中でもその機能は代謝を司る中枢である視床下部において重要な役割を担っている。脳におけるインスリンの代謝調節機能としては、視床下部弓状核に存在する摂食行動を促進するニューロペプチド Y (NPY) およびアグーチ関連ペプチド (AgRP) を産生する神経細胞と、摂食抑制に働くプロオピオメラノコルチン (POMC) 神経細胞に作用することで、摂食抑制効果を示すことが明らかとなっている (Baskin *et al.*, 1999)。その他、肝臓における糖新生抑制や脂肪細胞の合成促進・分解抑制といった末梢の代謝制御 (Könner *et al.*, 2007; Scherer *et al.*, 2011)、神経細胞の分化や増殖作用 (Robinson *et al.*, 1994)、シナプス可塑性 (Wan *et al.*, 1997) といった複数の機能に関与している。

1-7 インスリン抵抗性とその作用機序

インスリン抵抗性は糖代謝におけるインスリンの作用不全を示す病態であり、2型糖尿病の

発症機序に大きく関与している。インスリン応答性の臓器である骨格筋や肝臓がインスリン抵抗性を獲得すると、各々糖取り込み能の低下及び糖新生の抑制作用の低下が起こり、血糖値の上昇を招く。このため代償性にインスリン分泌が増大し、この状態が続くと膵臓のインスリン分泌機能が低下し、血糖値が上昇するために2型糖尿病を引き起こす。

2型糖尿病の根本的要因の1つである肥満は脂肪組織量が増加した状態と定義され、肥満者では脂肪組織の肥大が認められる。この肥大化した脂肪組織にはマクロファージの浸潤が増加することが報告されており (Xu *et al.*, 2003; Weisberg *et al.*, 2003)、インスリン抵抗性を惹起するTNF α 、IL-6等の炎症性サイトカインや遊離脂肪酸 (free fatty acid: FFA)、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 産生酵素であるNADPH オキシダーゼ及び視床下部の摂食中枢に作用し食欲を抑制するレプチンの分泌・発現増加や、インスリン感受性亢進作用を有するアディポネクチン、及び抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) の分泌・発現低下が認められる (Hotamisligil *et al.*, 1995; Roytblat *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 2004)。これにより、ROS産生が促進し、酸化ストレスが亢進する。この時生体内では恒常性維持のため、Keap1-Nrf2 制御系と呼ばれる防御機構が機能する。

Nrf2 は塩基性ロイシンジッパー構造を持つ転写調節因子であり、非ストレス状態時は細胞質でアクチン結合因子である Keap1 と相互作用することにより転写活性が抑制されている。この時 Keap1 は自身を介してユビキチン連結酵素である Culin3 と Nrf2 を結びつけ、その結果 Nrf2 はユビキチン化されたのちプロテアソームにより分解されている。細胞が ROS によ

て刺激を受けるとこの分解機能が弱まり、Nrf2 が核内に移行・蓄積して活性化する (Kobayashi *et al.*, 2004)。

一方、TNF α を初めとする炎症性サイトカインの増加は、受容体の下流でNF- κ Bシグナル経路及びJNKシグナル経路を活性化する。NF- κ BはRelファミリーに属するタンパク質のヘテロあるいはホモ2量体であり、刺激によって細胞質から核に移行することで活性化される。細胞がTNF α 、IL-1 β 、LPSなどによって刺激されるとIKK複合体が活性化され、I κ B α などの阻害タンパク質をリン酸化する。その結果、I κ B α がユビキチン依存的に分解されることで、NF- κ Bの核移行シグナルが表在化し、核に移行して転写の活性化が起こる。一方JNKシグナルは、細胞外からのストレス刺激や内因性シグナルを細胞核に伝達する機能を持つ。活性化されたJNKは、c-Junやp53などの転写因子やMAP2などの標的因子のリン酸化を介して、遺伝子発現調節・細胞増殖促進・細胞死の誘導等の細胞応答を制御している (Davis, 2000)。インスリン抵抗性の獲得過程においては、セリン・スレオニンキナーゼがIRSのセリン残基をリン酸化する結果、インスリン受容体からのチロシンリン酸化に阻害的に働く (Solomon *et al.*, 1997)。また、TNF α 自体にもグルコーストランスポーターであるGLUT4の発現を抑制する作用があることが知られている (Stephens *et al.*, 1997)。アディポネクチンは逆に、骨格筋と肝臓においてAMPKを活性化させることで、糖取り込みの促進や脂肪酸の燃焼を引き起こし、インスリン抵抗性を改善する (Yamauchi *et al.*, 2002)。

また、持続的な代謝負荷による肥満状態では、肝臓を代表とする末梢臓器において小胞体ストレスが引き起こされる (Ozcan *et al.*, 2004) (Fig. 4)。小胞体ストレスは、タンパク質の

修飾を阻害する細胞内外からの刺激により異常な構造をとるタンパク質が小胞体内に蓄積する状態である。小胞体ストレスに対する防御機構として、UPR (unfolded protein response) と呼ばれる小胞体ストレス応答が知られている。小胞体膜状の IRE1 及び PERK は小胞体ストレスが負荷された際、IRE1 はホモダイマーを、PERK はオリゴマーを形成して活性化する。その後、IRE1 は C 末側の RNaseL ドメインによって転写因子 XBP-1 の pre-mRNA を切断して活性化し、下流の分子シャペロンの転写を促進する。また、IRE1 の C 末側には TRAF2 がリクルートされ、JNK 経路を活性化する。一方、PERK は eIF2 α をリン酸化することによりタンパク質翻訳を抑制する。この PERK-eIF2 α 経路の活性化は、転写因子 ATF4 の翻訳を促進し、この ATF4 が CRE に結合し分子シャペロンの転写を誘導する。その他、小胞体ストレス負荷時には膜結合型転写因子である ATF6 が活性化され、小胞体分子シャペロン等の UPR 標的遺伝子が転写誘導される。肥満に伴う小胞体ストレス応答の結果、JNK の活性化が起こり、IRS のセリンリン酸化を介してインスリン抵抗性を誘発することも示されている (Otoda *et al.*, 2013)。

慢性的な代謝負荷による肥満においては、脳、特に代謝を司る視床下部においても小胞体ストレスシグナルが亢進することが知られている (Ozcan *et al.*, 2009)。また、炎症性シグナル分子である IKK β を視床下部の AgRP ニューロンあるいは POMC ニューロン特異的に欠損したマウスを用いた研究により、マウス視床下部における NF- κ B 経路の活性化は、PERK-eIF2 α 経路の亢進と同時にインスリン抵抗性を引き起こすことが示されている (Zhang *et al.*, 2008)。これらの報告から、末梢だけでなく中枢で生じる炎症反応ならびに小胞体スト

レス反応も、インスリン抵抗性と関連性が深いことが示唆されている。

このように、炎症性反応や小胞体ストレス反応は肥満時に亢進することから、これらの反応を抑制することが糖尿病の改善につながると考えられてきた。しかし近年、*in vitro* 及び *in vivo* の検討により、IKK β 及び XBP1s の肝臓における活性がグルコース恒常性の改善につながることを報告された (Liu *et al.*, 2016)。この報告は、糖尿病の増悪には肝臓における炎症反応または小胞体ストレス反応の応答性低下が関与している可能性を新たに示唆するものだが、他のシグナル分子に関しても同様の変化が見られるのか、また脳内においてこれらのシグナル応答性に変化が生じているかどうかは未だ解明されていない。

序論の最後に、アルツハイマー病と 2 型糖尿病との関係及び本研究の目的について次節で概説したい。

1-8 2 型糖尿病と AD の疫学的相関

近年、複数の大規模な疫学的調査により、2 型糖尿病が AD 発症リスクを有意に上昇させることが報告されている (Table. 1)。2 型糖尿病患者を約 2 年追跡した大規模な疫学調査 (Rotterdam study) によって、2 型糖尿病患者では AD 発症リスクが 1.9 倍上昇することが示された。また、糖尿病病態がより重症であるがゆえにインスリン製剤を用いている患者では、AD 発症リスクは 4.3 倍まで上昇しており、2 型糖尿病の病態に相関して AD 発症リスクの上

昇する可能性が示唆されている (Ott *et al.*, 1999)。更に、本邦久山町で行われた疫学調査により、糖尿病及び耐糖能異常保有者では AD 発症のリスクが 2 倍に上昇し、耐糖能異常者においては、AD 病理の特徴である老人斑の蓄積リスクが 3-6 倍上昇することが明らかとなった (Matsuzaki *et al.*, 2010; Ohara *et al.*, 2011)。一方、ヒト糖尿病患者は認知機能の低下を招来することも示されており、インスリン抵抗性保有者では非認知症患者でも記憶機能の経年的低下が顕著にみられるとの結果もある (Burns *et al.*, 2012)。この原因として、2 型糖尿病患者において脳内インスリンシグナル低下が生じている可能性も考えられるが、この点について明確な知見は得られていない。これらの調査から、糖尿病の病態の中でも特にインスリン抵抗性と老人斑の出現や認知機能低下との相関が示され、2 型糖尿病・耐糖能異常と AD 発症の関係が注目されるようになった。

興味深いことに、AD 患者と非 AD 患者を 10 年間にわたり追跡した研究において、AD 患者で空腹時インスリン濃度の経時的上昇が見られたことから、上記とは逆に AD が 2 型糖尿病発症のリスクとなる可能性も示唆されている (Janson *et al.*, 2004)。AD と 2 型糖尿病は、上記したようにそれぞれインスリン抵抗性、炎症性反応、小胞体系ストレス反応等の病態を示すことが知られている。以上のことから、AD と 2 型糖尿病は相互に病態を増悪させるメカニズムが存在することが示唆されてきたが、その詳細な分子メカニズムには不明な点が多く残されてきた。

1-9 2 型糖尿病と AD を繋ぐメカニズム

以上のような知見に立脚して、2 型糖尿病と AD 病態の相互作用のメカニズムを明らかにすることを目的に、モデル動物を用いた研究成果が複数報告されている。

AD モデルの 1 種である Tg2576 マウスに対し 3 か月間の高脂肪食 (high-fat diet:HFD) 負荷を行った検討では、不溶性 A β とアミロイド斑蓄積の増加及び γ -secretase の活性上昇が見られ、疫学的知見と同様に 2 型糖尿病が AD を促進する疫学的結果を再現する結果が得られた (Ho *et al.*, 2004) 。このマウスでは、空腹時に脳内の PI3K、Akt、GSK3 等のリン酸化低下も観察されており、脳内インスリンシグナルの低下が A β を増加させる可能性が示唆された。また、別の AD モデルマウスである APP23 マウスに糖尿病モデルマウスである *ob/ob* マウスを掛け合わせると、脳血管壁への A β 沈着量が増加し、インスリン刺激により視床下部の PIP3 増加量が減少することが示されている (Takeda *et al.*, 2010) 。これらの知見から、脳内のインスリンシグナル低下・脳のインスリン抵抗性と A β 増加が関連する可能性が示唆された。また、AD 患者脳においては、インスリンおよび IGF-1 シグナル関連分子の発現量低下や応答性の低下などの障害が起こっており、AD そのものを“脳の糖尿病”あるいは“3 型糖尿病”と位置付ける仮説も提唱されている (de la Monte *et al.*, 2006; Talbot *et al.*, 2012) 。これらの結果は、インスリンシグナルの低下が糖尿病と AD を結びつける共通の分子病態である可能性を示唆している。

インスリン抵抗性・糖尿病を発症するモデルとして、インスリンシグナルを遺伝的に欠損させたマウスも報告されている。インスリン受容体の欠損は出生直後にケトアシドーシスにより死

亡する (Joshi *et al.*, 1996) 。IRS-1 を欠損したマウスは成長阻害により体重が減少するという特徴を持ち (Pete *et al.*, 1999) 、骨格筋においてインスリン抵抗性を示す (Tamemoto *et al.*, 1994) もの、インスリン抵抗性に応じた β 細胞の過形成による高インスリン血症が生じるため糖尿病病態は発症しない (Terauchi *et al.*, 1997) 。一方で IRS-2 を欠損したマウスは通常に比べ脳重量が減少し (Schubert *et al.*, 2003) 、 β 細胞の形成不足と肝臓のインスリン抵抗性等のため 2 型糖尿病病態を発症する (Withers *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000) 。脳特異的 *Irs2* KO マウスを用いた検討により、IRS-2 が寿命の延長や食餌により誘導される酸化ストレスの減弱等に関与する可能性が示唆されていることから (Taguchi *et al.*, 2007) 、脳における IRS-2 の重要性が予想される。IRS-2 を欠損した Tg2576 マウスにおいては、インスリンシグナルの低下に伴い IDE の増加及び A β 蓄積量の減少が報告されている (Killick *et al.*, 2009) 。また、中枢神経特異的に IGF-1R を欠損したマウスやニューロン特異的に IR を欠損させた Tg2576 マウスを用いた検討により、海馬における A β 量の低下が報告されている (Freude *et al.*, 2009; Stöhr *et al.*, 2013) 。その他、IGF-1R のヘテロ KO マウスと AD モデルマウスを掛け合わせたマウスを用いた検討により、認知機能の改善やアミロイドの蓄積パターン及び A β オリゴマーの形態変化が報告されている (Cohen *et al.*, 2009) 。

以上のように、インスリンシグナルの障害が、2 型糖尿病と AD を繋ぐ鍵となるメカニズムである可能性が複数の報告から示唆されている。しかし、インスリンの作用、特に脳における作用が AD の病態形成に対して促進的に働くのか、それとも抑制的に働くのかという基本的な問題に関しても、まだ明確かつ統一的な見解が得られていない。

1-10 本研究の目的

これまでに2型糖尿病とADの関係について、様々な臨床的・実験的研究が行われてきた。しかし、脳内のインスリンシグナルの変化とA β 蓄積の関係に関する分子メカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究においては、HFD負荷またはIRS-2欠損ADモデルマウスという2つのインスリン抵抗性を示す糖尿病モデルマウスを検討し、更にこれらを組み合わせたADモデルマウスを作出して詳細に比較検討を行うことにより、インスリンシグナルとAD病理増悪との関係を明らかにすることを目標とした。特に代謝ストレスとA β 病態との関係に着目して解析を進め、糖尿病病態が脳のAD性変化に及ぼす影響について考察を行った。

第2章 方法

以下、特に断りのない限り、試薬は和光純薬か関東化学、Sigma もしくはタカラバイオの特級かそれに準ずるものを用いた。また、バッファーは PBS (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 131 mM NaCl, pH=7.4) 、TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris (Invitrogen)-HCl, pH=7.6) 及び RIPA (1% NP-40, 0.5% sodium deoxycolate, 0.1% SDS/TBS, pH=7.6) を用いた。各月齢における解析内容は Table. 2 にまとめた。以下、詳細な解析手順を記す。

2-1 代謝負荷による AD 病態への影響検討用モデルマウスの作出

2-1-1 AD モデルマウス

AD モデルマウスには、当研究室で作出された APP Tg マウスである A7 マウスを用いた (Yamada *et al.*, 2009) 。A7 マウスは中枢神経細胞特異的に高い発現量を示すことが知られている Thy1.2 プロモーター (Aigner *et al.*, 1995) の下で家族性アルツハイマー病に連鎖する Swedish (K670N/M671L) 変異と Austrian (T714I) 変異の2つを有するヒト APP を過剰発現するマウスであり、C57BL/6J バックグラウンドへと戻し交配を済ませている。この A7 マウスでは、およそ 12 か月齢より大脳皮質に Aβ の蓄積が見られ始め、15 か月齢に達すると十分な蓄積が生じることが示されており、慢性的な AD 病理の評価に適したモデルマウスである。対照として、A7 マウスの同腹仔の野生型 (WT) マウスを用いた。

2-1-2 糖尿病モデルマウス

生後 3 か月齢より WT、A7 マウスに普通食 (CRF-1、オリエンタル酵母工業) または高脂肪食 (HFD-32、日本クレア) (食餌組成: Table. 3) による飼育を行うことにより、普通食 (ND) 群ならびに高脂肪食 (HFD) 群を作出した。実験に用いたマウスは食餌負荷を開始する 2 週間前より個別飼育の馴化期間とし、以降も単独での飼育を行った。

2-2 マウスの解析方法

各試験群のマウスを 5、6、9、10、15、18 か月齢において解剖、解析を行った。

インスリン抵抗性試験は、各群ともに解析の 1-2 週間前に行った。解剖前には 15 か月齢群に 16 時間の絶食を行い、後述する一部の 5 か月齢群には 3-4 時間の絶食を行った。頸椎脱臼の後に断頭して脳を摘出し、視床下部をスパーテルで採取したのち、剃刀刃 (フェザー) を用いて左右の半球に切り分けた。15 か月齢の A7 マウスは左半球を免疫組織化学に用い、右半球については海馬と大脳皮質に分離し、視床下部と共に生化学的解析に用いた。5、6、9、10 か月齢の A7 マウス、WT マウス (18 か月齢群) に関しては、左右両脳とも海馬と大脳皮質に分離し、一方をタンパク質の生化学的解析に、もう一方と視床下部を mRNA の生化学的解析に用いた。また同時に、解剖の際には肝臓の一部及び精巣上体周囲の脂肪細胞を回収し、生化学的解析に用いた。

2-3 代謝性指標の解析方法

2-3-1 インスリン抵抗性試験 (Insulin tolerance test: ITT)

15か月齢群のマウスには試験前日より17-18時間の、9、10か月齢群のマウスには当日朝より3-4時間の絶食を行った。マウスの体重を測定後、マウスを空ケージに移動し、尾部の先端 2 mm 程度の位置をハサミで切り、尾静脈血の滴を形成させた。グルテストセンサー (三和化学研究所) を用いて試験前の尾静脈血の血糖値を測定した。マウスの体重の 10 倍量のインスリンを投与した時刻から、20、40、60、80、100、120 分後に再び血糖値を測定した。

2-3-2 ELISA 法による血漿インスリンの測定

血漿インスリン濃度を測定するマウスに関しては、解剖前に尾静脈より採血を行った。解剖時には麻酔後にあらかじめヘパリンを通した 27G 針付き 1ml シリンジ (テルモ) を用い、心臓採血を行い、1/10 量のヘパリン溶液 (20 mU/ml ヘパリンロック (田辺三菱製薬)、大塚生食)を加えて氷冷下に静置した。採血した血液は、遠心後 (1200 x g、20 分間、4°C) に血漿を回収して-80°Cで保存した。

血漿サンプルを氷上で融解し、生理食塩水 (大塚) で希釈した後、高感度インスリン ELISA (森永生科学研究所) を用いてインスリン濃度の測定を行った。プロトコルは添付されている説明書に従った。PBS を投与した対照群に関しては血漿を 30 倍希釈、インスリンを

投与したマウスの血漿に関しては 125,000 倍希釈してプレートにアプライした。

2-4 マウス脳タンパク質の生化学的解析

2-4-1 脳タンパク質の段階抽出

脳は摘出後液体窒素で瞬間凍結を行い、解析に使用するまで -80°C で保存した。解析にあたっては、各部位の脳重量を測定し、その後 10、15 か月齢群に関しては以下の通りに生化学的抽出を行った (Fig.5 参照)。各画分抽出に使用した全ての緩衝液には、cOmplete protease inhibitor (Roche) および phosSTOP phosphatase inhibitor (Roche) を添加した。

まず、マウスの脳重量に対して 10 倍量の TBS を加え、ポッター型テフロンホモジナイザー (Matsushita electric industrial) により氷上でホモジナイズし、超遠心 (Beckman Optima TLX; $260,000 \times \text{g}$, 20 分間、 4°C) 後の上清を TBS 画分とした。次に、沈殿物に対して脳質量の 10 倍量の 2% Triton X-100 (MP Biomedicals) を含む TBS を加えてホモジナイズし、超遠心 ($260,000 \times \text{g}$, 20 分間、 4°C) 後の上清を TX 画分とした。さらに沈殿物に対して TBS と同量の 2% SDS (ナカライテスク) を含む TBS を加えてホモジナイズし、 37°C で 30 分間インキュベートした後、超遠心 ($260,000 \times \text{g}$, 20 分間、 20°C) 後の上清を SDS 画分とした。最後に残った沈殿物に対して、1 ml の 70%ギ酸を加え、ソニケーションにより十分に破碎した後、超遠心 ($260,000 \times \text{g}$, 20 分間、 4°C) をして、上清を回収し、凍結乾燥を行った。得られたサンプルを脳質量と同量の DMSO に懸濁し、ギ酸 (formic acid:FA) 画分とした。

一方、その他の5、6、9か月齢群に関しては、マウスの脳重量に対する10倍量のRIPA、または脂肪組織の重量の5倍量のRIPAを加えてホモジナイズし、遠心(脳組織; 15,300 x g、15分間、4°C 脂肪組織; 12,000xg、20分間、4°C)後の上清をRIPA画分として解析に用いた。

2-4-2 A β ELISA

前項によって得られたTBS・TX・SDS・FA画分に対し、適宜ELISAの検出域に含まれるように希釈後、ELISAを用いて各画分に含まれるA β モノマーを検出した。検出にはHuman/Rat β Amyloid (40) ELISA Kit、Human/Rat β Amyloid (42) ELISA Kit (Wako)を用いた。測定方法はキットに添付されている説明書に従った。

2-4-3 使用抗体

ウエスタンブロット、免疫沈降法及び後述の免疫組織染色法には以下の抗体を用いた。

一次抗体

(希釈倍率: 抗APPC末端認識抗体は2000倍、 α -tubulinは10000倍、その他は1000倍)

抗A β N末端断片部位認識抗体 82E1 (10323; IBL)

抗 APPC 末端認識抗体 (28053; IBL)

抗 IR β 抗体 (sc-711; Santa Cruz Biotechnology)

抗 phospho-tyrosine (pTyr) 抗体 4G10 (#05-321; Millipore)

抗 IL-1 β 抗体 (#12242; Cell Signaling Technology)

抗 IL-18 抗体 (ab71495; abcam)

抗 caspase-1 抗体 (AG-20B-0042; AdipoGen)

抗 phospho-SAPK/JNK (pSAPK/JNK) (Thr-183/Tyr-185)抗体

(#4668; Cell Signaling Technology)

抗 SAPK/JNK 抗体 (#9258; Cell Signaling Technology)

抗 phospho-IKK α/β (pIKK α/β)(Ser-176/180)抗体 (#2697; Cell Signaling Technology)

抗 IKK β 抗体 (#2678; Cell Signaling Technology)

抗 Keap1 (D6B12) 抗体 (#8047; Cell Signaling Technology)

抗 Nrf2 抗体 (ab62352; abcam)

抗 phospho-eIF2 α (peIF2 α) (Ser-51)抗体 (#3398; Cell Signaling Technology)

抗 eIF2 α 抗体 (#5324; Cell Signaling Technology)

抗 phospho-PERK (pPERK) (Thr-980)抗体 (#3179; Cell Signaling Technology)

抗 PERK 抗体 (#3192; Cell Signaling Technology)

抗 XBP1s (D2C1F) 抗体 (#12782; Cell Signaling Technology)

抗 APP 抗体 (MAB348SP; MILLIPORE)

抗 sAPP α 抗体 (11088; IBL)

抗 sAPP β Wild Type 抗体 (18957; IBL)

抗 α -tubulin 抗体 DM1A (T9026; Sigma)

ウエスタンブロット用二次抗体 (希釈倍率:2000 倍)

抗 mouse IgG 抗体 (NA931V; GE Healthcare)

抗 rabbit 抗体 (NA934V; GE Healthcare)

2-4-4 ウエスタンブロット解析

脳タンパク質の段階抽出後のウエスタンブロット解析用サンプルは、sample buffer (最終濃度、2% SDS、15% glycerol、0.08 M Tris-HCl、pH 6.8) を加え、さらに最終濃度が 0.1% になるように β -メルカプトエタノール (ナカライテスク) を添加した後、100°C で 3 分間加熱により還元・変性処理を行った。得られたサンプルを 7.5% Tris-Glycine ゲル、あるいは 15% Tris-Tricin ゲルによって SDS-PAGE 分離を行った。分離したタンパクを 150 mA、3 時間の条件で PVDF membrane (Millipore) に転写し、5% skim milk (DIFCO) を含む TBS-tween (0.1% Tween20、TBS) に浸して室温、30 分間のブロッキングを行った。TBS-tween で 5 分間、3 回の洗浄を行った後、イムノエンハンサー reagent A (WAKO) で x2000 または x1000 (α -tubulin に関しては x10000) に希釈した抗体を添加して室温で 1 時間、または 4°C で一晩

反応させた。TBS-tween で 10 分間、3 回の洗浄を行った後イムノエンハンサー reagent B で x2000 希釈した二次抗体 (anti-rabbit, anti-mouse IgG Horseradish peroxidase linked whole antibody (ECL)) を加えて室温で 45 分間反応させた。TBS-tween で 5 分間、6 回の洗浄を行った後、発色液 (ImmunoStar Reagent (Wako) または SuperSignal (Thermo)) による化学発光を LAS-4000 mini (FUJIFILM) を用いて検出した。検出されたバンドのシグナルは、Image J を用いてデンシトメトリーによる定量化を行った。

リン酸化タンパク質及びリン酸化を含む全てのタンパク質を検出する際は、抗リン酸化タンパク認識抗体でウエスタンブロットを行った後、Stripping buffer (62.5mM Tris-HCl (pH6.8)、0.1M β -メルカプトエタノール、2% SDS) を用いて 65°C、30 分間の抗体変性処理をしたのち、10 分間、3 回の TBS-tween 洗浄を行い、ブロッキングから再びウエスタンブロットにより非リン酸化タンパクの検出を行った。

リン酸化インスリン受容体 (IR) の検出には、ウエスタンブロットに先行して免疫沈降を行った。TX 画分 350 μ l にそれぞれ 150 μ l の TBS、2% Triton X-100 /TBS を添加し、それぞれ 2 μ l の抗 IR 抗体を添加して 4°C で一晩転倒混和した。さらに、60 μ l の 50% Protein G agarose (Invitrogen) /TBS を加え、4°C で 2 時間転倒混和した。遠心後 (800 x g、2 分間、4°C)、それぞれ TBS、2% Triton X-100 /TBS で 3 回洗浄した。洗浄後のビーズに 2x sample buffer と最終濃度 2% β -メルカプトエタノールを添加し、100°C、3 分間の還元、変性処理後、pTyr 抗体及び IR 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

2-5 マウス脳 mRNA 発現量の生化学的解析

2-5-1 組織からの total RNA 抽出

2-4-1と同様に脳は摘出後液体窒素で瞬間凍結を行い、解析に使用するまで-80°Cで保存した。解析にあたっては、各部位に1mlのISOGEN (ニッポンジーン) を添加した後に、細胞破碎ポリロンホモジナイザー(KINEMATICA) により組織を破碎し、RNA抽出を行った。プロトコルは添付されている説明書に従った。

2-5-2 定量リアルタイム PCR (qRT-PCR) 法による定量的解析

2-5-1の方法で抽出した各サンプルのRNAを用いて、一本鎖cDNAの合成を行った。合成の際は、ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を適宜用いた。合成方法はキットに添付されている説明書に従った。

その後、リアルタイムPCR装置 (LightCycler[®] 480 II、Roche) によるmRNA発現量の定量的測定を行った。測定にあたり、まずTHUNDERBIRD[®] SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて反応液の調整を行った。試薬の組成はキットに添付されている説明書に従った。そして、初期変性に1分間、95°C、PCR (45 サイクル)は変性に15秒、95°C、及び伸長に45秒、60°Cという2ステップPCRの条件下でリアルタイムPCR解析を行った。この時、融解曲線分析は測定機器の設定に従った。コントロール遺伝子にはグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲ

ナーゼ (GAPDH) を使用した。

qRT-PCR 法による測定の際は、以下のプライマーを使用した。各プライマーは、Primer 3
により各々設計を行った。(以下、forward=f, reverse=r とする)

TNF α _f; GATTATGGCTCAGGGTCCAA

TNF α _r; CTCCCTTTGCAGAACTCAGG

PYCARD_f; ACAGAAGTGGACGGAGTGCT

PYCARD_r; CTCCAGGTCCATCACCAAGT

NLRP3_f; TACGGCCGTCTACGTCTTCT

NLRP3_r; CGCAGATCACACTCCTCAAA

XBP1_f; TCCGCAGCACTCAGACTATG

XBP1_r; ACAGGGTCCAACCTTGCCAG

XBP1s_f; AAGAACACGCTTGGGAATGG

XBP1s_r; CTGCACCTGCTGCGGACT

Herpud1_f; CTGATGCTGGTGACAACCAC

Herpud1_r; CAGAATTGCCATTGCACAAC

Pdia3_f; CTGATGCTGGTGACAACCAC

Pdia3_r; CAGAATTGCCATTGCACAAC

Dnajb9_f; CTGATGCTGGTGACAACCAC

Dnajb9_r; CAGAATTGCCATTGCACAAC

ATF4_f; TCCTGAACAGCGAAGTGTTG

ATF4_r; CGCACTGACCACTCTGTTTC

ATF6_f; GGCCAGACTGTTTTGCTCTC

ATF6_r; CCCATACTTCTGGTGGCACT

CHOP_f; CCTAGCTTGGCTGACAGAGG

CHOP_r; CTGCTCCTTCTCCTTCATGC

BiP_f; AGTGGTGGCCACTAATGGAG

BiP_r; CAATCCTTGCTTGATGCTGA

GAPDH_f; AACGACCCCTTCATTGAC

GAPDH_r; GAAGACACCAGTAGACTCCAC

2-6 ELISA による酸化ストレスの測定

酸化ストレスのマーカーとして、タンパク質中のアミノ酸が活性酸素種 (ROS) により酸化修飾を受けたカルボニルタンパク質に着目した。5 か月齢 WT マウスの海馬において、重量の 10 倍量の PBS を加えてホモジナイズし、超遠心 (260,000 x g、20 分間、4°C) をした後に上清を回収した。この PBS 画分に対し、適宜 ELISA の検出域に含まれるように希釈後、ELISA により 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) を用いてカルボニル基を誘導体化し、

カルボニル化タンパク質を検出した。検出には OxiSelect™ カルボニル化タンパク質測定 ELISA キット (Cell Biolabs Inc.) を適宜用いた。測定方法はキットに添付されている説明書に従った。

2-7 インスリンシグナルを遺伝的に阻害した AD モデルマウスの作出

インスリンシグナルが遺伝的に阻害されるモデルとして、*Irs2* KO マウスを使用した (Kubota *et al.*, 2000)。これらのマウスと、当研究室の A7 マウスを掛け合わせることで、全身において IRS-2 を欠損させた A7 マウスを作出した。対照として、同腹仔の A7 および *Irs2*^{+/-}; A7 マウスを用いた。また、一部の IRS-2 欠損 A7 マウスに関しては、2-1-2 と同様に生後 3 か月齢より 7.5、12 か月間の高脂肪食による飼育を行うことにより、高脂肪食 (HFD) 群とした。

2-8 IRS-2 欠損マウスの生化学的検討

上記により得られた *Irs2*^{-/-}; A7 マウスに関して、15 か月齢において代謝性指標となる体重、血糖値、血中インスリン濃度の測定を行った。また、解剖時には脳重量の測定も行った。血糖値の測定は 2-3-1 と同様の手法で行い、血中インスリン濃度の測定に関しては 2-3-2 と同様の手法で行った。頸椎脱臼後迅速に 2-2 と同様の手法で脳の各部位を摘出し、液体窒素

で瞬間凍結を行うことで解析に使用するまで -80°C で保存した。解析にあたっては、15 か月齢群に関しては左半球を免疫組織化学に用い、右半球は海馬と大脳皮質に分離し、視床下部と共に生化学的解析に用いた。また同時に、2-2 と同様に精巣上体周囲の脂肪細胞を回収し、mRNA の解析に用いた。

2-9 免疫組織化学的検討

2-9-1 パラフィン切片の作製

13.5 か月齢及び 15 か月齢の A7 マウスの脳左半球を、摘出後すぐに PFA 溶液 (4% パラホルムアルデヒド (TAAB) 、PBS、pH 7.4) に浸潤し、24 時間室温で振盪を行い、組織を固定した。PBS で 5 分間、3 回の洗浄を行った後、脳を前後方向に 7 等分し、70%、80%、100%、100%のエタノール置換によって脱水後、キシレンに 2 回置換し、さらに 65°C の液体パラフィンに 3 回浸透させた。パラフィンに包埋後、マイクロームを用いて $4\ \mu\text{m}$ 厚で薄切を行い、poly-L-lysine コート済みのスライドガラス (松浪硝子) 上に伸展させ、 37°C で一晩乾燥させた。

2-9-2 免疫組織化学染色

まず、パラフィン切片をキシレンに 5 分間、3 回浸透させ、脱パラフィン処理を行った。続い

て、エタノール系列 (100%、100%、90%、80%、70%) に各 5 分ずつ浸潤させ、親水化を行った。流水中で 10 分間の洗浄後、クエン酸緩衝液 (pH6.0:和光純薬) 中で 20 分間のマイクローエーブ処理を行った。常温に冷却後、流水中で 10 分間の洗浄を行い、続けて proteinase K 溶液中 (100 µg/ml proteinase K (Worthington) 、TBS) で 37°C、6 分間の消化を行った。流水で洗浄後、切片を TBS に浸し、ブロッキング液 (10% calf serum、0.1% NaN₃、TBS) をのせ、室温で 30 分間インキュベートした。次に、ブロッキング液で x1000 に希釈した抗 Aβ 抗体 (82E1 (IBL)) をのせ、室温で一晩静置した。続けて TBS にて 5 分間、3 回の洗浄後、ブロッキング液で x500 に希釈したビオチン化 2 次抗体 (biotinylated anti-mouse IgG antibody (Vector Laboratories)) をのせ、室温で 2 時間静置した。TBS にて 5 分間、3 回洗浄後、HRP を結合させた avidin-biotin complex (ABC elite (Vector Laboratories) 、TBS) と室温で 50 分間反応させた。TBS にて 5 分間、3 回の洗浄後、切片を 3,3'-ジアミノベンチジン (DAB) 発色液 (220 mg/ml DAB (DOJINDO) 、0.012% 過酸化水素、TBS) に 5 分間浸し、発色をした。その後、流水で 10 分間洗浄して反応を停止し、エタノール系列 (70%、80%、90%、100%、100%) で各 1 分間ずつ脱水を行い、キシレン系列に 1 分間、3 回透徹後、HSR 液 (シスメックス) にて封入を行った。

2-9-3 Aβ 斑蓄積の評価

前項に従って抗 Aβ 染色したマウスの脳切片に対し、システム生物顕微鏡 (BX51、

OLYMPUS) を用いて観察を行い、CCD カメラ (DP71、OLYMPUS) で撮影を行った。

A β 斑の定量には梨状皮質を選択し、ImageJ を用いて画像の 2 値化を行い、皮質に占める A β 斑面積割合を算出した。梨状皮質は bregma -1.82 mm から前後 0.8 mm 以内の切断面において、basolateral amigdala (BLP) と piriform cortex の交点を中心に含む一視野を皮質部位と定義した。

2-10 小胞体ストレス応答性の評価方法

既報 (Liu *et al.*, 2016) のプロトコルに倣い、末梢及び中枢の小胞体ストレスの応答性を以下の手法で検討した。

解剖前日よりマウスに 24 時間の絶食をかけた後、そのまま解剖する群 (fasting 群) と 1 時間再給餌したのちに解剖する群 (re-feeding 群) に分け、各々の群において 2-2 と同様の手法で視床下部、海馬、大脳皮質及び肝臓を回収した。この時、絶食開始前、絶食後、及び再給餌後のそれぞれにおいて各マウスの血糖値と体重値を測定した。その後、2-5 と同様の手法で各組織の mRNA 発現量を定量し、fasting 群に対する re-feeding 群の発現量の増加率を評価することにより、WT マウスと A7 マウスの HFD 群同士、及び A7 マウスの ND 群と HFD 群の間で比較検討を行った。

2-11 統計解析

2群間の比較には Student t-test を用いた。また、4群間の比較の際には Tukey-Kramer 法を用いた。解析には GraphPad Prism を用い、いずれも $p < 0.05$ を有意と設定した。

第3章 結果

3-1 糖尿病合併 AD モデルマウスの作出

本研究では、インスリンシグナルの障害が AD 病態に及ぼす影響を解明するため、当研究室で作出した家族性 AD 変異型 APP Tg マウス (A7) を AD モデルマウスとして用いた。A7 マウスは、Thy1.2 プロモーターの下流で Swedish 変異 (KM670/671NL) と Austrian 変異 (T714I) を持つヒト APP695 を神経細胞特異的に過剰発現するマウスであり、他の APP Tg マウスに比して A β 42 の産生比率が高く、A β 42 と A β 40 が同程度 (50%ずつ) の比率で産生されるという特徴をもつ。また、A7 マウスでは 12 か月齢前後より大脳皮質及び海馬に A β が蓄積する。この AD モデルマウス及び同腹の野生型 (WT) マウスに対し、生後 3 か月齢から高脂肪食 (high-fat diet: HFD) を長期にわたり負荷することでインスリン抵抗性を誘発し、糖尿病合併 AD モデルマウスを作出した。なお、3 か月齢時点では、WT と A7 の間でインスリン感受性に差は認められなかった (Fig. 6)。A β 蓄積開始前の 5 か月齢、6 か月齢、9 か月齢、A β 蓄積開始後の 15 か月齢及び 18 か月齢に解析を行った (給餌組成: Tba1e. 2、給餌計画: Fig. 7)。

3-2 HFD 負荷による末梢及び中枢のインスリン応答性への影響

当研究室で作出した A7 マウスモデルについて、糖尿病の病態を発症しているか否かを検討した。先行研究の結果より、本実験と同条件の給餌組成で HFD 負荷をしたマウスでは、負荷開始後 2 か月目より、耐糖能障害・インスリン抵抗性が誘発されることが知られている (Kubota *et al.*, 2011)。

まず、末梢の代謝性指標の評価を行った。普通食 (normal diet: ND) または HFD を負荷した 9 か月齢の A7 マウスに対し、インスリンを腹腔内投与した後、継時的に血糖値を測定し、その変化の割合をもとに末梢のインスリン抵抗性の有無を評価するインスリン抵抗性試験を行った。HFD 負荷群においてはインスリン投与後の血糖値の低下の程度は緩徐であり、血糖値の AUC を算出した結果、ND 群に比して有意に増加しており、インスリンへの応答性の低下が示された (Fig. 8A)。またこの月齢において、HFD 負荷により血中インスリン濃度の上昇 (高インスリン血症) が認められたことに加え、定常状態における血中グルコース濃度の有意な上昇が示された (Fig. 8B, C)。これらの結果から、HFD 負荷 A7 マウスモデルにおいて、A β 蓄積開始時期以前より、インスリン抵抗性ならびに糖尿病の病態を発症していることが示された。

次に、中枢のインスリンシグナル応答性の評価を行った。中枢のインスリンは、脳血管内皮細胞に発現するインスリン受容体を介したトランスサイトーシスにより、血中から脳間質に移行すると考えられており、ヒトにおいては血中インスリン濃度の上昇から 30 分前後で脳脊髄液 (CSF) 中のインスリン濃度が上昇することが報告されている (Wallum *et al.*, 1987)。しかし、CSF 中のインスリン濃度は血中の約 1/100 との報告もなされている (Stein *et al.*,

1987)。そこで、5か月齢のWT及びA7マウスに5Uという生理的濃度に対して多量のインスリンを腹腔内投与した後、インスリンの脳内移行が十分に生じていると考えられる40分後に脳を摘出し、インスリンシグナルの活性化について解析を行った。コントロールとなるPBS投与群において血中のインスリン濃度がHFD負荷によりどの程度まで上昇するかを検討したところ、WT、A7マウス共にHFD負荷により血中インスリン濃度は顕著な上昇を示し、5か月齢の時点で既に高インスリン血症を呈していることが示された (Fig. 9)。また、5Uのインスリンを腹腔内投与した40分後に同様の測定を行ったところ、血中インスリン濃度はWT、A7マウスそれぞれにおいてND群とHFD群共に同程度まで上昇を示しており (Fig. 9)、インスリン刺激に対する応答性の評価系として妥当であると考えた。受容体型チロシンキナーゼであるインスリン受容体 (IR) はインスリン刺激を受けると自己リン酸化により活性化し、下流にシグナルを伝達することが知られている。大脳皮質におけるIRのチロシンリン酸化状態を抽出した脳画分からの免疫沈降、ウェスタンブロットにより検討したところ、WT、A7マウス共にND群においてインスリン投与により顕著なIRリン酸化比率の増加、すなわちインスリンシグナルの活性化が認められた (Fig. 10)。一方で、HFD負荷を行ったWT、A7マウスの脳においては、ND群に比べてインスリン刺激依存的なIRリン酸化の上昇が顕著に抑制されていた (Fig. 10)。これらのことから、HFD負荷は大脳皮質におけるインスリン応答性を低下させること、またA7マウスではHFD負荷により同月齢のWTマウスと同程度に脳内インスリン応答性の低下が生じることが分かった。

過去の報告において、糖尿病合併ADモデルマウスの視床下部におけるインスリン応答

性の低下は示されていたが (Takeda *et al.*, 2010)、本検討により大脳皮質においても HFD 負荷によりインスリン抵抗性が生じることが新たに示された。

3-3 HFD 負荷が脳内 A β 量ならびにアミロイド斑蓄積に及ぼす影響

次に、HFD 負荷による糖尿病病態の誘発が脳内の A β 量に与える影響について、検討を行なった。A β 斑の蓄積が生じていない 5 か月齢の WT 及び A7 マウスと、広汎なアミロイド斑の蓄積が認められる 15 か月齢の A7 マウスの大脳皮質について、脳のタンパク質を可溶性に応じて 4 つの画分に段階的に抽出した (Fig. 5)。TBS 画分、Triton X-100 (TX) 画分、SDS 画分、ギ酸 (FA) 画分にはそれぞれ可溶性タンパク質、膜結合性タンパク質、不溶性タンパク質及び高度に不溶なタンパク質が含まれる。特に、可溶性 A β は TBS 画分に分画され、アミロイド線維を形成し高度に不溶化した A β は FA 画分に分画される。まず、ELISA 法を用いて 5 か月齢の A7 マウスにおける大脳皮質中の可溶性 A β (TBS 画分) の量を測定したところ、HFD 負荷による変化は見られなかった (Fig. 11A)。そこで、15 か月齢の A7 マウスの大脳皮質中の可溶性 A β 及び不溶性 A β (FA 画分) の量を測定したところ、アミロイドの主要構成成分である不溶性 A β 42 量が顕著に増加しており、不溶性 A β 40 量も増加の傾向を示した (Fig. 11B)。これらの結果と、3-2 で示された、5 か月齢マウスでは大脳皮質において HFD 負荷によりインスリン抵抗性が生じることを併せて考えると、A7 マウスで HFD 負荷により生じる大脳皮質のインスリン抵抗性は A β 量に依存せず、また加齢に伴う不溶性 A β 量

の増加に先行して生じることが考えられた。

更に、HFD 負荷が A β 蓄積に与える影響について免疫組織化学的検討を行った。A β 蓄積後の 15 月齢の脳パラフィン切片に、抗 A β 抗体 (82E1) による免疫染色を行った。大脳皮質のうち、A β 蓄積が初期から多くみられる梨状皮質について、A β 染色陽性領域を計測し、アミロイド斑陽性部分の占有率 (A β burden) を測定した。その結果、HFD 負荷により大脳皮質全域において A β 蓄積は増加しており、梨状皮質における A β 占有率は有意に増加していた (Fig. 12A, B)。また、アミロイド蓄積の形態にも違いが見られ、ND 群に比べてびまん性のアミロイド斑が多く見られた (Fig. 12A)。

以上の結果から、A7 マウスは HFD 負荷により、加齢に伴って不溶性 A β 量及びアミロイド斑蓄積量が顕著に増加することが示され、糖尿病病態による AD 病理の促進を模倣するモデル実験系が確立された。これは、これまで種々の AD モデルマウスで示された HFD 負荷によるアミロイド病態への促進効果について、その普遍性を支持するものであった。

3-4 IRS-2 欠損 AD モデルマウスの作出、及び代謝性指標の評価

糖尿病合併 AD モデルマウスを用いた検討から、HFD 負荷により末梢のインスリン抵抗性が惹起されるとともに、脳のインスリン応答性も低下していること、またそれらのマウスにおいて高齢でアミロイド蓄積が増加することが明らかになった。AD 患者脳ではインスリンシグナル関連分子の発現低下や応答性低下が起こることが報告されており (de la Monte *et al.*,

2006; Talbot *et al.*, 2012) 、インスリンシグナルの異常と AD 発症との関連が示唆されている。そこで本研究では、インスリンシグナルの異常とアミロイド病態形成との関連を明らかにすることを目的に、インスリンシグナルが遺伝学的に抑制される IRS-2 欠損マウス (*Irs2* KO マウス) を用いた検討を行った。IRS-2 欠損マウスは主に肝臓におけるインスリンシグナルの阻害および膵 β 細胞の増殖障害から、10 週齢ごろより糖尿病を発症することが知られている (Kubota *et al.*, 2000) 。

IRS-2 を欠損する AD モデルマウスを作出するため、オス *Irs2*^{+/-}; A7 マウスとメス *Irs2*^{+/-} マウスを交配し、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスを新たに作出した。これらのマウスを 5 か月齢または 15 か月齢において解析した。また、同様の手法で IRS-2 欠損 WT マウスを作出し、12 か月齢から 15 か月齢まで飼育したのちに解析を行った。

はじめに、9 か月齢の *Irs2*^{-/-}; A7 マウスの代謝関連の指標について検討を行った。IRS-2 欠損により、A7 マウスでは体重に変化が見られなかったが、血中インスリン濃度と血糖値に有意な増加が確認された (Fig. 13) 。この結果から、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスは高齢において糖尿病病態を発症することが判明した。

3-5 IRS-2 欠損が脳内 A β 量ならびにアミロイド斑蓄積に及ぼす影響

次に、IRS-2 の欠損が脳内の A β 病態に与える影響について検討を行った。A β 斑の蓄積が生じていない 5 か月齢 A7 マウスの大脳皮質における可溶性 A β 量を測定したところ、

IRS-2 欠損の有無による差異は見られなかった (Fig. 14)。また、APP を過剰発現させていない 12-15 か月齢の *Irs2*^{-/-} マウスの大脳皮質中における可溶性 A β 量に関しても、IRS-2 欠損による変化は見られなかった (Fig. 15)。以上の結果から、若齢の A7 マウスの A β 量は IRS-2 欠損の影響を受けないこと、ならびに内在性 A β 量は高齢マウスでも IRS-2 欠損により変化しないことが示された。この結果は、IRS-2 欠損が A β 量に影響を及ぼすのは高齢の AD モデルマウスに対してのみであることを示唆するものである。

続いてアミロイド斑蓄積への影響を検討する目的で、免疫組織化学的検討を行った。脳のパラフィン切片を抗 A β 抗体により染色し、15 か月齢マウスの梨状皮質について A β 染色陽性領域を計測し、A β burden を測定した。その結果、A7 マウスにおけるアミロイド斑蓄積は IRS-2 の欠損により顕著に減少していた (Fig. 16)。

以上の結果から、高齢 A7 マウスにおける IRS-2 の欠損は、糖尿病病態を発症させるにも関わらず、HFD 負荷の場合とは逆に、A β 蓄積を減少させることが示された。

3-6 IRS-2 欠損 AD モデルマウスに対する代謝負荷が AD 病理に及ぼす影響

ここまでの結果から、A7 マウスに対する HFD 負荷あるいは IRS-2 の欠損は、いずれも全身のインスリン抵抗性を招来し、糖尿病病態を生じるにもかかわらず、アミロイド斑蓄積に関しては前者は亢進、後者は減少という相反する結果を示した。両モデルにおけるインスリン抵抗性発症要因の違いとして、HFD 負荷においては、脂肪組織を始めとするインスリン感受

性組織における炎症反応や小胞体ストレス、酸化ストレスが引き起こされ、その結果としてインスリンシグナルの障害が生じることが示されている (Hotamisligil *et al.*, 1995; Roytblat *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 2004)。このような、インスリン抵抗性発症の上流に位置する要因が A β 蓄積促進の原因となる可能性を考え、インスリン抵抗性と AD 病理との関係をより直接に検討するため、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスに対する HFD 負荷を行った。新たに作出したこのモデルにおいて、A β 蓄積開始前の 9-10 か月齢及び蓄積後の 15 か月齢での解析を行った (給餌計画: Fig. 17)。

まず 9 か月齢の *Irs2*^{-/-}; A7 マウスにおいて全身の代謝性指標を検討したところ、HFD 負荷によりインスリン抵抗性の亢進及び血中インスリン濃度や体重の有意な上昇、血糖値の上昇傾向が見られた (Fig. 18)。続いて 10 か月齢の *Irs2*^{-/-}; A7 マウスについて、AD 病理への影響を検討する目的で脳タンパク質を段階的に抽出し、可溶性ならびに不溶性 A β 量を ELISA 法により測定した。その結果、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスでは HFD 負荷により不溶性 A β 40 量に有意な増加が見られ、その他の可溶性、不溶性 A β 量に関しても増加傾向が示された (Fig. 19)。この結果から、9-10 か月齢の IRS-2 欠損 AD モデルマウスは、HFD 負荷により糖尿病病態が増悪することに加え、アミロイド斑蓄積開始前の段階で脳 A β の総量が増加することが初めて示された。

次により加齢の進んだ、15 か月齢の *Irs2*^{-/-}; A7 マウスにおいても代謝性指標を検討した。HFD 負荷により、体重の有意な増加、血中インスリン濃度の増加傾向及び血糖値の有意な上昇が観察された (Fig. 20)。これらの結果から、*Irs2*^{-/-}; A7 に対する HFD 負荷により、高

齢でも糖尿病様の病態が増悪することが示された。そして、AD 病理への影響を検討するため、可溶性画分及び不溶性画分に関して A β 40、A β 42 を含む A β 総量を測定したところ、HFD 負荷により可溶性 A β 量に増加傾向が見られた (Fig. 21)。免疫組織化学的解析により大脳皮質における A β 染色陽性領域 (A β burden) を測定した結果、A7 マウスにおけるアミロイド斑蓄積は HFD 負荷の際、IRS-2 欠損時における A β 蓄積増加は抑制されるものの、IRS-2 欠損の有無を問わず有意な A β 蓄積増加が確認された (Fig. 22)。

以上のことから、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスへの長期的な HFD 負荷により、糖尿病様病態がさらに増悪すると同時に A β 病理も増強されることが初めて明らかとなった。遺伝的にインスリンシグナル分子を欠損した状況においても、代謝負荷による A β 病理促進の効果が認められたことから、A β 病理の増悪はインスリンシグナル障害 (低下) の結果として生じるものではない可能性が示唆された。

3-7 IRS-2 欠損 A7 マウスに対する代謝負荷が末梢のストレス反応に及ぼす影響

序文で述べたとおり、慢性的な過食、肥満状態は脂肪組織の肥大化、TNF α などの炎症性サイトカインの分泌増加や活性酸素種の発現増加、そしてそれに伴う小胞体ストレスシグナルの活性亢進などの現象を引き起こし、インスリン抵抗性の原因となることが知られている (Hotamisligil *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 2004; Ozcan *et al.*, 2004)。

そこで、インスリン抵抗性と炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルとの関係を詳細に検

討するため、A7 マウスの脂肪組織における炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子の mRNA 発現量を qRT-PCR 法により測定した。HFD 負荷により高齢の 10、15 か月齢の *Irs2*^{+/+}; A7 マウスでは末梢にて、炎症性シグナル分子である TNF α の発現量が有意に増加することが示された (Fig. 23)。このことから、AD モデルマウスは代謝負荷により炎症性シグナルの活性が亢進することが示された。一方、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスの ND 群における TNF α の発現量は *Irs2*^{+/+}; A7 マウスの ND 群と同程度であった (Fig. 23)。更に、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスに対する HFD 負荷により、TNF α ならびに小胞体ストレスシグナル分子の CHOP、BiP の発現量が有意に増加していることが示された (Fig. 24) ことに加え、HFD 負荷によるこれらのシグナル分子の発現量亢進は IRS-2 欠損の有無を問わないことが示された (Fig. 25)。これらの結果から、炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルの活性は IRS-2 の欠損によって変化しない一方、HFD 負荷によって亢進することが示され、インスリンシグナル障害が直接炎症反応または小胞体ストレス反応を引き起こすのではないと考えられた。

以上の結果は、HFD 負荷による A β 蓄積増加には、インスリン応答性低下よりも代謝ストレス反応が関与している可能性を示唆するものである。

3-8 HFD 負荷によるシグナル分子の活性変化

これまでに、モデル動物を用いた検討により、慢性的な HFD 負荷により視床下部におけ

る炎症反応ならびに小胞体ストレス反応が亢進することが報告されている (Zhang *et al.*, 2008)。また、炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の産生を制御するタンパク質複合体として知られる NLRP3 インフラマソームを欠損させた APP/PS1 マウスでは、アミロイド斑蓄積が減少することが示されている (Heneka *et al.*, 2013)。そこで、上記の HFD 負荷によるシグナル活性亢進の結果を踏まえ、本研究で認められた糖尿病様 AD モデルマウスにおける病態増悪のメカニズムにこれらのシグナル活性が関与している可能性を考え、中枢及び末梢における炎症性シグナル及び小胞体ストレスシグナル分子の活性について検討を行った。炎症性シグナル亢進の指標として、NF- κ B 経路における IKK α 、IKK β や MAPK カスケードに属する JNK に加え、各種炎症性サイトカインの活性を検討した。この時、炎症性サイトカインである IL-1 β 及び IL-18 は caspase-1 による切断を受けて活性化し、TNF α は TNF α 変換酵素 (TACE) による切断を受けることにより炎症反応を亢進させる。また、小胞体ストレスシグナル亢進の指標として、翻訳抑制に関与する PERK-eIF2 α 経路及びシャペロン転写促進に関係する IRE1-XBP1s 経路の活性を検討し、酸化ストレス関連の指標としては防御機構として機能している Keap1-Nrf2 制御系の活性を検討した。検討には、インスリン抵抗性獲得後の 5、9、18 か月齢の WT マウスならびに 6、9 か月齢の A7 マウスを用いた。末梢の解析には、過去の報告からストレス反応に関連する分子の活性が代謝負荷により最も大きく変動することが期待される脂肪組織を用いた。

初めに、5 か月齢の WT マウスにおいて脂肪組織のタンパク発現量を WB 法により測定したところ、HFD 負荷により JNK の Thr-183 におけるリン酸化比率の有意な増加が示された

(Fig. 26)。また、IL-1 β 及び IL-18 の前駆体タンパク質の発現量は HFD 負荷の有無により変化が見られなかったものの、TNF α 前駆体タンパク質は HFD 負荷により顕著に発現量が減少していた (Fig. 26)。序文で述べたとおり、TNF α は JNK シグナル経路を活性化することが知られている。従ってこれらの結果から、既報通り WT マウスでは HFD 負荷により脂肪組織における炎症反応が亢進しており、特に TNF α -JNK 経路の活性亢進が示された。

次に、視床下部及び海馬におけるタンパク発現量をウェスタンブロット (WB) 法により検討した。炎症性サイトカインである IL-1 β 前駆体及び IL-18 前駆体の発現量、JNK の Thr-183 及び Tyr-185、IKK α 及び IKK β の Ser-176/180、eIF2 α の Ser-51、PERK の Thr-980 におけるリン酸化比率、そして Keap1 及び Nrf2 の発現量を測定することにより、シグナルの活性化を評価した。また、5 か月齢の WT マウスに関しては、海馬におけるタンパクカルボニル化を ELISA 法により定量し、酸化ストレスの活性評価を行った。

HFD 負荷により、5 か月齢の WT マウスでは、視床下部の IKK β リン酸化率低下、海馬の eIF2 α リン酸化率低下が認められたが、その他の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル分子に関しては有意な変化が見られなかった (Fig. 27, 28)。また、海馬における Keap1 及び Nrf2 の発現量も HFD 負荷により変化が見られず、酸化ストレスの活性に関しても有意な変化は生じなかった (Fig. 31)。更に、9、18 か月齢の WT マウスでは、HFD 負荷の際に視床下部及び海馬の eIF2 α 、PERK、JNK のリン酸化率に変化は見られなかった (Fig. 33, 34)。一方 A7 マウスにおいては、HFD 負荷により 6 か月齢で視床下部の eIF2 α リン酸化率増加が確認されたが、その他の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル分子に関しては変化が

見られず (Fig. 29, 30)、Keap1 及び Nrf2 の発現量にも有意な変化は見られなかった (Fig. 32)。これらの結果から、A7 マウスにおいては、HFD 負荷により視床下部で小胞体ストレスシグナルにおける PERK-eIF2 α 経路の活性が亢進する可能性が示唆された。

次に、リアルタイム定量 PCR 法を用い、脂肪組織と海馬における mRNA 発現量の変動を解析した。炎症性サイトカインである TNF α 、IL-6、ASC、NLRP に加え、小胞体ストレスシグナル分子の ATF6、XBP1s、CHOP 及び XBP1s の target gene である BiP、Dnajb9、Pdia3 ならびに Herpud1 の発現量を測定した。まず脂肪組織においては、9 か月齢にて WT、A7 マウス共に HFD 負荷により小胞体ストレスシグナル分子 (XBP1s、CHOP、BiP、Dnajb9) 及び TNF α の発現量が有意に増加していた (Fig. 35)。それに加え、測定した全シグナル分子について、WT マウスの方が A7 マウスに比べ HFD 負荷による mRNA 発現量がより大きく増加している傾向にあった (Fig. 35)。一方海馬に関しては、インスリン抵抗性獲得後間もない 6 か月齢において、HFD 負荷により WT、A7 マウス共に海馬で XBP1s の mRNA 発現量が有意に増加した (Fig. 36)。また、アミロイド斑蓄積開始前の 9 か月齢では、A7 マウスにおいては HFD 負荷による発現量変化は認められなかったものの、WT マウスにおいては HFD 負荷により XBP1s 発現量が有意に増加しており、その他の小胞体ストレスシグナル分子 (CHOP、BiP、Dnajb9) に関しても増加傾向が認められた (Fig. 37)。しかし 18 か月齢の WT マウスでは、いずれの因子においても HFD 負荷による発現量変化は認められなかった (Fig. 38)。

以上の結果から、WT マウス及び A7 マウスの中枢では、アミロイド斑蓄積開始前の月齢に

において IRE1-XBP1s 経路に代表される小胞体ストレス関連シグナル分子の mRNA 発現量が HFD 負荷により有意に増加しているが、高齢ではその変化が見られなくなることが示された。更に、9 か月齢の A7 マウスでは WT マウスに比べ、HFD 負荷による発現量の増加が特に中枢において抑制されることが新たに示された。

3-9 HFD 負荷による小胞体ストレス応答性の評価

近年、*in vitro* 及び *in vivo* の検討により、IKK β や XBP1s の肝臓における活性変化がグルコース恒常性に関与していることが報告された (Liu *et al.*, 2016)。この報告では、モデル動物に対し解析時に 24 時間絶食をかけた群とその後 1 時間だけ食餌を再給餌した群を作出し、肝臓における IKK β のタンパクレベルのリン酸化率、XBP1s のタンパク発現量ならびに target gene の mRNA 発現量が WT マウスでは再給餌により顕著に上昇するのに対し、遺伝性肥満マウスではそれが見られないことを示している。この結果から、糖尿病の増悪には肝臓における炎症反応または小胞体ストレス反応の応答性低下が関与している可能性が近年示唆されている。しかし、他のシグナル分子に関しても同様の変化が見られるのか、また脳において炎症性シグナルならびに小胞体ストレスシグナルの応答性に変化が生じているかどうかは未だ明らかでない。

これらの知見を基に、本研究で用いた HFD を負荷した A7 マウスおよび WT マウスにおいて小胞体ストレス、炎症性反応の応答性が中枢または末梢で変化しているかを検討した。

本検討に先立ち、まずは5か月齢 WT マウスの ND 群と HFD 群に対し、24 時間の絶食後に解析する群 (fasted) と、絶食後に 1 時間再給餌したのちに解析する群 (refeeding) を作出した。そして、XBP1s をはじめとする小胞体ストレス関連シグナル分子ならびに炎症性シグナル分子のタンパク発現量を WB 法により測定した。その結果、肝臓における XBP1s のタンパク発現量は ND 群では絶食時に比べ再給餌により増加を示す一方、HFD 群では再給餌後も発現量の変化が見られなかった (Fig. 39)。従って、HFD 群では肝臓において小胞体ストレス応答性の低下が生じており、この結果は既報を再現するものであると判断した。また、p $\text{eIF2}\alpha$ と pIRE1 に関しては、HFD 群における再給餌による発現量の上昇が ND 群と比べ僅かに抑えられていた。一方 pJNK に関しては、HFD 群で再給餌による発現量抑制は見られなかった (Fig. 39)。また、pIKK の発現量も測定したものの、ND 群・HFD 群共に再給餌の際にも発現量が非常に低く検出できなかった (data not shown)。本検討による結果から、末梢における ND 群と HFD 群における再給餌の効果の違いは小胞体ストレスシグナル分子、とりわけ XBP1s で最も顕著に表れることが示された。

続いて、脳における生理的代謝ストレスに対する小胞体ストレスシグナルの応答性の変化を同様の手法で評価した。WT マウスの海馬では、ND 群において XBP1s、p $\text{eIF2}\alpha$ 、pIRE1、pJNK の再給餌によるタンパク質レベルでの発現量変化は見られなかった (Fig. 40)。また pIKK に関しては、タンパク発現そのものが検出できなかった (data not shown)。次に、視床下部及び大脳皮質における XBP1s 及びその target gene の mRNA 発現量を qRT-PCR 法により測定した。その結果、視床下部と大脳皮質共に XBP1s、BiP、Herpud1 の mRNA 発

現量の再給餌による増加が示され、この傾向は ND 群と HFD 群に共通して見られた (Fig. 41, 42)。以上の結果から、末梢組織だけでなく中枢神経系でも再給餌による生理的代謝ストレスは IRE1-XBP1s 経路に代表される小胞体ストレスシグナルを急性に亢進させることが明らかになり、この実験系は小胞体ストレス反応の応答性を評価するのに応用可能であると判断した。

この条件検討の結果を踏まえ、HFD を負荷した 6 か月齢の WT と A7 マウスで小胞体ストレス反応の応答性を評価した。その結果、肝臓では WT と A7 マウスで再給餌による XBP1s、CHOP、Dnajb9 及び BiP の発現量上昇は同程度であったが (Fig. 43)、大脳皮質では WT マウスのみ再給餌により XBP1s 及び BiP の発現量が絶食時と比べて顕著に増加していた (Fig. 44)。この時、A7 マウスでは XBP1s、CHOP、Dnajb9 及び BiP の発現量は再給餌による増加を示さなかった (Fig. 44)。また、海馬では WT マウスにおいて XBP1s の発現量が再給餌により増加する傾向を示したものの、大脳皮質と比べ WT、A7 マウス共に XBP1s、CHOP、Dnajb9 及び BiP の発現量は再給餌による有意な変化を示さなかった (Fig. 45)。

以上の結果から、A7 マウスではアミロイド斑蓄積開始前より、特に大脳皮質において HFD を負荷した際に IRE1-XBP1s 経路に代表される小胞体ストレスの応答性が WT マウスに比べ低下していることが新たに示された。これは、HFD 負荷 A7 の中枢における小胞体ストレス反応の応答性低下の慢性的な持続と、A β 量増加による AD 病理増悪との関連性を示唆するものである。

第4章 考察

糖尿病様病態を生じた AD モデルマウスを用いて施行した本研究において、新たに以下の知見が得られた。

1、A7マウスに対するHFD負荷とIRS-2の欠損は共に糖尿病病態を生じたにもかかわらず、前者は脳におけるA β 量及びアミロイド斑蓄積を促進した一方、後者は抑制した。更に、IRS-2欠損A7マウスに対するHFD負荷は、糖尿病病態の増悪に加え脳におけるA β レベル及びアミロイド斑蓄積を促進した。遺伝的に誘導されたインスリン抵抗性ではなく、代謝負荷に伴うインスリン抵抗性がA β 病態促進と関連したことから、インスリン抵抗性はAD病理に直接的な影響を及ぼさない可能性が示唆された。

2、A7マウスに対するIRS-2欠損では、末梢の炎症性シグナルならびに小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量は変化しなかったが、一方、HFD負荷の際には増加を示し、これはIRS-2欠損A7マウスに対するHFD負荷の際も同様であった。これらの結果から、代謝負荷の際にインスリン抵抗性獲得過程で生じたストレス反応の活性が、AD病理促進に関与している可能性が示唆された。

3、WT及びA7マウスに対するHFD負荷により、A β 蓄積開始前の時期において中枢の小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量が増加し、WTマウスではその増加がより顕著であることが示された。この要因として、後述するHFD負荷による小胞体ストレス応答性の変化に着目した。

4、WT マウス及びA7 マウスのHFD 負荷群において、再給餌による急性代謝ストレス負荷により、中枢の小胞体ストレスシグナル分子の mRNA 発現量が WT マウスでは増加したが、A7 マウスでは有意な変化が見られなかった。この結果から、HFD 負荷 A7 マウスでは中枢の小胞体ストレス応答性が低下している可能性が新たに示唆された。

これらの結果に基づいて、2 型糖尿病が AD 病理を増悪させる分子メカニズムについて考察を行う。

4-1 インスリンシグナル障害が A β に及ぼす影響について

これまでに行われた大規模疫学研究から、2 型糖尿病が AD 発症のリスクとなることが示されているが (Ott *et al.*, 1999; Matsuzaki *et al.*, 2010; Ohara *et al.*, 2011)、糖尿病が AD 発症を促進する詳細な分子メカニズムについては未知の点が多く残されている。また、AD モデルマウスが野生型マウスに比してより強いインスリン抵抗性を示したとする報告も見られるが (Macdonald *et al.*, 2014)、そのメカニズムは明らかではない。このように、2 型糖尿病と AD の関係について様々な実験的・臨床的検討が行われてきたが、脳内のインスリンシグナルの変化と AD の病態、特に A β の蓄積メカニズムとの関係は不明である。そこで本研究では、2 型糖尿病により AD の病理が増悪する要因を *in vivo* で明らかにすることを目的に、HFD 負荷による代謝症候群・糖尿病誘発、または IRS-2 遺伝子欠損マウスという、インスリン抵抗性を示す 2 種類の糖尿病モデルマウスを、A β を蓄積する APP トランスジェニックマウスと交

配し、その病態を比較検討した。その結果、HFD 負荷 AD モデルマウス脳における A β 蓄積には、インスリンシグナルの低下は直接には関与していない可能性が示された。

4-1-1 HFD 負荷が末梢及び中枢のインスリンシグナルに与える影響について

まず、HFD 負荷がインスリンシグナルに及ぼす影響について考察を行いたい。本研究では、当研究室で作出した APP Tg マウスである A7 マウスに HFD を長期的に負荷することにより、末梢において糖尿病病態を示す糖尿病合併 AD モデルマウスを作出した (Fig. 7, 8)。

インスリンシグナル障害と A β 蓄積のメカニズムとの関係を直接的に解明するためには、HFD 負荷により中枢のインスリンシグナル活性に変化が生じているか否かを明らかにすることは必須である。序文で述べたとおり、これまでの報告から HFD 負荷 AD モデルマウスでは、A β 蓄積増加時期において空腹時に脳内の PI3K、Akt、GSK3 等のリン酸化の低下が観察されており、脳内インスリンシグナルの低下が A β を増加させる可能性も考察されている (Ho *et al.*, 2004)。インスリンは、血液脳関門中を構成する血管内皮に発現したインスリン受容体を介し、脳実質に取り込まれると想定されている (Baura *et al.*, 1993)。また、インスリン受容体 (IR) はインスリンの結合により活性化・自己リン酸化を起こし、細胞内シグナルを伝達する。本検討では、若齢の WT 及び A7 マウスの大脳皮質において末梢からのインスリン刺激により、HFD 群における IR リン酸化比率が ND 群に比べ顕著に低下していることを明らかに

した (Fig. 10)。序文でも述べたように、糖尿病病態を示す AD モデルマウスでは視床下部におけるインスリンシグナル異常が報告されているが (Takeda *et al.*, 2010)、他の脳部位におけるインスリンシグナルの変化については、過去に報告がなかった。本研究では若齢 AD モデルマウスの大脳皮質において、HFD 負荷により WT マウス同様にインスリン応答性が低下することを新たに示した。この月齢においては、大脳皮質の可溶性 A β 量は HFD 負荷により顕著に変化していないことから (Fig. 12A)、HFD 負荷により生じる大脳皮質のインスリン抵抗性は A β 量に依存せず、またアミロイド蓄積に先行して生じることが考えられた。脳は血液脳関門により血液と隔離されているため、末梢インスリン刺激に対して脳インスリン応答性が低下した原因としては、脳間質中へのインスリン移行性が低下している可能性、あるいは脳内の細胞自身がインスリン抵抗性を有している可能性の 2 つが考えられる。これまでに当研究室における検討から、HFD 負荷 A7 マウスでは末梢血管中から脳内へのインスリン移行性が低下していること、HFD 負荷を行ったマウス脳の急性スライスに対するインスリン刺激では脳細胞のインスリン応答性に変化は見られないことが示されている (山口一樹修士論文, not published)。しかし、いずれの可能性についても、今後より詳細な検討が必要である。

既報により、糖尿病病態を示す AD モデルマウスでは末梢からのインスリン刺激により、IR 下流のシグナル分子である Akt のリン酸化が視床下部で低下していることが報告されている (Takeda *et al.*, 2010)。本研究では、大脳皮質における Akt の Ser473 リン酸化についても検討したが、そもそも ND 群においてインスリン刺激による活性化上昇が WT、A7 マウス共に見

られなかった (data not shown) 。この原因としては、本研究において着目した大脳皮質では、インスリンの脳間質への移行が限定的であることから、インスリンシグナルの下流分子である IRS-1/2 や Akt 等のリン酸化の変動が小さく、シグナル抑制の有無が判断できなかった可能性も考えられる。更に、肝臓等の末梢のインスリン感受性組織に比して、脳では定常状態での Akt のリン酸化レベルが高い傾向にあることが既報により示唆されていることから (Takeda *et al.*, 2010) 、複数のシグナル経路からのインプットがあることで、刺激応答性が比較的小さい可能性も考えられる。このため、本モデルにおいて、IR の下流も含めた脳内インスリンシグナル全体がどの程度 HFD 負荷により抑制されたかについては、一般の代謝臓器を評価する場合と異なる検出系が必要である可能性もある。

4-1-2 HFD 負荷が A β 量に与える効果とその要因

これまで、複数の APP Tg マウスモデルを用いた研究において、HFD 負荷を行うことによって脳内の A β 蓄積が増加することが示されている (Ho *et al.*, 2004; Maesako *et al.*, 2012) 。本研究でも、HFD を負荷した高齢 A7 マウスでは、大脳皮質における A β 総量、特に不溶性 A β 量の増加及びアミロイド斑蓄積の増加が示され、その普遍性を支持する結果となった (Fig. 11B, 12) 。これと上述した脳内インスリン抵抗性の検討結果から、A7 マウスでは HFD 負荷により、末梢においてインスリン抵抗性が生じる時期から中枢でもインスリン応答性が低下しており、持続的な代謝負荷とインスリン抵抗性が、加齢に伴う A β 蓄積増加と関連してい

る可能性がこの段階では考えられた。

脳内の A β 量は、A β の産生、分解・排出 (クリアランス)、凝集の主に3つにより規定されると考えられている。当研究室ではこれまでに、HFD を負荷した A7 マウスでは月齢依存的に ISF 中 A β クリアランスの低下が起こることを、*in vivo* のマイクロダイアリス法により初めて明らかにしている (Wakabayashi *et al.*, 論文投稿中)。一方、これまでの報告により、培養細胞を用いた *in vitro* の検討ではインスリンシグナルの活性化は A β 分泌を増加させること (Gasparini *et al.*, 2001)、BACE1 を活性化すること (Costantini *et al.*, 2006)、GSK-3 α が γ 切断を亢進することなどが示されている (Phiel *et al.*, 2003)。これらの報告は、インスリンシグナルの活性亢進は A β 産生を増加させる方向に作用することを示唆するものである。そこで、A β の産生量を直接的に測定するため、*ex vivo* の急性脳スライスを用いた実験系を新たに確立し検討をしたところ、A7 マウスにおいて HFD 負荷による A β 産生量の変化は見られなかった (松井健太郎修士論文, not published)。以上の結果から、A7 マウスに HFD 負荷を行った際に脳内 A β 量が増加していることには、A β の産生亢進ではなくクリアランスの低下が大きく関与している可能性が考えられた。

A β のクリアランスの制御因子の1つとして、ミクログリアによる貪食が挙げられる。単離した培養ミクログリアを用いた検討では、月齢依存的に A β 取り込み能が低下する報告がなされていることから (Njie *et al.*, 2012)、HFD 負荷によりミクログリアの増殖能や貪食能に変化が生じるかは今後検討すべき課題と考えられる。更に、脳実質における凝集 A β の増加により、見かけ上のクリアランス速度が低下している可能性も考慮する必要がある (Cirrito *et al.*,

2003)。しかし、HFD 負荷により A β の半減期が延長した 9 か月齢において、脳のアミロイド蓄積はまだ形態学的には検出されていないこと、また A β 斑が皮質全域に蓄積する 22 か月齢においても A β クリアランス速度に低下が見られなかったとの観察結果も考え合わせると、HFD 負荷により見られた A β クリアランス低下は A β 斑の存在とは関係しない現象と考えられる (山口一樹修士論文, not published)。一方、HFD 負荷が A β 凝集能に与える影響は未だ不明であり、評価系の確立も含め今後の課題である。

4-1-3 IRS-2 の遺伝的障害がインスリンシグナルに与える影響について

IRS-2 欠損マウスでは末梢臓器、特にインスリンシグナルにおいて IRS-2 の機能が優位を占める肝臓ならびに膵 β 細胞において、インスリンシグナルが抑制されることが示されている (Kubota *et al.*, 2000)。本研究では、A7 マウスと IRS-2 欠損マウスを掛け合わせることで、全身性に IRS-2 を欠損する新たな糖尿病合併 AD モデルマウスを作出した (Fig. 13)。脳における IRS-2 の寄与について、これまでの報告により、脳特異的に IRS-2 を欠損させたマウスでは高齢において WT マウスと比べ体重増加や高インスリン血症、高血糖を示したことから、IRS-2 は脳のインスリン応答性に重要な役割を果たしていると考えられる (Taguchi *et al.*, 2007)。しかし、本研究において HFD 負荷 A7 マウスで行った、脳のインスリン受容体の活性化という指標では IRS-2 欠損によるインスリンシグナルへの影響は評価できないため、今後、IRS-2 の下流分子である PI3K や Akt 等のリン酸化を脳組織において直接的に評価

できる系を確立し、IRS-2 欠損マウスの脳内インスリン応答性の変化を明らかにする必要がある。

4-1-4 IRS-2 欠損が A β 量に与える効果とその要因

AD モデルマウスの 1 種である Tg2576 マウスと IRS-2 欠損マウスの交配により、IRS-2 の欠損により A β 斑蓄積が減少することが示されている (Killick *et al.*, 2009)。本研究では、15 か月齢の *Irs2*^{-/-}; A7 マウスにおいて、A7 マウスに比べ脳内 A β 蓄積の顕著な減少が観察された (Fig. 16)。この結果は、12 か月齢における *Irs2*^{-/-}; Tg2576 マウスの解析を行った結果とも合致するが (Killick *et al.*, 2009)、本検討では既報よりも更に高齢のマウスにおいて同様の結果を示した。Killick らは本研究で用いた IRS-2 欠損マウスとは異なる系統を用いているが、本研究と同じ系統を用いた検討では A β レベルの低下が低月齢でのみ観察されている (Freude *et al.*, 2009)。この結果は、遺伝的背景など複数の要因が A β 量に影響を与える可能性を示唆する点で、興味深い。

既報では、Tg2576 マウスにおける IRS-2 の欠損により、CTF α 及び CTF β の発現量に減少が見られたことに加え、BACE1 の活性は有意ではないものの減少傾向にあることが示されており、APP プロセッシングの低下が A β 量減少の原因である可能性を示唆している (Freude *et al.*, 2009)。一方、Tg2576 マウスで IRS-2 を欠損すると IDE がタンパクレベルで増加することも報告されている (Killick *et al.*, 2009)。しかし当研究室の検討では、*Irs2*^{-/-};

A7 マウスにおいて A β 産生量に変化は見られなかった (松井健太郎修士論文, not published)。また、IRS-2 を欠損した高齢の WT マウスにおいても、変異による凝集や蓄積の影響を受けない内在性の A β の産生・分泌量に関して有意な変化は見られなかった (松井健太郎修士論文, not published)。更に、*in vivo* マイクロダイアリス法を用いた検討により、A7 マウスは IRS-2 欠損の際に ISF 中の A β クリアランスに変化が見られないことを明らかにしている (data not shown)。以上の結果から、本検討において *Irs2* KO マウスで A β 量が減少したことには、A β 産生・クリアランス以外の要素が関与している可能性が高いと考えられる。これまでの報告により、IGF-1R をヘテロに欠損した AD モデルマウスでは、A β 蓄積の減少に加えよりコンパクトな状態で斑が蓄積し、A β オリゴマーに変化があることが示されている (Cohen *et al.*, 2009)。このことから、IRS-2 の欠損により A β の凝集能に変化が生じている可能性が考えられ、今後実験系の確立と同時に詳細な検討が課題となる。

4-1-5 HFD 負荷または IRS-2 欠損が認知機能に及ぼす影響について

本実験では、A β 量または A β 蓄積といった病理の評価を主眼に置いており、HFD 負荷または IRS-2 欠損が認知機能に及ぼす影響については検討を行っていない。この理由の一つに、遺伝子改変による AD モデル動物では、人為的脳損傷モデルや老化モデルに比べ行動異常が軽度であることが挙げられる (Takahashi., 2010)。しかし近年、AD モデルマウスに対する HFD 負荷は認知機能を低下させることが報告されており (Sah *et al.*, 2017)、A7

マウスにおいても HFD 負荷により認知機能が低下している可能性が考えられる。一方、脳特異的に IRS-2 を欠損させたマウスでは、認知機能が改善されることが報告されている (Irvine *et al.*, 2011)。本研究で用いたそれぞれの AD モデルマウスにおいて、A β 蓄積の増加または減少が認知機能の低下または改善を導くかどうかについては、今後の検討課題である。

4-1-6 *Irs2*^{-/-}; A7 マウスに対する代謝負荷の効果について

興味深いことに、本実験でみられた A β 蓄積に対する影響は HFD 負荷と IRS-2 欠損で相反する結果を示し、このメカニズムの解明はインスリンシグナル障害と AD 病態の関係を明らかにする上で極めて重要であると考えた。両モデルマウスでは共通してインスリン抵抗性が生じており、高血糖や高インスリン血症を呈していることから、インスリンシグナルの障害は AD 病理増悪の直接的原因ではない可能性を考えた。そこで、インスリン抵抗性と AD 病理との関係をより直接的に検討するため、新たに *Irs2*^{-/-}; A7 マウスに HFD を継続的に負荷した合併モデルマウスを新たに作出した (Fig. 17)。これまでに WT マウスを用いた検討により、肝臓に特異的な IRS-2 欠損マウスでは HFD 負荷により血糖値が増加し (Simmgen *et al.*, 2006)、*Irs2*^{+/-}マウスに対する HFD 負荷により体重、血中インスリン濃度、血糖値が増加するが、一方で膵臓 β 細胞の過形成は抑制されることが報告されている (Terauchi *et al.*, 2007)。しかし、全身性の *Irs2*^{-/-}マウスに対して長期的な代謝負荷が及ぼす影響について

は明らかにされていない。本研究では、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスにおいて HFD 負荷により加齢に伴い末梢のインスリン抵抗性が増悪することが示された (Fig. 18, 20)。更に、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスでは HFD 負荷により A β 蓄積開始時期に先立って A β 総量が増加することに加え、高齢ではアミロイド斑蓄積も有意に増加しており、AD 病理増悪が示唆された (Fig. 19, 22)。

これらの結果から、遺伝的なインスリン抵抗性を示す IRS-2 欠損 AD モデルマウスにおいても、HFD 負荷により糖尿病の病態が増悪するとともに A β の蓄積も増加を示したことから、インスリン抵抗性は A β の量及び蓄積に直接関与しない可能性が新たに示唆された。そこで、A β 蓄積に影響を及ぼす原因として、後述するインスリン抵抗性獲得過程の上流で生じるストレス反応に着目した。以下、ストレス反応 (特に小胞体ストレス反応) が糖尿病病態と A β 蓄積の促進を繋ぐ役割を果たしている可能性について考察を行いたい。

4-2 ストレス反応亢進が糖尿病病態と AD 病理に及ぼす影響について

序文で述べたとおり、2 型糖尿病の主要な原因であるインスリン抵抗性が発症する機序として、肥大化した脂肪組織において炎症性シグナル・小胞体ストレスシグナル・酸化ストレスシグナルの活性が亢進することが知られている (Hotamisligil *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 2004; Ozcan *et al.*, 2004)。また中枢においても、代謝を司る視床下部に関連する研究が進んでおり、視床下部の神経細胞における炎症性シグナル (IKK-NF- κ B 経路) の活性化ならびに小胞体ストレスシグナルの亢進により、視床下部神経細胞のインスリン抵抗性を引き

起こすことが示されている (Zhang *et al.*, 2008)。これらの既報と本研究における結果を踏まえ、HFD 負荷により A β 蓄積促進が起こるのは、両モデルで共通して見られるインスリン応答性の低下や高インスリン血症、高血糖が直接の原因ではなく、その上流で引き起こされている代謝ストレス、すなわち炎症性シグナルや小胞体ストレス、酸化ストレスの亢進が関与しているという仮説を立てた。

これまでに炎症性シグナル及び小胞体ストレスシグナルと AD 病理との関連を示した報告として、ラットの海馬ニューロンを用いた研究により、小胞体ストレスの誘導で JNK3 が活性化されると APP のエンドサイトーシスが亢進し、それにより A β ペプチドの産生が亢進されて更なる JNK3 産生が促進されるという相互作用が示されている (Yoon *et al.*, 2012)。更に、A β オリゴマーのマウス脳内への投与により、末梢における耐糖能異常及び視床下部における炎症性反応の亢進が報告されている (Clarke *et al.*, 2015)。しかし、2 型糖尿病と AD 双方を繋ぐメカニズムとして、炎症性、小胞体ストレスならびに酸化ストレスシグナルに着目した報告はない。そこで本研究では、IRS-2 欠損ならびに代謝負荷時の炎症性、小胞体ストレスならびに酸化ストレスシグナルが AD 病理に及ぼす影響について検討した。その結果、A β 蓄積増加のメカニズムには、代謝負荷によるストレス反応、特に小胞体ストレス反応の応答性低下が関与している可能性が新たに示唆された。

4-2-1 代謝負荷及び IRS-2 欠損が末梢のストレス反応に及ぼす影響について

本研究ではまず A7 マウス及び *Irs2*^{-/-};A7 マウスについて、代謝負荷により炎症性、小胞体ストレスならびに酸化ストレスのシグナル亢進が報告されている脂肪組織において、代表的な炎症性及び小胞体ストレス関連シグナル分子の mRNA 発現量を qRT-PCR 法により検討した。これまでの報告により、*in vitro* による検討から膵 β 細胞では IRS-2 を欠損させても XBP1s のタンパク発現量ならびに IRE1 のリン酸化比率は変化しないことが示されているが (Takatani *et al.*, 2016)、IRS-2 欠損による *in vivo* での炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子の発現量の変化は未だ不明である。本研究では、高齢の HFD 負荷 A7 マウスにおいて TNFα の発現量が顕著に増加することが示された一方 (Fig. 23)、*Irs2*^{-/-}; A7 マウスでは TNFα の発現量に変化は認められなかった (Fig. 23)。しかし *Irs2*^{-/-}; A7 マウスに HFD を負荷した結果、TNFα の顕著な発現量増加が示された (Fig. 24)。更に、CHOP 及び XBP1s の標的遺伝子 (target gene) である BiP に関しても、これらの結果と同様の傾向が示された (data not shown, Fig. 24)。以上の結果より、IRS-2 欠損ではなく HFD 負荷によつてのみ末梢の炎症性ならびに小胞体シグナルの活性が亢進することが示され、インスリンシグナル障害は直接炎症反応または小胞体ストレス反応を引き起こすことはないと考えた。

一方、若齢の WT マウスにおける HFD 負荷による末梢の炎症反応の活性変化も検討した。その結果、脂肪組織において HFD 負荷による JNK のタンパクリン酸化の有意な増加、及び、TNFα 前駆体のタンパク発現量の有意な減少を確認した (Fig. 26)。序文で述べたとおり、JNK は炎症性サイトカインの下流で活性化すると同時に、IRS のセリン残基をリン酸化することで IR の作用によるチロシンリン酸化を阻害し、インスリン抵抗性誘発にも関与してい

ることが知られている (Ozcan *et al.*, 2004)。また TNF α は脂肪細胞より前駆体タンパク質である膜結合型 TNF α として産生されたのち、TNF α 変換酵素 (TACE) により切断をうけ、可溶性タンパク質となり下流の JNK 経路を活性化させる (Schlöndorff *et al.*, 1999)。このことから、若齢マウスの末梢では HFD 負荷により、炎症性シグナルの中でもインスリン抵抗性と関係性の深い TNF α -JNK 経路の活性が顕著に亢進されたと考えた。

4-2-2 代謝負荷が中枢の炎症性及び小胞体ストレスシグナルの分子レベルに与える影響

上記の結果を踏まえ、本研究では AD 病理とより密接に関連する中枢における炎症性、小胞体ストレスシグナル分子の活性レベルを評価した。

まず、代謝負荷が中枢のストレスシグナルに及ぼす影響を明らかにするため、若齢の WT 及び A7 マウスの脳内において HFD 負荷が炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル分子の活性に与える影響を検討した。これまでの報告により、慢性的な代謝負荷で視床下部の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル反応が亢進することが示されている (Zhang *et al.*, 2008)。本研究では6か月齢で、A7 マウスにおける視床下部の eIF2 α のリン酸化、ならびに WT マウス、A7 マウスにおける海馬の XBP1s の mRNA 発現量の HFD 負荷による有意な増加を示した (Fig. 29, 36)。しかし、その他の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル分子に関して、5-6か月齢の WT マウス及び A7 マウスでは、視床下部及び海馬において既報から予想されるような、HFD 負荷による活性上昇は観察されなかった (Fig. 27-30, 36)。この原

因として、5-6 か月齢では十分な脳内のストレス反応亢進がまだ生じていなかった可能性が考えられる。更に、マウスの飼育環境や給餌に用いた HFD の組成がタンパク質発現量変化に影響を及ぼす可能性も否定できない。

続けて本研究では、AD モデルマウスでストレス反応が増悪する可能性を検証するため、WT マウスと A7 マウスにおけるストレスシグナル分子の活性を比較検討した。これまでの報告により、AD 患者脳及び APP Tg マウス脳では、小胞体ストレスシグナル分子である IRE1 及び XBP1s の活性が、健常人または WT マウスと比して亢進していることが示されている (Duran-Anoitz *et al.*, 2017)。しかし本検討においては、9 か月齢の WT マウスと A7 マウスの間で ND 群における海馬の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子の発現量に有意な差は見られなかった (Fig. 37)。この原因として、検討に用いた AD モデルマウスの種類が関与している可能性も考えられる。近年複数の AD モデルマウスを用いた検討により、APP ではなく PS1 の過剰発現こそが小胞体ストレス反応を亢進させるとの報告もされた (Hashimoto *et al.*, 2018)。本検討で用いている A7 マウスはヒト APP を過剰発現しているものの、PS1 の発現量は変化させていない。従って、PS1 を過剰発現させていない AD モデルマウスは、WT マウスと比べ炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル分子の mRNA 発現量に変化しないこともありうると思われ。

更に本研究では、WT マウスと AD モデルマウスにおいて HFD 負荷による中枢のストレスシグナル分子の活性変化に違いが見られるか解明するため、WT マウスと A7 マウスの HFD 群におけるストレスシグナルレベルを比較検討した。その結果、海馬における小胞体ストレス

シグナル分子の HFD 負荷による発現量の上昇が、 $A\beta$ 蓄積開始前である 9 か月齢の A7 マウスでは WT マウスに比べ抑制されていることを新たに明らかにした (Fig. 37)。そしてこの原因として、後述する代謝ストレスの応答性の低下に着目した。以下、AD モデルマウスの中脳における HFD 負荷と代謝ストレス応答性の関係について考察を行いたい。

本研究では、加齢に伴うより長期的な代謝負荷が中枢のストレス反応へ及ぼす影響を明らかにするため、高齢の WT マウスにおいて HFD 負荷により炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルの活性に変化が生じるかどうか併せて検討した。しかし、18 か月齢において、HFD 負荷による視床下部及び海馬の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル活性の変化は見られなかった (Fig. 34, 38)。これまでの報告により、高齢者では $TNF\alpha$ や $IL-6$ などの炎症性サイトカインが血中で慢性的に増加していることが示されているほか (Paolisso *et al.*, 1998; Ferrucci *et al.*, 2005)、高齢マウスの脳内では $TNF\alpha$ や $IL-1\beta$ の発現量が若齢マウスに比べ増加していることが示されている (Stichel *et al.*, 2007)。このことから、高齢マウスでは加齢に伴う末梢または中枢の炎症性ならびに小胞体ストレスシグナル活性の亢進が影響を及ぼし、WT マウスの中脳でも HFD 負荷による効果がマスクされてしまっている可能性も考えられた。

4-3 代謝負荷が炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルの応答性に及ぼす影響

炎症性反応や小胞体ストレス反応は肥満に伴い末梢組織で亢進し、インスリン抵抗性発

症の原因となることから、これらの反応を抑制することがインスリンシグナル障害の改善、ひいては糖尿病の改善につながると考えられてきた (Yoon *et al.*, 2012)。しかし近年、*in vitro* 及び *in vivo* の検討により、IKK β や XBP1s の肝臓における活性化がグルコース恒常性の改善につながるとの報告がなされた (Liu *et al.*, 2016)。この報告では、急性の生理的代謝ストレスを負荷することにより、肝臓における XBP1s のタンパク発現量及び IKK β のリン酸化比率が WT マウスで顕著に上昇するのに対し、遺伝性肥満マウスではそれが見られないことを示しており、糖尿病の増悪に肝臓における炎症反応または小胞体ストレス反応の応答性低下が関与している可能性を新たに示唆している。応答性が低下する原因として、IKK β の活性化により XBP1s がリン酸化され、核内に移行することが関与している可能性が示唆されているが、具体的なメカニズムに関しては不明な点が多い。また、XBP1s 及び IKK β 以外の他のシグナル分子に関しても応答性に変化が見られるのか、また脳内において炎症性ならびに小胞体ストレスシグナルの応答性に変化が生じているかどうかは未だ解明されていない。

そこで本研究では、絶食後の再摂食による生理的代謝ストレスを用い、HFD 負荷によるマウスの中枢及び末梢臓器における炎症反応ならびに小胞体ストレス反応の応答性変化を評価する実験系を確立した。この実験系を用いた条件検討により、HFD 負荷により肝臓で eIF2 α や IRE1 の応答性が僅かに抑制されるが、一方、JNK の応答性は変化しないことを新たに示した (Fig. 39)。この結果より、本実験系は末梢に関して炎症反応よりも小胞体ストレス反応、とりわけその下流におけるシグナル分子の応答性評価に適していると考えられた。同時に視床下部と大脳皮質では、再摂食の際に小胞体ストレスシグナル分子の中でも

XBP1s ならびにその target gene である BiP、Herpud1 の mRNA 発現量は顕著に増加した一方、XBP1s の target gene である Dnajb9 及び Pdia3 では変化が見られなかった (Fig. 41, 42)。このことから、脳における小胞体ストレスシグナル応答性の変化は分子により偏りがあると考えられた。また絶食状態では、ND 群に比して HFD 群において定常状態で見られたような XBP1s の mRNA 発現量の増加は末梢、中枢共に見られなかった (Fig. 39-42)。この原因として、24 時間の絶食により mRNA 発現量が ND 群、HFD 群共に大きく低下していることが関係している可能性が考えられる。

本実験系を用いた検討では、6 か月齢 WT マウスの HFD 群では海馬において再摂食により XBP1s の発現量に増加傾向が見られたことに加え (Fig. 45)、大脳皮質では XBP1s ならびに BiP の発現量に有意な増加が見られた (Fig. 44)。一方 A7 マウスでは、海馬ならびに大脳皮質において HFD 負荷による有意な小胞体ストレス応答性の変化が見られなかった (Fig. 44, 45)。これらの結果は、A7 マウスでは中枢、特に大脳皮質において HFD 負荷により小胞体ストレス反応の応答性が低下していることを示唆するものであり、定常状態における 9 か月齢の WT 及び A7 マウスで、HFD 負荷による脳内の小胞体ストレスシグナル分子の発現量変化を比較検討した先述の結果を裏付けるものと考えられる (Fig. 37)。以上の結果から、HFD 負荷 A7 マウスでは中枢における小胞体ストレス反応の特異的経路における応答性低下が慢性的に持続した結果、A β 量増加による AD 病理増悪が生じる可能性が新たに示唆された。

小胞体ストレス応答性の低下がアミロイド斑蓄積の亢進につながるメカニズムとして、ミクロ

グリアの関与が注目される。先述したように、単離した培養マイクログリアを用いた検討では月齢依存的に A β 取り込み能が低下する報告がなされており (Njie *et al.*, 2012)、また当研究室ではこれまでに、HFD を負荷した A7 マウスでは月齢依存的に ISF 中 A β クリアランスの低下が起こることを *in vivo* のマイクロダイアリシス法により初めて明らかにしている (山口一樹修士論文, not published)。このことから、HFD 負荷による小胞体ストレス応答性の低下がマイクログリアによる A β の貪食作用を抑制した結果、A β 量の増加、アミロイド斑蓄積促進を引き起こしている可能性も考えられる。以上のことから、HFD を負荷した AD モデルマウス脳より単離したマイクログリアを用いて、mRNA レベルで小胞体ストレスシグナル分子に影響が見られるか検出を行うことが今後必要である。

WT マウスの中枢において、再給餌による mRNA レベルの変化が XBP1s と BiP でより顕著であったことは、条件検討で得られた結果と合致しており、HFD 負荷の際には小胞体ストレスシグナルの中でも特定の経路で応答性の低下が生じている可能性を裏付けるものと考えた。また、肝臓では HFD を負荷した WT、A7 マウス共に再摂食により同程度まで mRNA 発現量が増加していたことから (Fig. 43)、HFD 負荷 A7 マウスでは末梢に比べ中枢の方がより小胞体ストレス応答性が低下している可能性が考えられた。しかし、脂肪組織では定常状態での mRNA 発現量が A7 マウスでは WT マウスに比して HFD 負荷の際に抑制されていたことから (Fig. 35)、末梢では臓器特異的に小胞体ストレス応答性の低下が生じている可能性も否定できない。今後、各末梢臓器における小胞体ストレス応答性を比較検討することは必要となる課題である。

4-4 小胞体ストレス反応の抑制が AD 病理を改善させる可能性について

本研究では、HFD を負荷した AD モデルマウス、全身的に IRS-2 を欠損する AD モデルマウス、更にはこれらを組み合わせた合併 AD モデルマウスを用いた検討を行った。それにより得られた結果は、脳における小胞体ストレス反応の応答性の改善が AD 発症に対しても有効に働く可能性を示唆するものである。この可能性をより明確に検証するためには、今後 *in vivo* での介入による AD 病態の低減を示すことが重要である。小胞体ストレスを低減する薬剤としては、ケミカルシャペロンが広く知られている。

ケミカルシャペロンは、タンパク質高次構造の形成や安定化に関わる低分子化合物の総称であり、立体構造異常により細胞内で不安定となっている変異酵素分子に結合し、安定な複合体としてリソソームに運ばれる (Rajan *et al.*, 2011)。代表的なものとして、4-phenyl butyric acid (PBA) や trimethylamine N-oxide (TMAO)、ジメチルスルホキシドなどに加え、内在性の胆汁酸や胆汁酸誘導体である ursodeoxycholic acid (UDCA) や tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) が挙げられ、それぞれ小胞体機能を向上させる作用を有している。

これらの中でも特に PBA または TUDCA に関しては、糖尿病様モデル動物に対し 2 週間から 4 週間にわたる長期的な腹腔内投与を施すことにより、体重や血糖値の低下、インスリン感受性の改善といった代謝指標の改善が見られることに加え (Guo *et al.*, 2015; Vettorazzi *et al.*, 2017)、肝臓または脂肪組織における小胞体ストレスシグナル分子ならび

に炎症性シグナル分子の mRNA 発現量の有意な減少が確認されている (Kawasaki *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2015)。しかし、ケミカルシャペロンの投与が脳内で代謝負荷に伴う小胞体ストレス反応低下や炎症反応に対しても改善効果を示すのかについては、未だ明らかとなっておらず、現在検討を進めているところである。

ケミカルシャペロンのほかにも、小胞体ストレスシグナル分子を直接制御する化合物の開発も盛んに進められている。代表的なものとして、PERK 阻害剤である GSK2606414 が挙げられる。これまでに、*in vivo* ならびに *in vitro* の検討から、この化合物は神経保護作用を有しプリオン病やパーキンソン病といった神経変性疾患の進行を抑制する効果があることが報告されており (Moreno *et al.*, 2013; Celardo *et al.*, 2016)、AD 病理に対する治療効果が期待される。

本研究ではこれまで、HFD 負荷 AD モデルマウスにおける炎症性及び小胞体ストレス反応に焦点を当て、検討を行ってきた。IRS-2 欠損 AD モデルマウスの結果を考慮すると、上述したメカニズムが成り立っていると仮定した場合、炎症性ならびに小胞体ストレス反応による A β 蓄積促進作用が、インスリン作用の低下に伴う A β 蓄積抑制作用を顕著に上回っていることが考えられる。ただし序文で述べたように、糖尿病病態においてはこれらの代謝ストレス反応の亢進に加え、脂肪細胞から分泌されるレプチンやアディポネクチンの発現量が増加並びに低下することが知られている。これまでの報告により、AD モデルマウスに対する慢性的なレプチン投与は A β 量を減少させることが示されていることに加え (Fewlass *et al.*,

2004)、アディポネクチンを欠損させた高齢マウスにおいてはA β 蓄積の増加や認知機能の低下が示されている (Ng *et al.*, 2016)。したがって、炎症性及び小胞体ストレスシグナルとこれらのホルモンが協調して反応した結果により、A β 蓄積が促進されている可能性も考えられる。ADモデルマウスにおいて、HFD負荷によりレプチンやアディポネクチンの発現量が変化するのについては、今後の検討課題である。

一方、*in vitro* 及び *in vivo* の検討により、A β オリゴマーが IRE1 や eIF2 α の活性を亢進させることがこれまでに示されている (Lourenco *et al.*, 2013) ほか、線維化 A β による刺激をミクログリア細胞に与えることにより NLRP3 が活性化されることが報告されている (Halle *et al.*, 2008)。これらの報告から、A β と小胞体ストレスシグナルは相互作用している可能性も考えられるが、A β がどのような経路を介して小胞体ストレス反応を誘発するのかについては、今後更なる検討が必要である。

4-5 結語

本研究において私は、HFD負荷ADモデルマウス脳におけるA β 蓄積には、インスリンシグナルの活性低下よりも小胞体ストレス反応に対する応答性低下が関与している可能性を示した。そして、この小胞体ストレス反応に対する応答性の改善により、A β 蓄積が抑制できるかどうかの検討が今後の課題である。

引用文献

Aigner L, Arber S, Kapfhammer JP, Laux T, Schneider C, Botteri F, Brenner HR, Caroni P.

Overexpression of the neural growth-associated protein GAP-43 induces nerve sprouting in the adult nervous system of transgenic mice. *Cell*. **83**: 269–78 (1995)

Arriagada P, Growdon J, Hedley-Whyte E, Hyman B. Neurofibrillary tangles but not senile

plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. **42**: 631–9 (1992)

Asami-Odaka A, Ishibashi Y, Kikuchi T, Kitada C, Suzuki N. Long amyloid beta-protein

secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry*. **34**: 10272–8 (1995)

Baskin DG, Figlewicz Lattemann D, Seeley RJ, Woods SC, Porte D Jr, Schwartz MW.

Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res*. **848**: 114-23

Baura GD, Foster DM, Porte D, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW. Saturable

transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. *J. Clin. Invest*. **92**: 1824–1830 (1993)

Borchelt D, Thinakaran G, Eckman C, Lee M, Davenport F, Ratovitsky T, Prada C, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt H, Wang R, Seeger M, Levey A, Gandy S, Copeland N, Jenkins N, Price D, Younkin S, Sisodia S. Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin 1 Variants Elevate A β 1-42/1-40 Ratio In Vitro and In Vivo. *Neuron*. **17**: 1005-1013 (1996)

Borchelt DR, Ratovitski T, van Lare J, Lee MK, Gonzales V, Jenkins N a, Copeland NG, Price DL, Sisodia SS. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*. **19**: 939-45 (1997)

Burns JM, Honea RA, Vidoni ED, Hutfles LJ, Brooks WM, Swerdlow RH. Insulin is differentially related to cognitive decline and atrophy in Alzheimer's disease and aging. *Biochim Biophys Acta*. **1822**: 333-9 (2012)

Buxbaum J, Liu K, Luo Y, Slack J, Stocking K, Peschon J, Johnson R, Castner B, Cerretti D, Black R. Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem*. **273**: 27765-27767 (1998)

Celardo I, Costa AC, Lehmann S, Jones C, Wood N, Mencacci NE, Mallucci GR, Loh SH, Martins LM. Mitofusin-mediated ER stress triggers neurodegeneration in pink1/parkin models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* **23**: e2271 (2016)

Chen G, Chen K, Knox J, Inglis J, Bernard A, Martin S, Justice A, McConlogue L, Games D, Freedman S, Morris R. A learning deficit related to age and β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* **408**: 975–979 (2000)

Cirrito JR, May PC, O'Dell M a, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, Audia JE, Nissen JS, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB, Holtzman DM. In vivo assessment of brain interstitial fluid with microdialysis reveals plaque-associated changes in amyloid-beta metabolism and half-life. *J. Neurosci.* **23**: 8844–53 (2003)

Clarke JR, Lyra E Silva NM, Figueiredo CP, Frozza RL, Ledo JH, Beckman D, Katashima CK, Razolli D, Carvalho BM, Frazão R, Silveira MA, Ribeiro FC, Bomfim TR, Neves FS, Klein WL, Medeiros R, LaFerla FM, Carvalheira JB, Saad MJ, Munoz DP, Velloso LA, Ferreira ST, De Felice FG. Alzheimer-associated A β oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med.* **7**: 190–210 (2015)

- Cohen E, Paulsson JF, Blinder P, Burstyn-Cohen T, Du D, Estepa G, Adame A, Pham HM, Holzenberger M, Kelly JW, Masliah E, Dillin A. Reduced IGF-1 signaling delays age-associated proteotoxicity in mice. *Cell*. **139**: 1157–69 (2009)
- Costantini C, Scrabble H, Puglielli L. An aging pathway controls the TrkA to p75NTR receptor switch and amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*. **25**: 1997–2006 (2006)
- Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. **103**: 239–52 (2000)
- de la Monte SM, Tong M, Lester-Coll N, Plater M Jr, Wands JR. Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. **10**: 89–109 (2006)
- De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. **6**: 99–107 (2010)
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem*. **269**: 8445–54 (1994)
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S, Mazzoleni G, Merlin M, Giovagnoli AR, Prioni S, Erbetta A, Falcone C, Gobbi M, Colombo L, Bastone A, Beeg M, Manzoni C, Francescucci B, Spagnoli A, Cantù L, Del Favero E, Levy E, Salmona M, Tagliavini

F. A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*. **323**: 1473–7 (2009)

Duran-Aniotz C, Cornejo VH, Espinoza S, Ardiles ÁO, Medinas DB, Salazar C, Foley A, Gajardo I, Thielen P, Iwawaki T, Scheper W, Soto C, Palacios AG, Hoozemans JJM, Hetz C. IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol*. **134**: 489–506 (2017)

Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, Graff-Radford N, Hinder P, Yager D, Zenk B, Refolo LM, Prada CM, Younkin SG, Hutton M, Hardy J. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet*. **6**: 2087–9 (1997)

Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, Guralnik JM, Longo DL. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. **105**: 2294-9 (2005)

Fewlass DC, Noboa K, Pi-Sunyer FX, Johnston JM, Yan SD, Tezapsidis N. Obesity-related leptin regulates Alzheimer's Abeta. *FASEB J*. **18**: 1870-8 (2004)

Freude S, Hettich MM, Schumann C, Stöhr O, Koch L, Köhler C, Udelhoven M, Leeser U, Müller M, Kubota N, Kadowaki T, Krone W, Schröder H, Brüning JC, Schubert M.

Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **23**: 3315–24 (2009)

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* **114**: 1752–61 (2004)

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature.* **373**: 523–527 (1995)

Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J. Neurosci.* **21**: 2561–70 (2001)

Guo Q, Shi Q, Li H, Liu J, Wu S, Sun H, Zhou B. Glycolipid Metabolism Disorder in the Liver of Obese Mice Is Improved by TUDCA via the Restoration of Defective Hepatic Autophagy. *Int J Endocrinol.* (2015)

Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* **9**: 857–65 (2008)

Hardy J, Higgins G. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* (80-.).
256: 184–5 (1992)

Hardy J, Selkoe D. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on
the road to therapeutics. *Science* (80-.). **297**: 353–356 (2002)

Hashimoto S, Ishii A, Kamano N, Watamura N, Saito T, Ohshima T, Yokosuka M, Saido TC.
Endoplasmic reticulum stress responses in mouse models of Alzheimer's disease:
Overexpression paradigm versus knockin paradigm. *J Biol Chem.* **293**: 3118–3125
(2018)

Heneka MT, Kummer MP, Stutz A, Delekate A, Schwartz S, Vieira-Saecker A, Griep A, Axt
D, Remus A, Tzeng TC, Gelpi E, Halle A, Korte M, Latz E, Golenbock DT. NLRP3 is
activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature.*
493: 674–8 (2013)

Ho L, Qin W, Pompl PN, Xiang Z, Wang J, Zhao Z, Peng Y, Cambareri G, Rocher A, Mobbs
C V, Hof PR, Pasinetti GM. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a
transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J.* **18**: 902–4 (2004)

Hori Y, Hashimoto T, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K, Condron MM, Tsubuki S,
Saido TC, Teplow DB, Iwatsubo T. The Tottori (D7N) and English (H6R) familial

Alzheimer disease mutations accelerate Abeta fibril formation without increasing protofibril formation. *J Biol Chem.* **282**: 4916–23 (2007)

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **95**: 2409–2415 (1995)

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative Memory Deficits, A β Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science (80-.).* **274**: 7–10 (1996)

Irvine EE, Drinkwater L, Radwanska K, Al-Qassab H, Smith MA, O'Brien M, Kielar C, Choudhury AI, Krauss S, Cooper JD, Withers DJ, Giese KP. Insulin receptor substrate 2 is a negative regulator of memory formation. *Learn Mem.* **18**: 375–83 (2011)

Ishiguro K, Shiratsuchi A, Sato S, Omori A, Arioka M, Kobayashi S, Uchida T, Imahori K. Glycogen synthase kinase 3 β is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filaments. *FEBS Lett.* **325**: 167–72 (1993)

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of AP42(43) and AP40 in Senile Plaques with End-Specific AP Monoclonals: Evidence That an Initially D, posited Species Is AP42(43). *Neuron.* **13**: 45–53 (1994)

Janson J, Laedtke T, Parisi JE, O'Brien P, Petersen RC, Butler PC. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes*. **53**: 474–81 (2004)

Jarrett J, Berger E, Lansbury P. The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. **32**: 4694–7 (1993)

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson P V, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jönsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. **488**: 96–9 (2012)

Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D. Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *EMBO J*. **15**: 1542–7 (1996)

Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep*. **2** (2012)

Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, Takatori S, Ouchi Y, Ikeuchi T, Makino M, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol Med.* **10**: e8184 (2018)

Killick R, Scales G, Leroy K, Causevic M, Hooper C, Irvine EE, Choudhury AI, Drinkwater L, Kerr F, Al-Qassab H, Stephenson J, Yilmaz Z, Giese KP, Brion J-P, Withers DJ, Lovestone S. Deletion of *Irs2* reduces amyloid deposition and rescues behavioural deficits in APP transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386**: 257–62 (2009)

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol.* **24**: 7130–9 (2004)

Koike H, Tomiyama S, Sorimachi H, Saido T, Maruyama K, Okuyama A, Fujisawa-Sehara A, Ohno S, Suzuki K, Ishiura S. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α -secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem. J.* **343**: 371–375 (1999)

Könner AC, Janoschek R, Plum L, Jordan SD, Rother E, Ma X, Xu C, Enriori P, Hampel B, Barsh GS, Kahn CR, Cowley MA, Ashcroft FM, Brüning JC. Insulin action in

AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* **5**: 438–49 (2007)

Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes.* **49**: 1880–9 (2000)

Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab.* **13**: 294–307 (2011)

Kumar-Singh S, De Jonghe C, Cruts M, Kleinert R, Wang R, Mercken M, De Strooper B, Vanderstichele H, Löfgren A, Vanderhoeven I, Backhovens H, Vanmechelen E, Kroisel PM, Van Broeckhoven C. Nonfibrillar diffuse amyloid deposition due to a

gamma(42)-secretase site mutation points to an essential role for N-truncated A beta(42) in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* **9**: 2589–98 (2000)

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 3922–7 (1999)

Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X, Frosch MP, Selkoe DJ. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron.* **40**: 1087–93 (2003)

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano D, Oshima J, Pettingell W, Yu C, Jondro P, Schmidt S, Wang K. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (80-.).* **269**: 973–7 (1995)

Li R, Lindholm K, Yang L, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y. Amyloid β peptide load is correlated with increased β -secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *PNAS.* **101**: 3632–7 (2004)

Liu J, Ibi D, Taniguchi K, Lee J, Herrema H, Akosman B, Mucka P, Salazar Hernandez MA, Uyar MF, Park SW, Karin M, Ozcan U. Inflammation Improves Glucose Homeostasis through IKK β -XBP1s Interaction. *Cell*. **167**: 1052–1066 (2016)

Lourenco MV, Clarke JR, Frozza RL, Bomfim TR, Forny-Germano L, Batista AF, Sathler LB, Brito-Moreira J, Amaral OB, Silva CA, Freitas-Correa L, Espírito-Santo S, Campello-Costa P, Houzel JC, Klein WL, Holscher C, Carvalheira JB, Silva AM, Velloso LA, Munoz DP, Ferreira ST, De Felice FG. TNF- α mediates PKR-dependent memory impairment and brain IRS-1 inhibition induced by Alzheimer's β -amyloid oligomers in mice and monkeys. *Cell Metab*. **18**: 831-43 (2013)

Macdonald IR, DeBay DR, Reid GA, O'Leary TP, Jollymore CT, Mawko G, Burrell S, Martin E, Bowen CV, Brown RE, Darvesh S. Early detection of cerebral glucose uptake changes in the 5XFAD mouse. *Curr Alzheimer Res*. **11**: 450–60 (2014)

Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Asada M, Watanabe K, Hayashida N, Ihara M, Ito H, Shimohama S, Kihara T, Kinoshita A. Environmental enrichment ameliorated high-fat diet-induced A β deposition and memory deficit in APP transgenic mice. *Neurobiol. Aging*. **33**: 1011.e11–e23 (2012)

- Matsuzaki T, Sasaki K, Tanizaki Y, Hata J, Fujimi K, Matsui Y, Sekita A, Suzuki S, Kanba S, Kiyahara Y, Iwaki T. Insulin resistance is associated with the pathology of Alzheimer disease The Hisayama Study. *Neurology*. **75**: 764–70 (2010)
- Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. **330**: 1774 (2010)
- Moreno JA, Halliday M, Molloy C, Radford H, Verity N, Axten JM, Ortori CA, Willis AE, Fischer PM, Barrett DA, Mallucci GR. Oral treatment targeting the unfolded protein response prevents neurodegeneration and clinical disease in prion-infected mice. *Sci Transl Med*. **5**: 206ra138 (2013)
- Mulder S, van der Flier W, Verheijen J, Mulder C, Scheltens P, Blankenstein M, Hack C, Veerhuis R. BACE1 activity in cerebrospinal fluid and its relation to markers of AD pathology. *J. Alzheimer's Dis*. **20**: 253–260 (2010)
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L A. Pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. **1**: 345–7 (1992)

Ng RC, Cheng OY, Jian M, Kwan JS, Ho PW, Cheng KK, Yeung PK, Zhou LL, Hoo RL, Chung SK, Xu A, Lam KS, Chan KH. Chronic adiponectin deficiency leads to Alzheimer's disease-like cognitive impairments and pathologies through AMPK inactivation and cerebral insulin resistance in aged mice. *Mol Neurodegener.* **11**: 71 (2016)

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Sten C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci.* **4**: 887–93 (2001)

Njie E, Boelen E, Stassen F, Steinbusch H, Borchelt D, Streit W. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol. Aging.* **33**: 195.e1–195.e12 (2012)

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, Laferla FM. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron.* **39**: 409–421 (2003)

- Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S, Kiyohara Y. Glucose tolerance status and risk of dementia in the community The Hisayama Study. *Neurology*. **77**: 1126–34 (2011)
- Otoda T, Takamura T, Misu H, Ota T, Murata S, Hayashi H, Takayama H, Kikuchi A, Kanamori T, Shima KR, Lan F, Takeda T, Kurita S, Ishikura K, Kita Y, Iwayama K, Kato K, Uno M, Takeshita Y, Yamamoto M, Tokuyama K, Iseki S, Tanaka K, Kaneko S. Proteasome dysfunction mediates obesity-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes*. **62**: 811–24 (2013)
- Ott A, Stolk R, Harskamp F Van, Pols H, Hofman A, Breteler M. Diabetes mellitus and the risk of dementia The Rotterdam Study. *Neurology*. **53**: 1937–42 (1999)
- Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG Jr, Ozcan U. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab*. **7**: 35-51 (2009)
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. **306**: 457-61 (2004)

- Paolisso G, Rizzo MR, Mazziotti G, Tagliamonte MR, Gambardella A, Rotondi M, Carella C, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Advancing age and insulin resistance: role of plasma tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol.* **275**: E294-9 (1998)
- Paresce DM, Ghosh RN, Maxfield FR. Microglial cells internalize aggregates of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein via a scavenger receptor. *Neuron.* **17**: 553-65 (1996)
- Pérez A, Morelli L, Cresto J, Castaño E. Degradation of soluble amyloid beta-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains. *Neurochem Res.* **25**: 247-255 (2000)
- Pete G, Fuller CR, Oldham JM, Smith DR, D'Ercole AJ, Kahn CR, Lund PK. Postnatal growth responses to insulin-like growth factor I in insulin receptor substrate-1-deficient mice. *Endocrinology.* **140**: 5478-87 (1999)
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3 alpha regulates production of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *Nature.* **423**: 435-9 (2003)
- Rajan RS, Tsumoto K, Tokunaga M, Tokunaga H, Kita Y, Arakawa T. Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Curr Med Chem.* **18**: 1-15 (2011)

Robinson LJ, Leitner W, Draznin B, Heidenreich KA. Evidence that p21ras mediates the neurotrophic effects of insulin and insulin-like growth factor I in chick forebrain neurons.

Endocrinology. **135**: 2568–73 (1994)

Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Douvdevani A, Gelman S.

Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res*. **8**: 673–675 (2000)

Sah SK, Lee C, Jang JH, Park GH. Effect of high-fat diet on cognitive impairment in triple-transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*.

493: 731–736 (2017)

Scherer T, Hare JO, Diggs-andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, Zielinski E,

Vempati P, Su K, Dighe S, Milsom T, Puchowicz M, Scheja L, Zechner R, Fisher SJ,

Previs SF, Buettner C. Brain Insulin Controls Adipose Tissue Lipolysis and Lipogenesis.

Cell Metab. **13**: 183–194 (2011)

Schlöndorff J, Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J*

Cell Sci. **112**: 3603-17 (1999)

Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner J a, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P,

Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. Insulin receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J. Neurosci.* **23**: 7084–92 (2003)

Selkoe D. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **81**: 742–66 (2001)

Shankar G, Bloodgood B, Townsend M, Walsh D, Selkoe D, Sabatini B. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid- β protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* **27**: 2866–75 (2007)

Sherrington R, Rogaev E, Liang Y, Rogaeva E, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J, Bruni A, Montesi M, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of the gene bearing missense mutations in early onset familial Alzheimer disease. *Nature.* **375**: 754–760 (1995)

Simmgen M, Knauf C, Lopez M, Choudhury AI, Charalambous M, Cantley J, Bedford

DC, Claret M, Iglesias MA, Heffron H, Cani PD, Vidal-Puig A, Burcelin R, Withers DJ.

Liver-specific deletion of insulin receptor substrate 2 does not impair hepatic glucose and lipid metabolism in mice. *Diabetologia*. **49**: 552-61 (2006)

Solomon SS, Mishra SANJAYK, Palazzolo MR, Postlethwaite AE, Seyer JM. Identification of specific sites in the TNF- α molecule promoting insulin resistance in H-411E cells. *J Lab Clin Med*. **130**: 139–146 (1997)

Stein LJ, Dorsa DM, Baskin DG, Figlewicz DP, Porte D, Woods SC. Reduced effect of experimental peripheral hyperinsulinemia to elevate cerebrospinal fluid insulin concentrations of obese Zucker rats. *Endocrinology*. **121**: 1611–5 (1987)

Stephens JM, Lee J, Pilch PF. Tumor Necrosis Factor- α -induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Accompanied by a Loss of Insulin Receptor Substrate-1 and GLUT4 Expression without a Loss of Insulin Receptor-mediated Signal Transduction. *J Biol Chem*. **272**: 971–976 (1997)

Stichel CC, Luebbert H. Inflammatory processes in the aging mouse brain: participation of dendric cells and T-cells. *Neurobiol Aging*. **28**: 1507–21 (2007)

Stöhr O, Schilbach K, Moll L, Hettich MM, Freude S, Wunderlich FT, Ernst M, Zemva J, Brüning JC, Krone W, Udelhoven M, Schubert M. Insulin receptor signaling mediates

- APP processing and β -amyloid accumulation without altering survival in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Age (Dordr)*. **35**: 83–101 (2013)
- Suzuki N, Iwatsubo T, Odaka A, Ishibashi Y, Kitada C, Ihara Y. High tissue content of soluble beta 1-40 is linked to cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* **145**: 452–60 (1994)
- Taguchi A, Wartschow LM, White MF. Brain IRS2 signaling coordinates life span and nutrient homeostasis. *Science*. **317**: 369-72 (2007)
- Takahashi H. Animal models of Alzheimer's disease for preclinical research. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. **136**: 6-10 (2010)
- Takatani T, Shirakawa J, Roe MW, Leech CA, Maier BF, Mirmira RG, Kulkarni RN. IRS1 deficiency protects β -cells against ER stress-induced apoptosis by modulating sXBP-1 stability and protein translation. *Sci Rep*. **6**: srep28177 (2016)
- Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Morishita R. Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *PNAS*. **107**: 7036–41 (2010)

Talbot K, Wang H, Kazi H, Han L, Bakshi KP, Stucky A, Fuino RL, Kawaguchi KR, Samoyedny AJ, Wilson RS, Arvanitakis Z, Schneider JA, Wolf BA, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE. Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer ' s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* **122**: 1316–38 (2012)

Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, Sekihara H, Yoshioka S, Horikoshi H, Furuta Y, Ikawa Y, Kasuga M, Yazaki Y, Aizawa S. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature.* **372**: 182–6 (1994)

Terauchi Y, Iwamoto K, Tamemoto H, Komeda K, Ishii C, Kanazawa Y, Asanuma N, Aizawa T, Akanuma Y, Yasuda K, Kodama T, Tobe K, Yazaki Y, Kadowaki T. Development of non-insulin-dependent diabetes mellitus in the double knockout mice with disruption of insulin receptor substrate-1 and beta cell glucokinase genes. Genetic reconstitution of diabetes as a polygenic disease. *J Clin Invest.* **99**: 861–6 (1997)

Terauchi Y, Takamoto I, Kubota N, Matsui J, Suzuki R, Komeda K, Hara A, Toyoda Y, Miwa I, Aizawa S, Tsutsumi S, Tsubamoto Y, Hashimoto S, Eto K, Nakamura A, Noda M, Tobe K, Aburatani H, Nagai R, Kadowaki T. Glucokinase and IRS-2 are

required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* **117**: 246-57 (2007)

Tomita T, Tokuhiko S, Hashimoto T, Aiba K, Saido T, Maruyama K, Iwatsubo T.

Overproduction of amyloidogenic forms of amyloid β peptides inability of truncated forms of PS2 with familial Alzheimer's disease mutation to increase secretion of A β 42. *J. Biol. Chem.* **273**: 21153–60 (1998)

van der Heide LP, Ramakers GM, Smidt MP. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol.* **79**: 205-21 (2006)

Vettorazzi JF, Kurauti MA, Soares GM, Borck PC, Ferreira SM, Branco RCS, Michelone LSL, Boschero AC, Junior JMC, Carneiro EM. Bile acid TUDCA improves insulin clearance by increasing the expression of insulin-degrading enzyme in the liver of obese mice. *Sci Rep.* **7** (2017)

Wallum BJ, Taborsky GJ, Porte D, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, Ward WK, Dorsa D. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **64**: 190–4 (1987)

- Wan Q, Xiong ZG, Man HY, Ackerley C a, Braunton J, Lu WY, Becker LE, MacDonald JF, Wang YT. Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature*. **388**: 686–90 (1997)
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. **112**: 1796-808 (2003)
- Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. **391**: 900–4 (1998)
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med*. **9**: 453–7 (2003)
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. **112**: 1821-30 (2003)
- Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T. A β immunotherapy: intracerebral sequestration of A β by an anti-A β

- monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble A β . *J. Neurosci.* **29**: 11393–8 (2009)
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* **8**: 1288–95 (2002)
- Yankner B, Duffy L, Kirschner D. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science (80-.).* **250**: 279–282 (1990)
- Yoon SO, Park DJ, Ryu JC, Ozer HG, Tep C, Shin YJ, Lim TH, Pastorino L, Kunwar AJ, Walton JC, Nagahara AH, Lu KP, Nelson RJ, Tuszynski MH, Huang K. JNK3 perpetuates metabolic stress induced by A β peptides. *Neuron.* **75**: 824–37 (2012)
- Young WS 3rd. Periventricular hypothalamic cells in the rat brain contain insulin mRNA. *Neuropeptides.* **8**: 93-7 (1986)
- Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell.* **135**: 61–73 (2008)

| 地域、国 | 対象年齢 | 追跡人数 | 期間 (年) | 発症リスク比 (95%信頼区間) | | | 文献 |
|----------------|-------|------|--------|--|------------------|------------------|---------------------------------|
| | | | | AD | 脳血管性認知症 | 全認知症 | |
| ミネソタ、アメリカ | 全年齢 | 1455 | 15 | 男性: 2.27 (1.55-3.31) 女性: 1.37 (0.95-2.01) | | 1.66 (1.34-2.65) | Leibson <i>et al.</i> , 1997 |
| ロッテルダム、オランダ | 55 ≤ | 6370 | 2.1 | 1.9 (1.2-3.1) | | 1.9 (1.3-2.8) | Ott <i>et al.</i> , 1999 |
| マニトバ、カナダ | 65 ≤ | 688 | 5 | 2.7 (0.85-8.52) | | | Tyas <i>et al.</i> , 2001 |
| マンハッタン北部、アメリカ | 65 ≤ | 1262 | 4.3 | 1.3 (0.83-1.9) | | | Luchsinger <i>et al.</i> , 2001 |
| ハワイ、アメリカ | 72-91 | 2574 | 3 | 1.8 (1.1-2.9) | 2.3 (1.1-5.0) | 1.5 (1.01-2.2) | Peila <i>et al.</i> , 2002 |
| スウェーデン | 80 ≤ | 702 | 8 | 0.83 (0.46-1.48) | 2.54 (1.35-4.78) | 1.16 (0.79-1.71) | Hassing <i>et al.</i> , 2002 |
| カナダ | 65 ≤ | 5574 | 5 | 1.30 (0.83-2.03) | | 1.26 (0.90-1.76) | MacKnight <i>et al.</i> , 2002 |
| ストックホルム、スウェーデン | 75 ≤ | 1301 | 6 | 1.3 (0.9-2.1) | 2.6 (1.2-6.1) | 1.5 (1.0-2.1) | Xu <i>et al.</i> , 2004 |
| フラミンガム、アメリカ | 平均70 | 2210 | 12.7 | 1.15 (0.65-2.05) | | | Akomolafe <i>et al.</i> , 2006 |
| ニューヨーク北部、アメリカ | 65 ≤ | 2476 | 4.4 | 1.4 (1.0-2.1) | | | Muller <i>et al.</i> , 2007 |
| 久山町、日本 | 60 ≤ | 1017 | 15 | 1.94 (1.16-3.26) | 2.07 (1.05-4.09) | 1.71 (1.19-2.44) | Ohara <i>et al.</i> , 2011 |

Table. 1 2型糖尿病患者を追跡した疫学調査

複数の前向きコホート研究を主とした疫学的調査により、2型糖尿病患者ではAD発症リスクが有意に上昇することが示唆されている (全認知症はADを含む)。

WTマウス

| 検討内容 \ 月齢 | 3 | 5-6 | 9 | 12-15 | 18 |
|------------------|---|-----|---|-------|----|
| 代謝指標 | ○ | | ○ | | |
| インスリン応答性 (中枢) | | ○ | | | |
| A β 量 | | | | ○ | |
| A β 蓄積 | | | | | |
| 代謝ストレス反応のシグナルレベル | | ○ | ○ | | ○ |
| 小胞体ストレス反応に対する応答性 | | ○ | | | |

A7マウス

| 検討内容 \ 月齢 | 3 | 5-6 | 9 | 10 | 15 |
|------------------|---|-----|---|----|----|
| 代謝指標 | ○ | | ○ | | ○ |
| インスリン応答性 (中枢) | | ○ | | | |
| A β 量 | | ○ | | ○ | ○ |
| A β 蓄積 | | | | | ○ |
| 代謝ストレス反応のシグナルレベル | | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 小胞体ストレス反応に対する応答性 | | ○ | | | |

Table. 2 各月齢における解析内容

WTマウス (上段)、A7マウス (下段) それぞれにおいて、月齢に応じた解析内容を表にまとめた。このうち代謝ストレス反応のシグナルレベルに関しては、5 - 6か月齢のA7マウス及び18か月齢のWTマウスは中枢のみを、10、15か月齢のA7マウスは末梢のみを評価した。

| 給餌成分 (単位g、100g当り) | 普通食 (ND) | 高脂肪食 (HFD) |
|-------------------|------------|-------------|
| 水分 | 8.2 | 6.2 |
| 粗タンパク質 | 21.9 | 25.5 |
| 粗脂肪 | 5.4 | 32.0 |
| 粗繊維 | 2.9 | 2.9 |
| 粗灰分 | 6.3 | 4.0 |
| 可溶性無窒素物 | 55.3 | 29.4 |
| カロリー (kcal/100g) | 357.0 | 507.6 |

Table. 3 食餌組成

普通食 (ND) として脂肪分を5.4%含むCRF-1 (オリエンタル酵母工業) を用い、高脂肪食 (HFD) には脂肪分を32.0%含むHFD32 (日本クレア) を用いた。

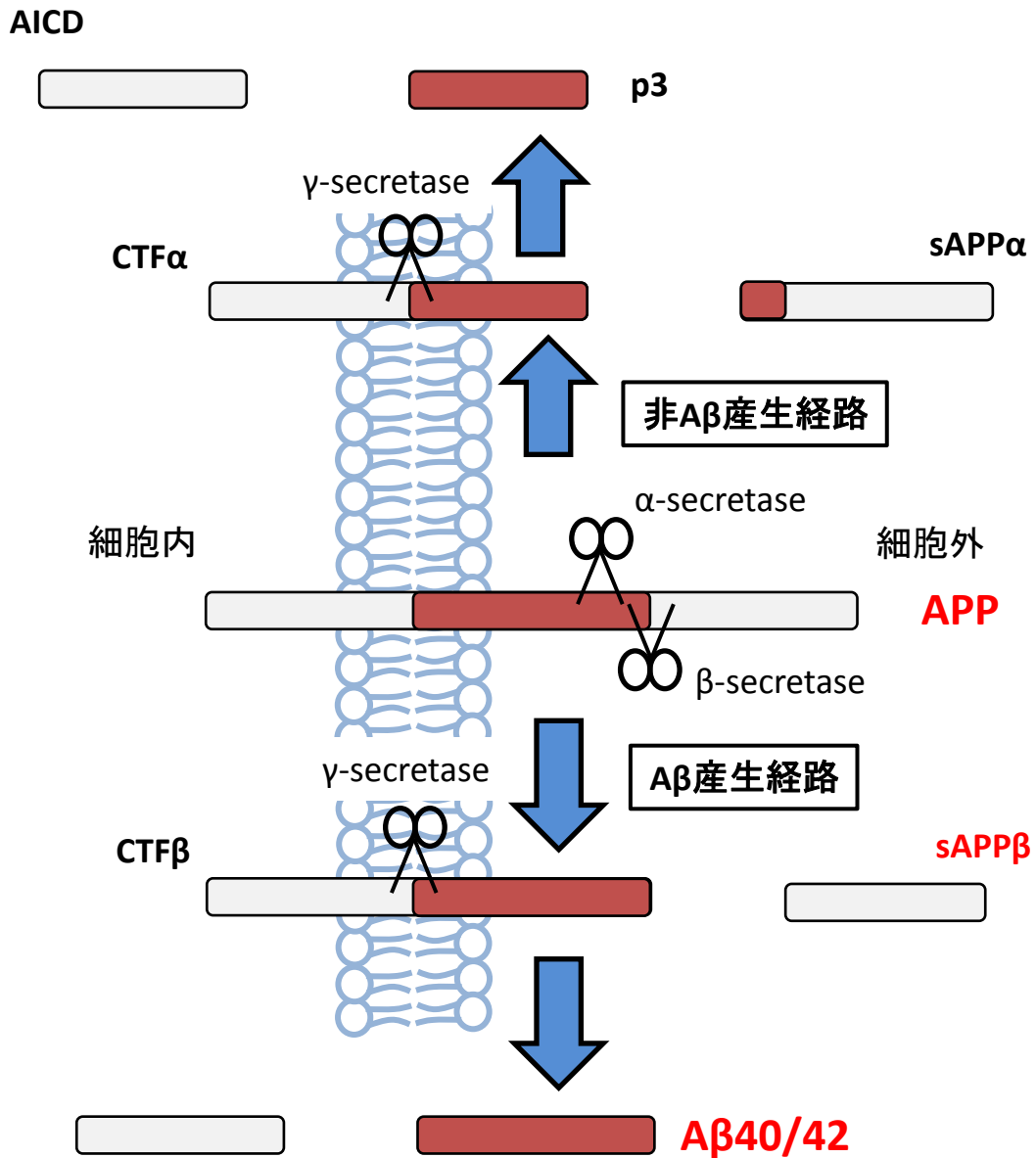


Fig. 1 APPの代謝経路とAβ産生

アミロイドβペプチド (Aβ) は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) がβ-secretase及びγ-secretaseの2段階の切断を受けることで産生される (Aβ産生経路)。一方、非Aβ産生経路ではAPPがα-secretaseによりAβ配列の16番目で切断を受け、続けてγ-secretaseによる切断を受けることでp3が産生される。

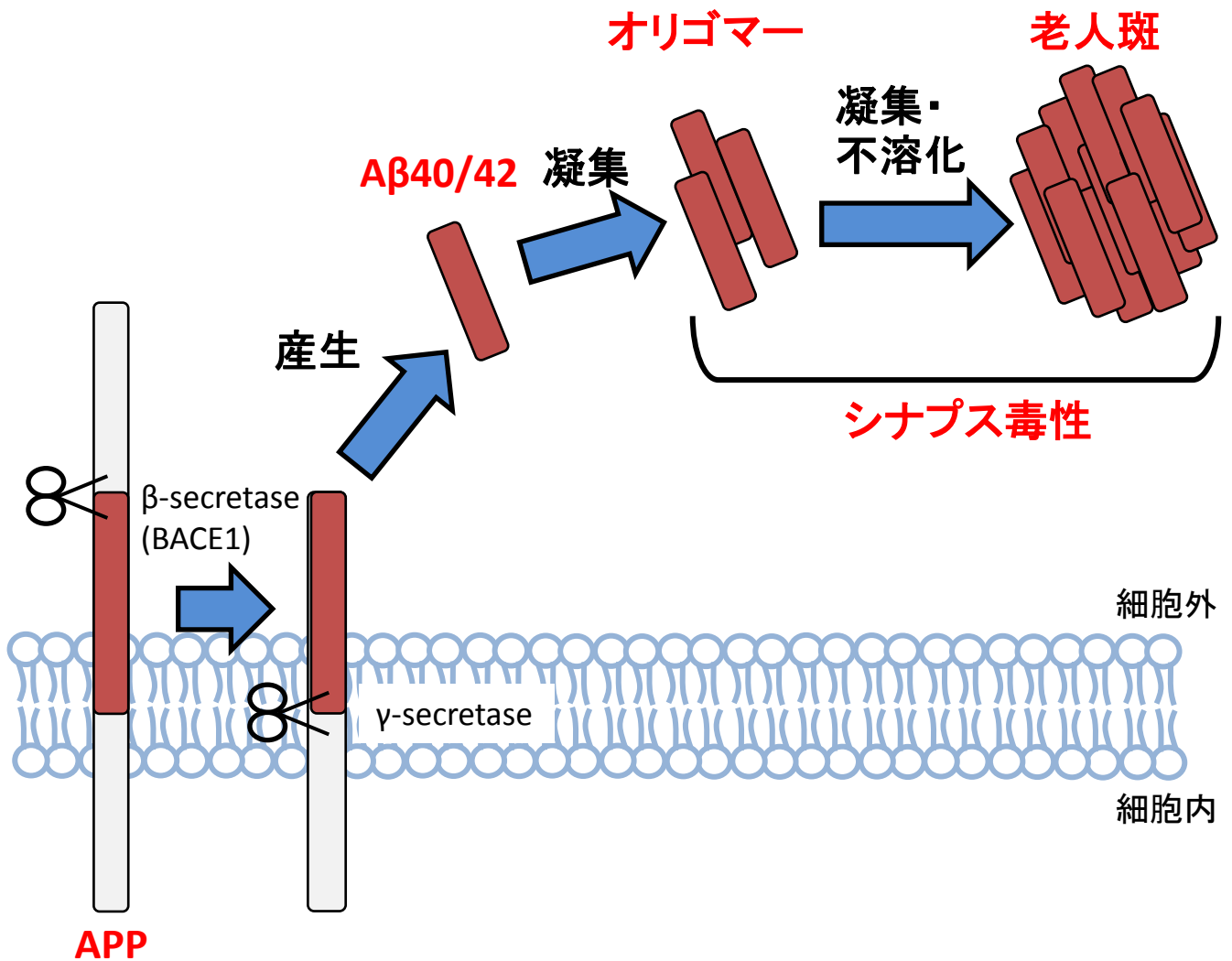


Fig. 2 アミロイド仮説

APPが2段階切断を受けるとAβ40/42が産生される。これらが凝集・線維化を経て神経細胞毒性を有することがAD発症の原因となっているとするアミロイド仮説 (アミロイド・カスケード仮説) が、現在広く支持されている。

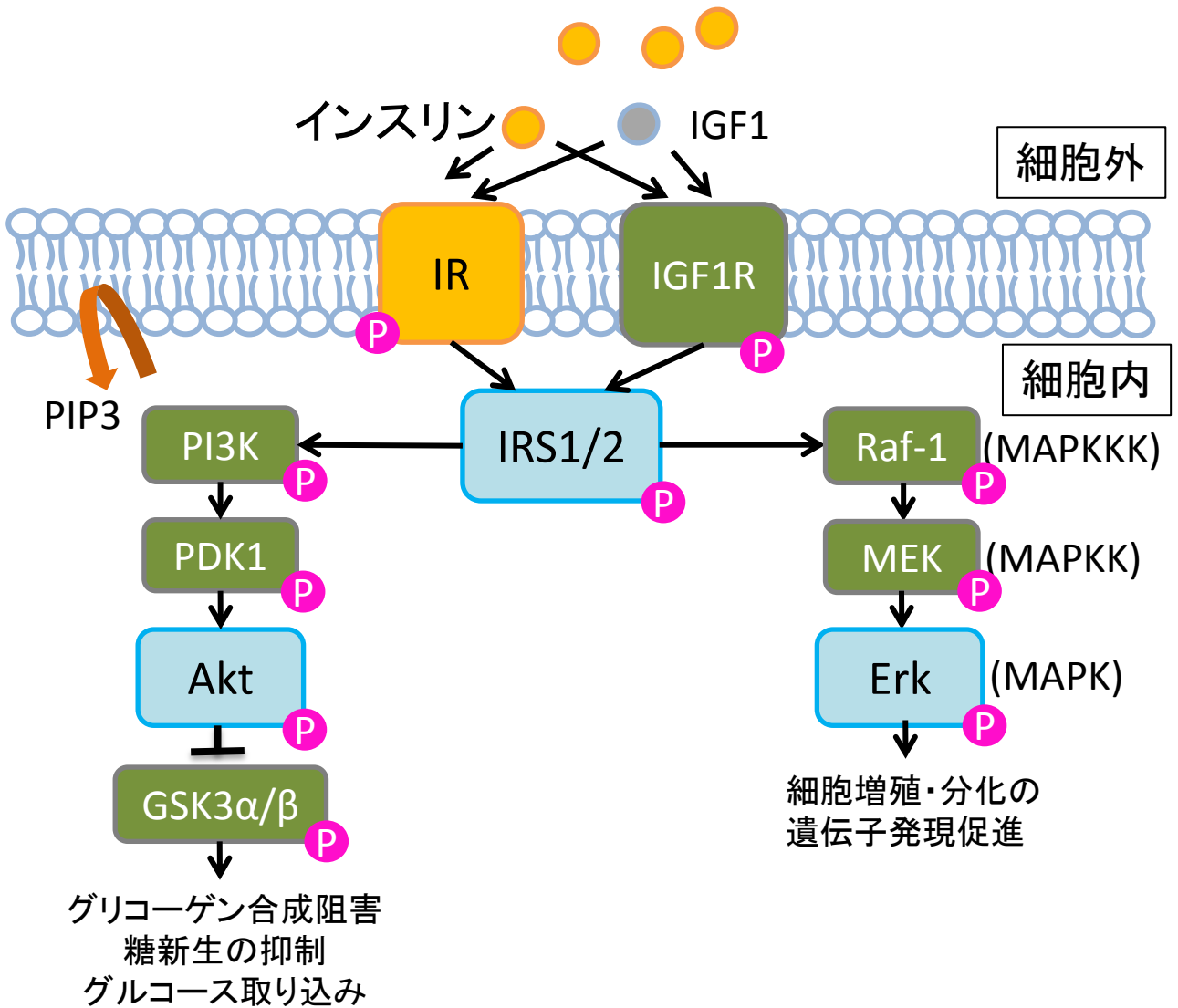


Fig. 3 インスリンシグナル

インスリンはインスリン受容体 (IR) を介して細胞内にシグナルを伝え、下流のIRS-1/2、Aktなどをリン酸化する (PI3K-Akt経路)。その一方で、MAPKカスケードにおいては3種類のキナーゼが順次リン酸化されて活性化され、下流のErkが核内に移行することにより細胞増殖及び分化が促進される。

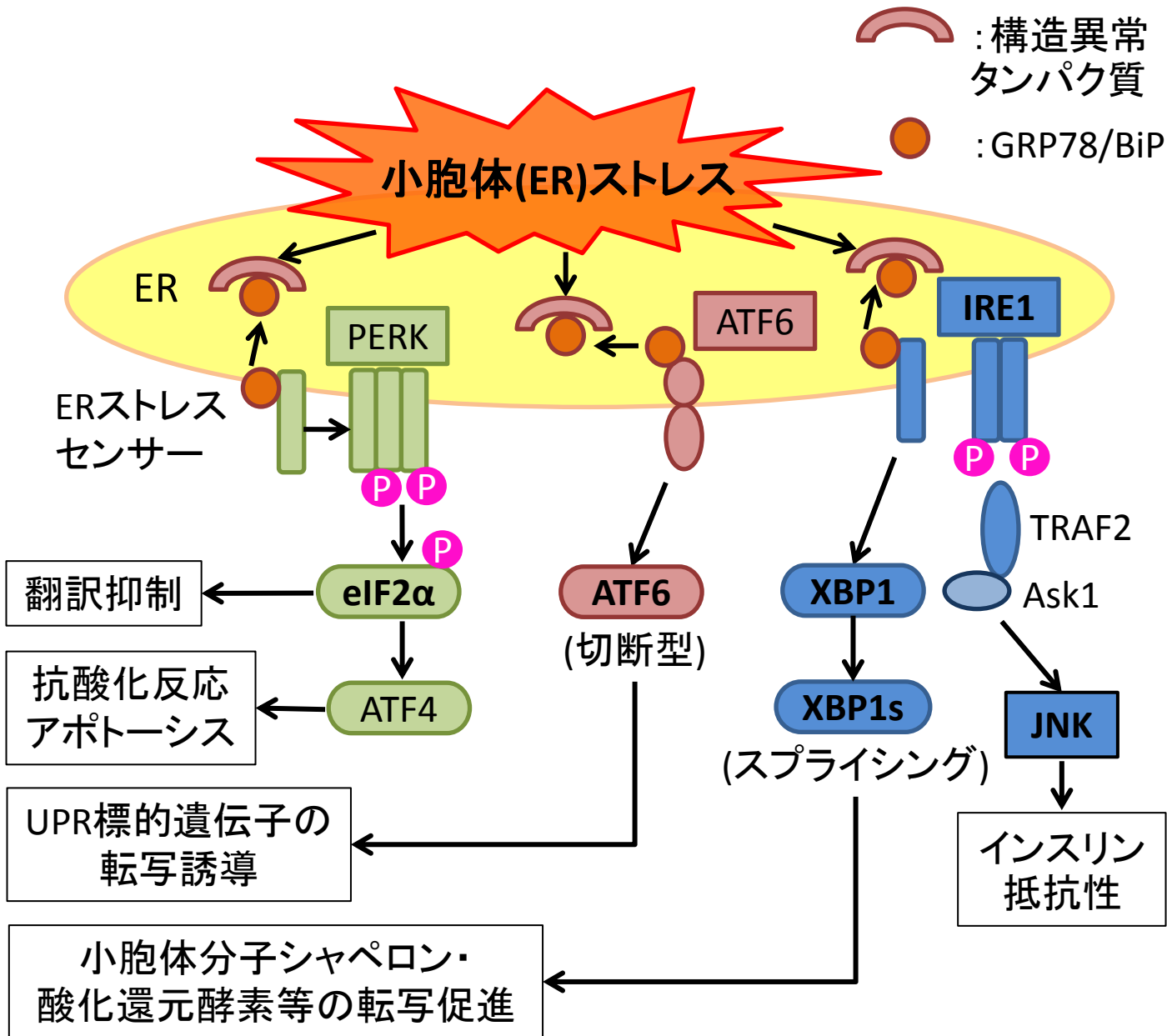


Fig. 4 小胞体ストレス応答 (UPR)

小胞体ストレスが負荷されると、小胞体膜状の各ストレスセンサーのセンサードメインから GRP78/BiP が解離し、PERK や ATF6、IRE1 が活性化される。PERK は eIF2α をリン酸化してタンパク質翻訳を抑制し、それにより転写因子 ATF4 の翻訳が促進され、分子シャペロンの転写が誘導される。ATF6 は切断を受けることで活性化され、UPR 標的遺伝子の転写を誘導する。また、IRE1 は転写因子 XBP-1 をスプライシングにより活性化型に変換し、分子シャペロンの転写を促進させると同時に、C 末側に TRAF2 及び Ask1 がリクルートされることでストレス活性化キナーゼとも総称される JNK 経路を活性化させる。JNK 経路の活性は、インスリン抵抗性と関与することが知られている。

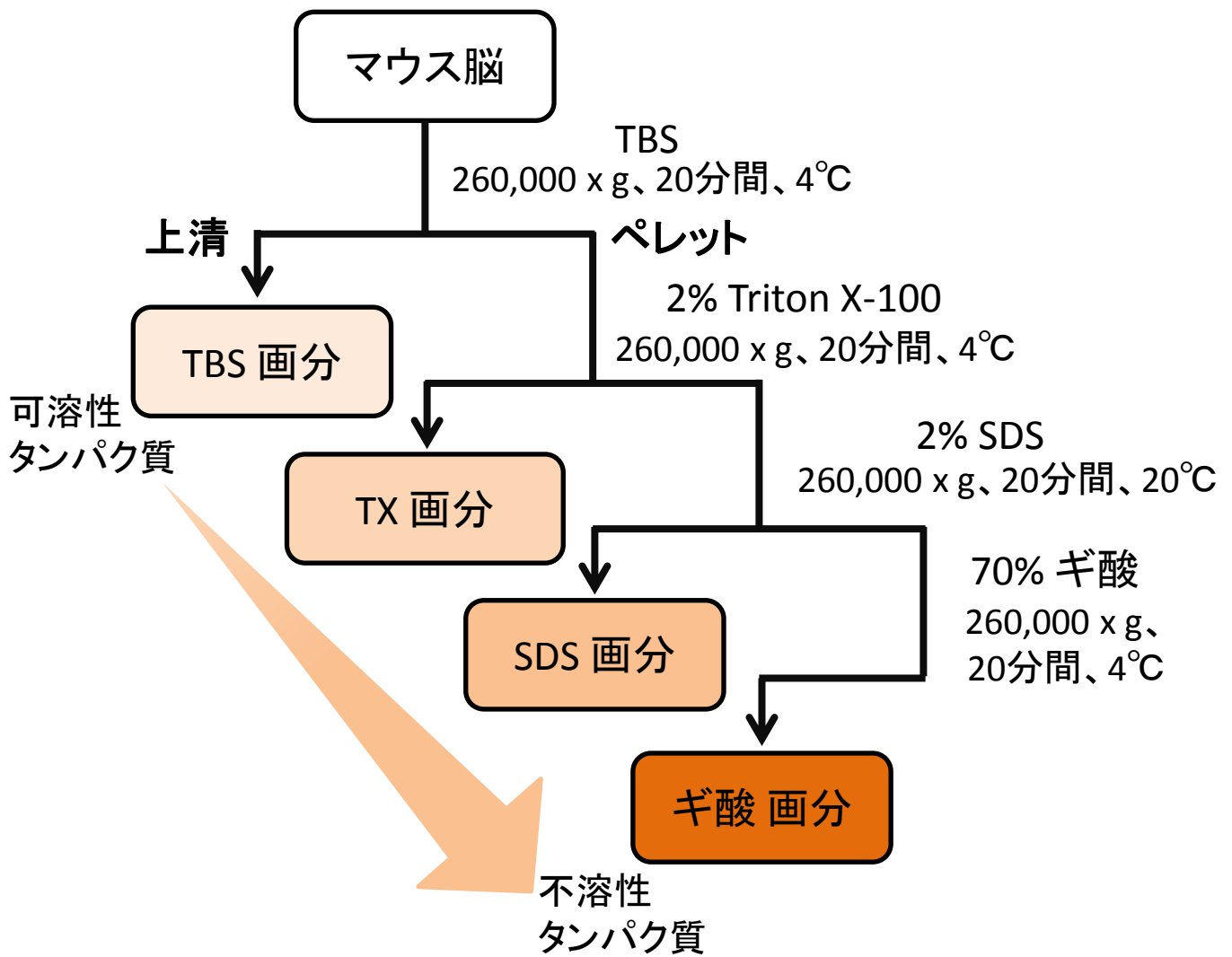


Fig. 5 脳の段階抽出

モデルマウスの生化学的解析を行うため、脳組織の段階抽出を行った。この時、可溶性AβはTBS画分に、不溶性Aβはギ酸画分に含まれる。

3か月齢♂

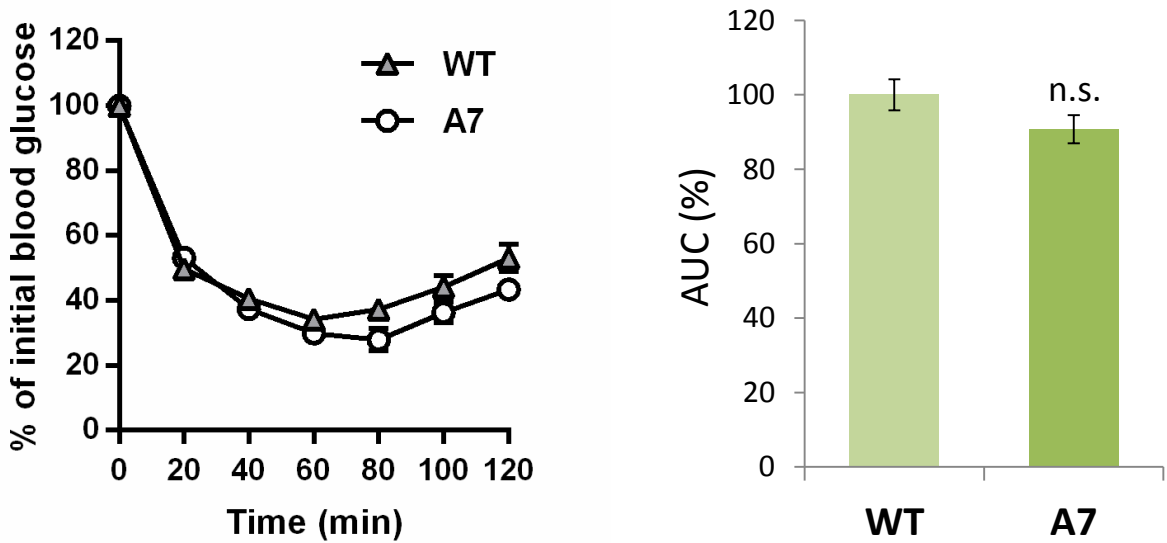


Fig. 6 3か月齢 ND負荷WT、A7マウスのインスリン応答性

NDを負荷したWT、A7マウスに関して、3か月齢においてインスリン抵抗性試験によるインスリン応答性の評価を行った。

WTとA7マウスでは、インスリン応答性に変化は見られなかった。
(n=11-12; t-test; mean ± SEM)

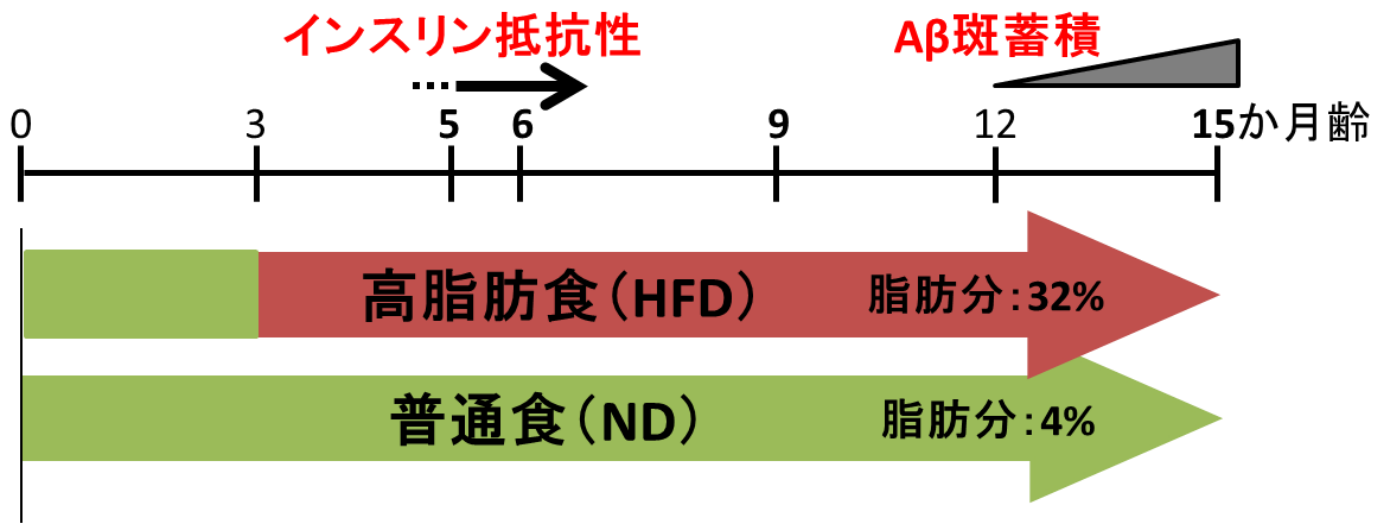
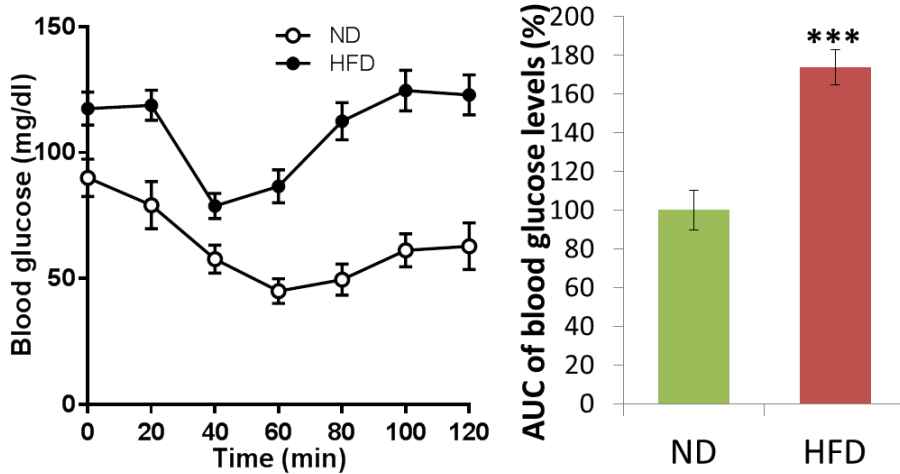


Fig. 7 糖尿病合併ADモデルマウスの作出

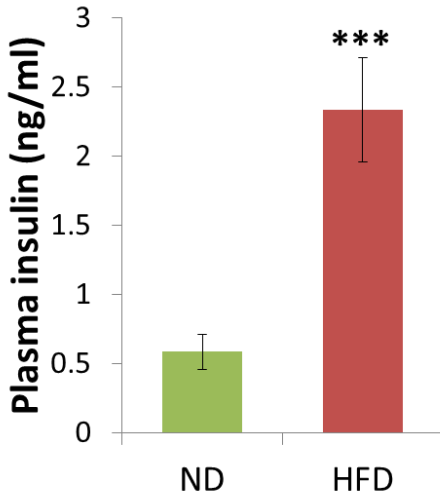
WT、A7マウスに対して、生後3か月より高脂肪食 (HFD) を負荷した。インスリン抵抗性が生じるといわれる5、6、9、10か月齢及び斑蓄積が生じていることが期待される15か月齢にて解析を行った。

9か月齢♂A7

A インスリン抵抗性試験 (ITT)



B 血中インスリン濃度



C 血糖値

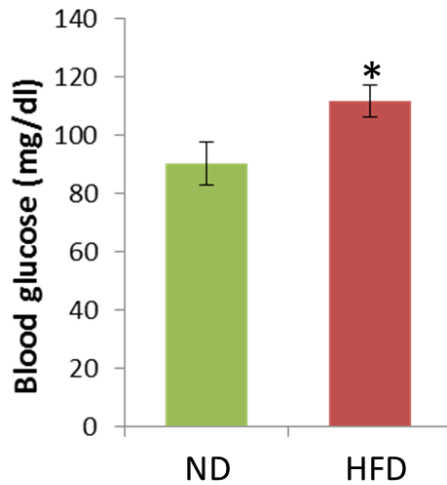


Fig. 8 9か月齢 HFD負荷A7マウスのインスリン応答性、血中インスリン濃度、血糖値

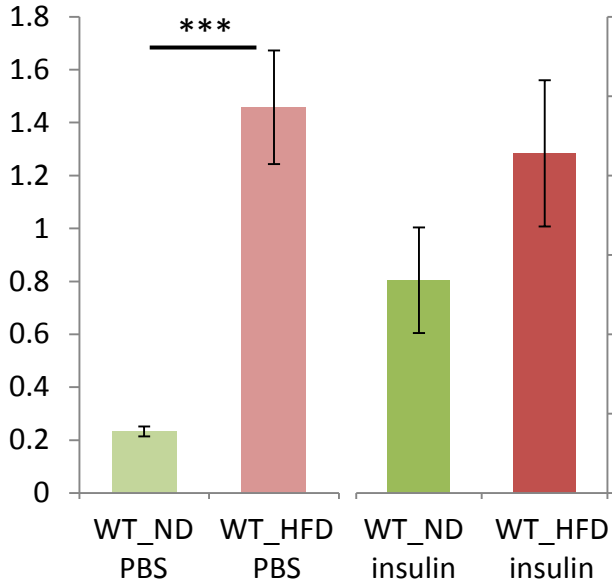
NDまたはHFDを負荷したA7マウスに関して、9か月齢においてインスリン抵抗性試験によるインスリン応答性の評価 (A)、血中インスリン濃度の測定 (B) 及び空腹時の血中グルコース濃度の測定 (C) を行った。

HFD負荷A7マウスでは、ND群と比べ血中インスリン濃度及び血中グルコース濃度が上昇しており、糖尿病病態を示した。

(n=10-12; t-test, * $p < 0.05$ *** $p < 0.005$; mean \pm SEM)

5か月齢♂WT

plasma insulin (ng/ml)



5か月齢♂A7

plasma insulin (ng/ml)

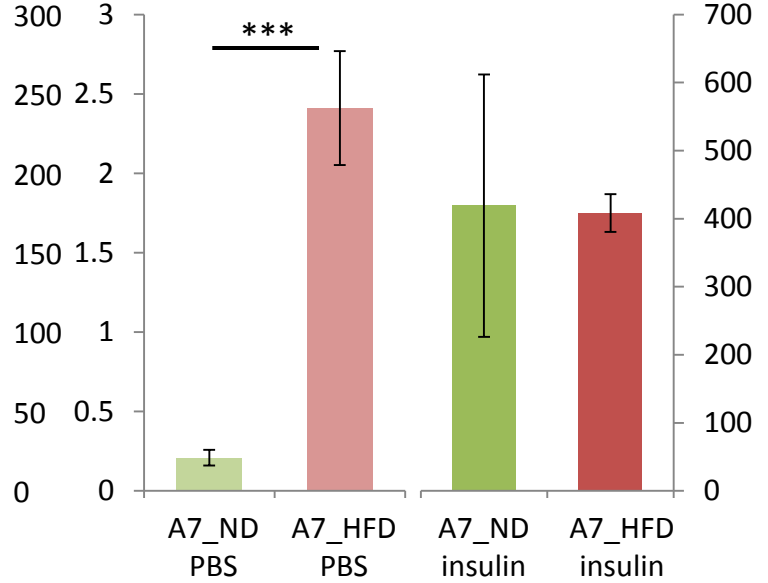


Fig. 9 5か月齢 WTマウス及びA7マウスの血漿インスリン濃度

NDまたはHFDを負荷したWTマウスとA7マウスに関して、5か月齢血漿中のインスリン濃度を測定した。

WTマウス、A7マウス共にPBS投与時にはHFD負荷による血漿中インスリン濃度の上昇が見られ、インスリン投与時にはND群、HFD群共に同程度にまでインスリン濃度が上昇した。

(n=3-7; t-test, ***p<0.005; mean ± SEM)

5か月齢♂

ND
insulin-

ND
insulin+

HFD
insulin-

HFD
insulin+

← WT_pIR

← WT_IR

← A7_pIR

← A7_IR

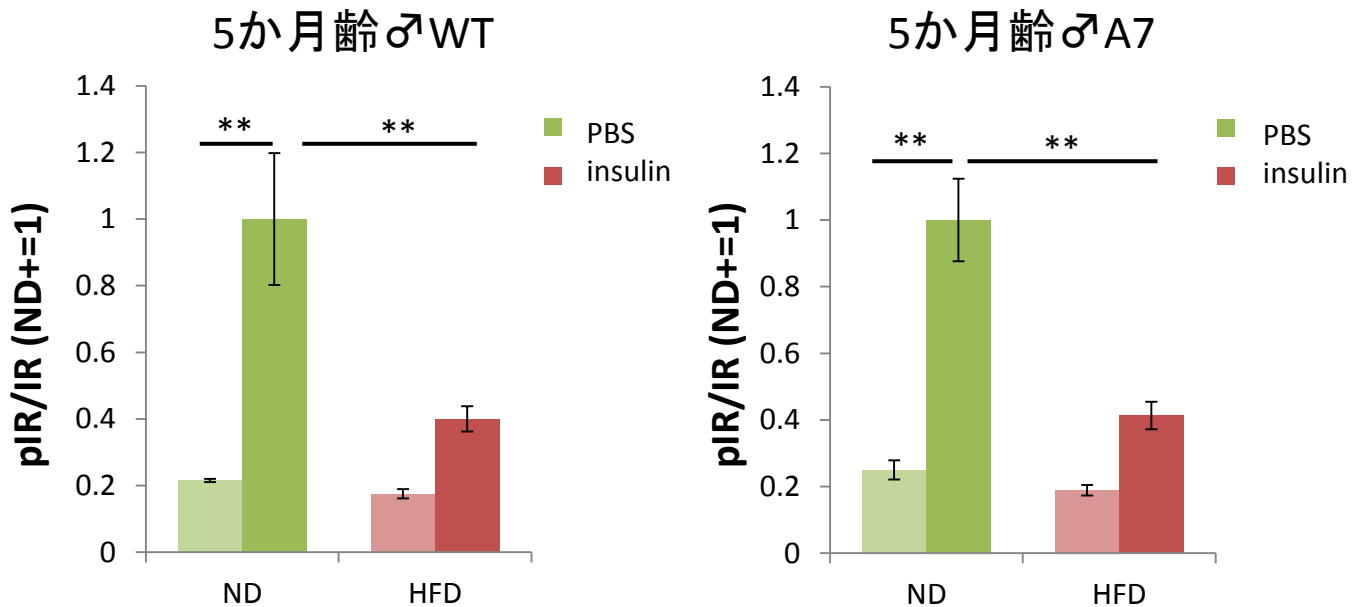


Fig. 10 5か月齢 WTマウス及びA7マウスの脳内インスリン抵抗性評価

NDまたはHFDを負荷したWTマウスとA7マウスに関して、5か月齢にてインスリン5Uの腹腔内投与により大脳皮質のIRリン酸化比率を測定した。

WTマウス、A7マウス共にHFD負荷によりpIR量の減少が見られ、インスリン抵抗性が生じていた。(n=3-7; Tukey-Kramer; **p<0.01; mean±SEM)

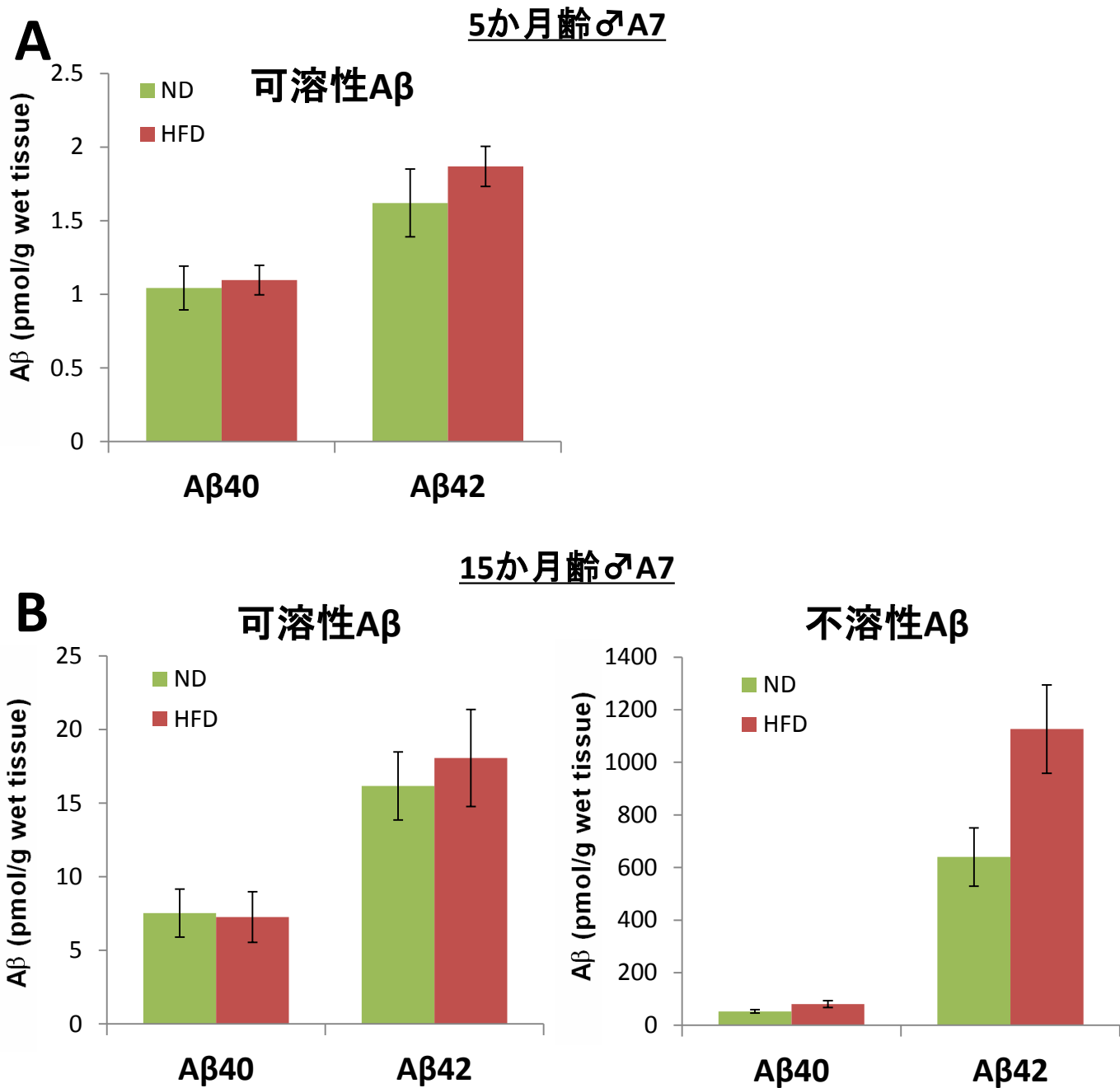


Fig. 11 5、15か月齢 A7マウスのA β 濃度

NDまたはHFDを負荷したA7マウスに関して、大脳皮質におけるA β 濃度をELISAにより測定した。5か月齢ではHFD負荷による可溶性A β 濃度の変化は見られなかったが、15か月齢ではHFD負荷により不溶性A β の量が増加していた。

(n=5-10; t-test, *p<0.05; mean \pm SEM)

15か月齢♂A7

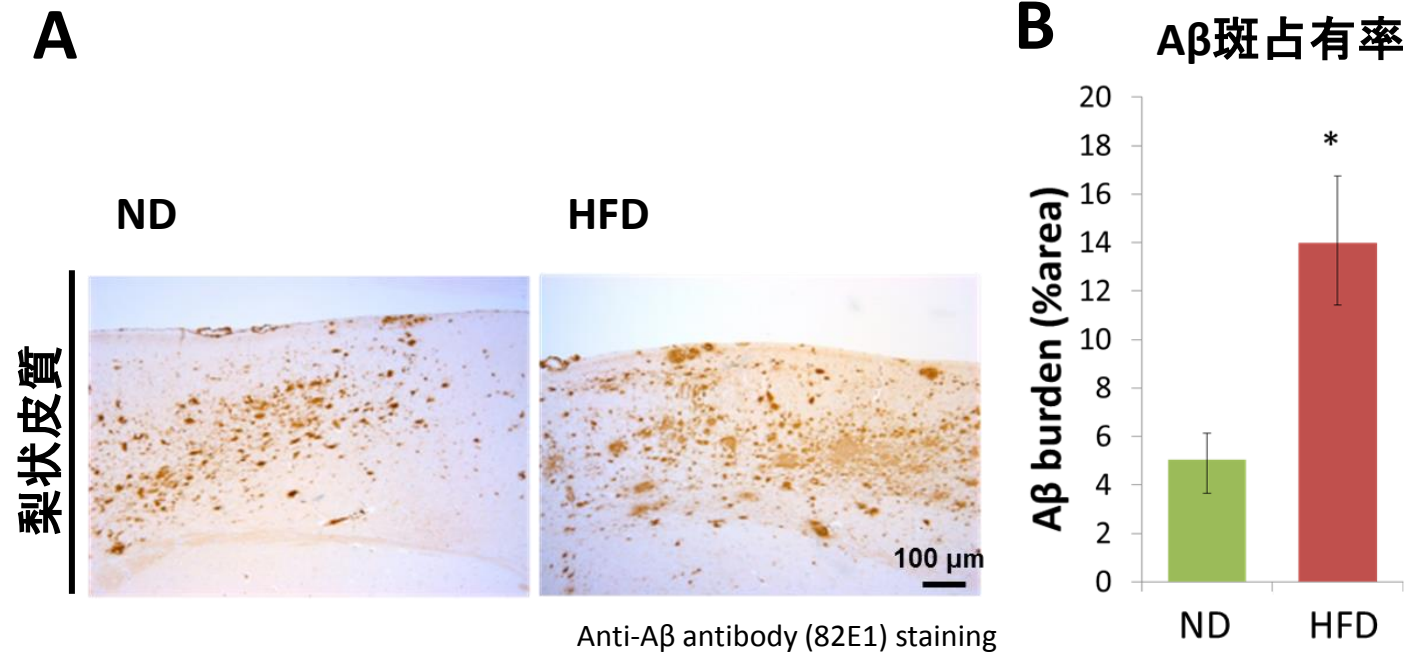


Fig. 12 15か月齢 HFD負荷によるA7マウスの脳内A β 蓄積量変化

15か月齢♂A7マウスの梨状皮質における82E1 (anti-A β) 免疫染色像 (A)。及びA β 占有率を定量し評価した (B)。

HFD負荷により、アミロイド斑蓄積は有意に増加した。
(n=5-6; t-test, *p<0.05; mean \pm SEM) (bar=500 μ m)

9か月齢♂A7

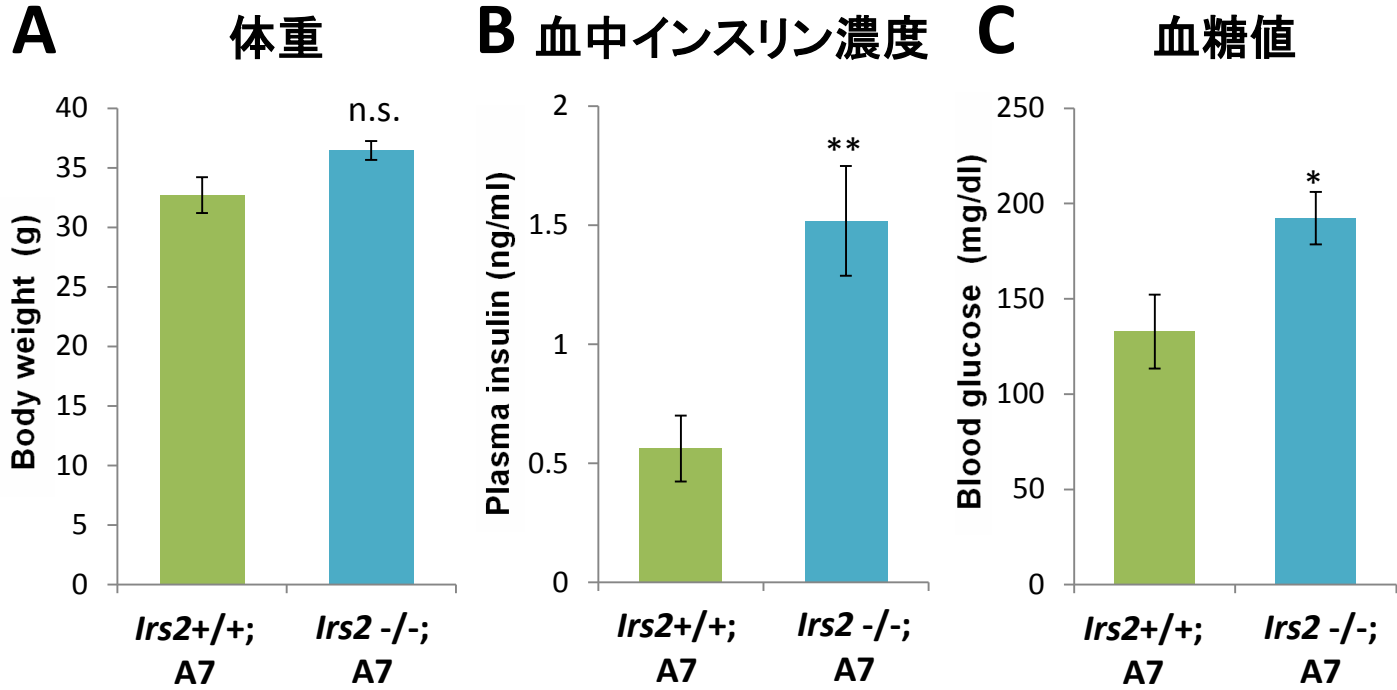


Fig. 13 9か月齢 *Irs2*^{-/-};A7マウスのインスリン応答性、血中インスリン濃度、血糖値

A7マウスとIRS-2欠損マウスを掛け合わせた合併モデルマウスにおいて、15か月齢におけるインスリン抵抗性試験による体重 (A)、血中インスリン濃度の測定 (B) 及び空腹時の血中グルコース濃度の測定 (C) を行った。

A7マウスでは、IRS-2の欠損により体重は有意な変化を示さなかったものの、血中インスリン濃度及び血中グルコース濃度の有意な上昇が観察され、糖尿病病態を示した。

(n=5-6; t-test, *p<0.05**p<0.01; mean ± SEM)

5か月齢♂A7

TBS画分

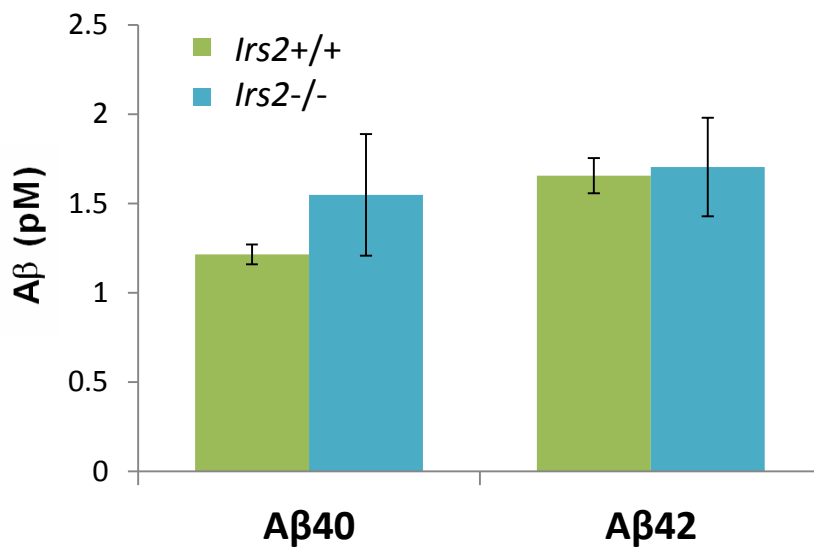


Fig. 14 5か月齢 *Irs2*^{-/-};A7マウスの大脳皮質におけるAβ量変化

5か月齢のA7マウスの大脳皮質における可溶性Aβ濃度をELISAにより測定した。若齢のA7マウスでは、IRS-2欠損によるAβ濃度の変化は見られなかった。

(n=3-5, t-test; mean ± SEM)

12-15か月齢♂WT

TBS画分

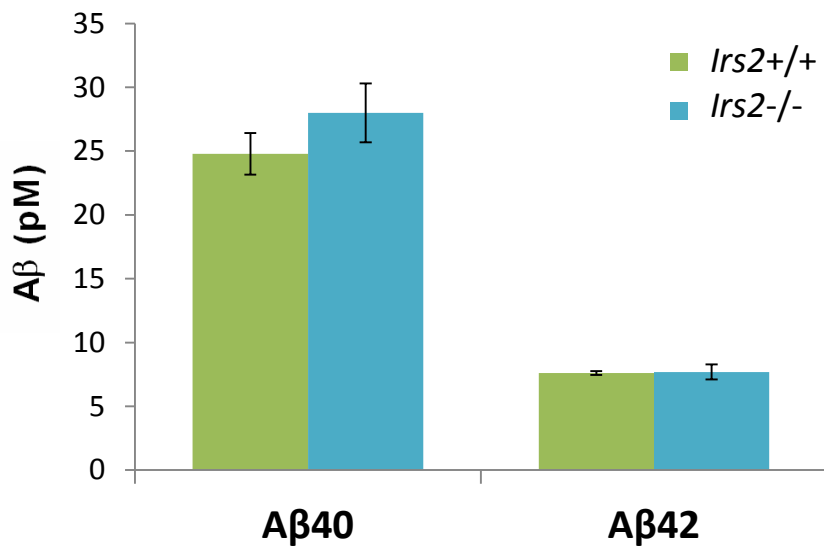


Fig. 15 12-15か月齢 *Irs2*^{-/-}マウスの大脳皮質におけるAβ量変化

12-15か月齢のWTマウスの大脳皮質における可溶性Aβ濃度をELISAにより測定した。高齢のWTマウスでは、*IRS-2*欠損による内在性Aβ濃度に変化は見られなかった。
(n=3-5, t-test; mean ± SEM)

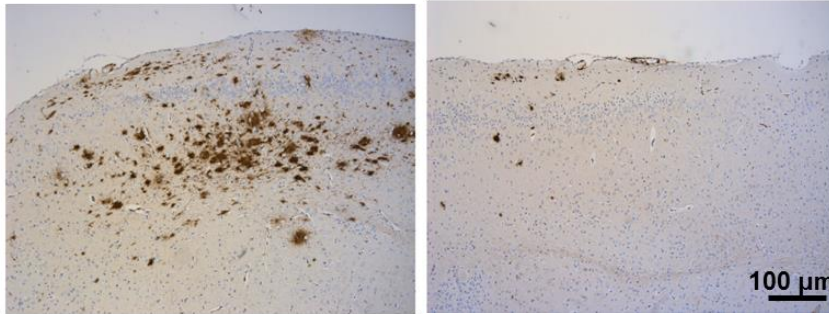
15か月齢♂A7

A

Irs2^{+/+};A7

Irs2^{-/-};A7

梨状皮質



Anti-A β antibody (82E1) staining

B

A β 斑占有率

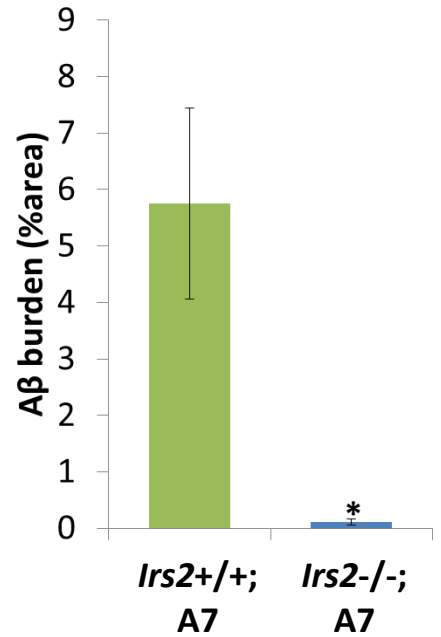


Fig. 16 15か月齢 *Irs2*^{-/-};A7マウスのA β 蓄積の評価

15か月齢*Irs2*^{-/-};A7マウスの梨状皮質における82E1 (anti-A β) 免疫染色像 (A) 、及びA β 占有率を定量し評価した (B) 。

IRS-2の欠損により、A β の蓄積が顕著に減少していた。
(n=3-4; t-test, *p<0.05; mean \pm SEM) (bar=100 μ m)

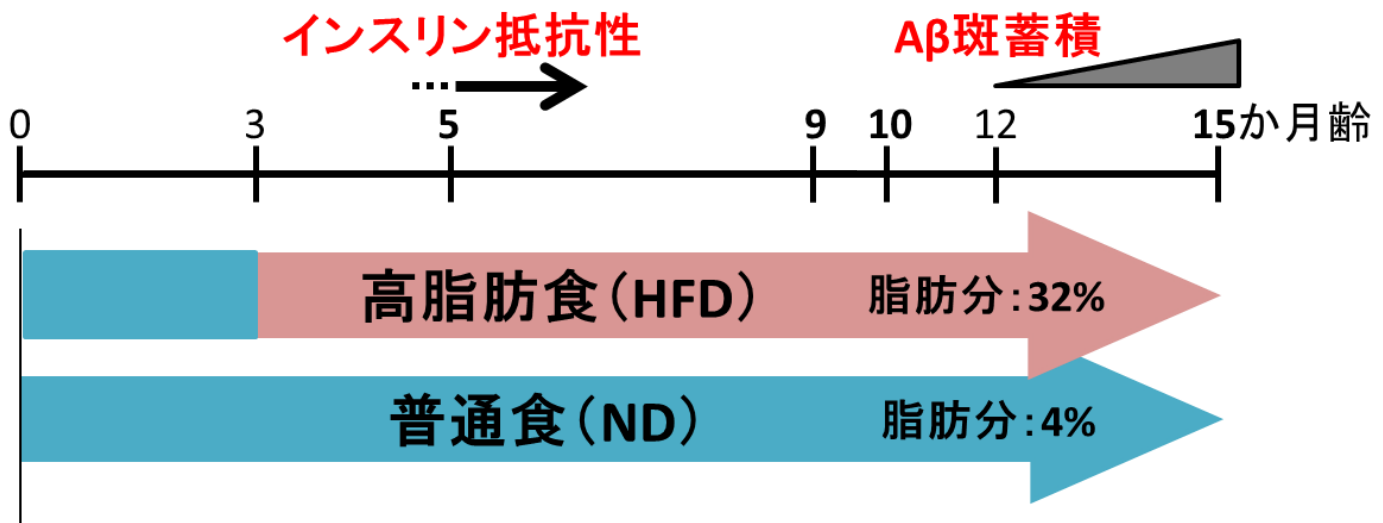
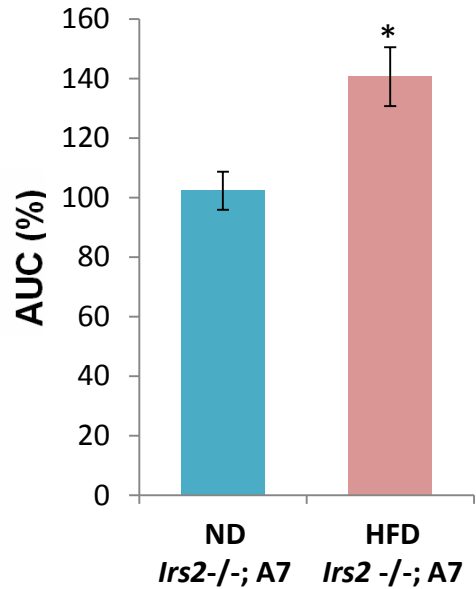
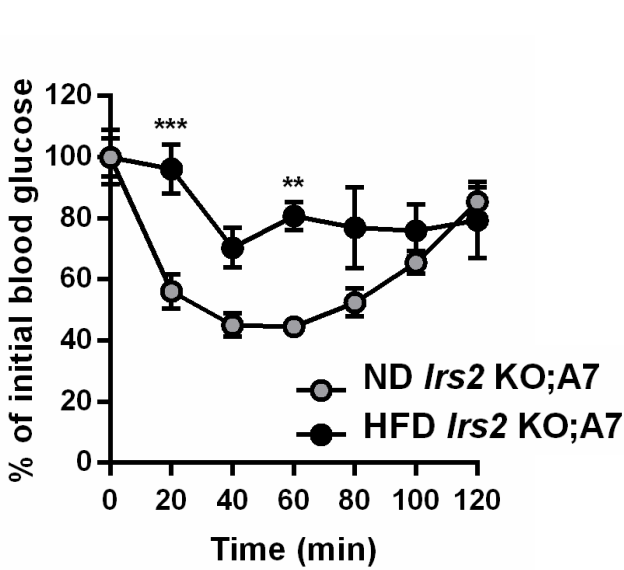


Fig. 17 HFD負荷IRS-2欠損ADモデルマウスの作出

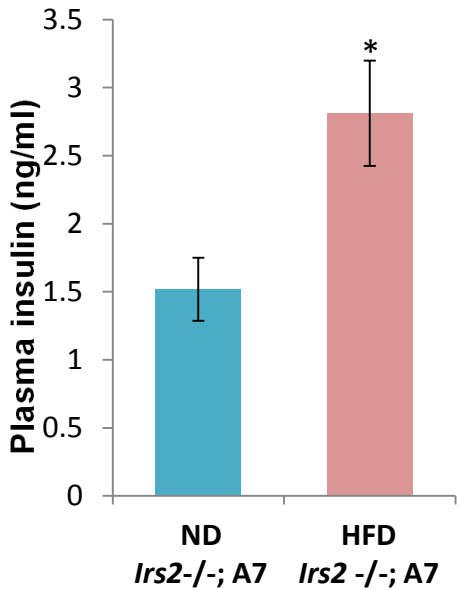
Irs2^{-/-};A7マウスに対して、生後3か月齢よりHFDを負荷することにより、新たなAD合併モデルマウスを作出した。

9か月齢♂A7

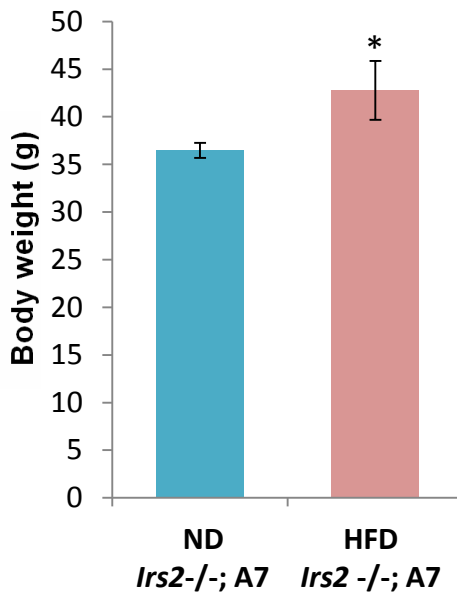
A インスリン抵抗性試験 (ITT)



B 血中インスリン濃度



C 体重変化



D 血糖値変化

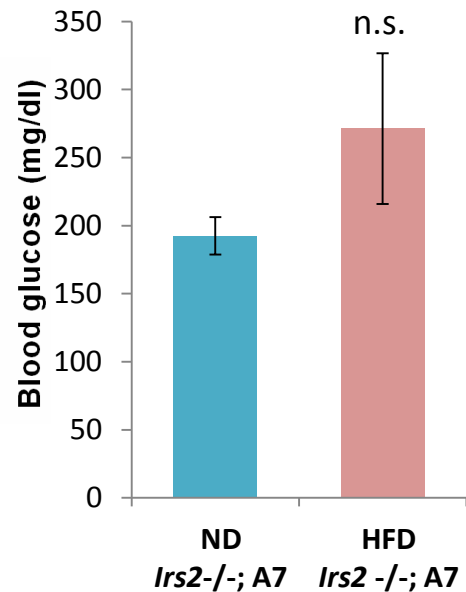


Fig. 18 9か月齢 *Irs2* -/-;A7マウスのインスリン応答性、血中インスリン濃度

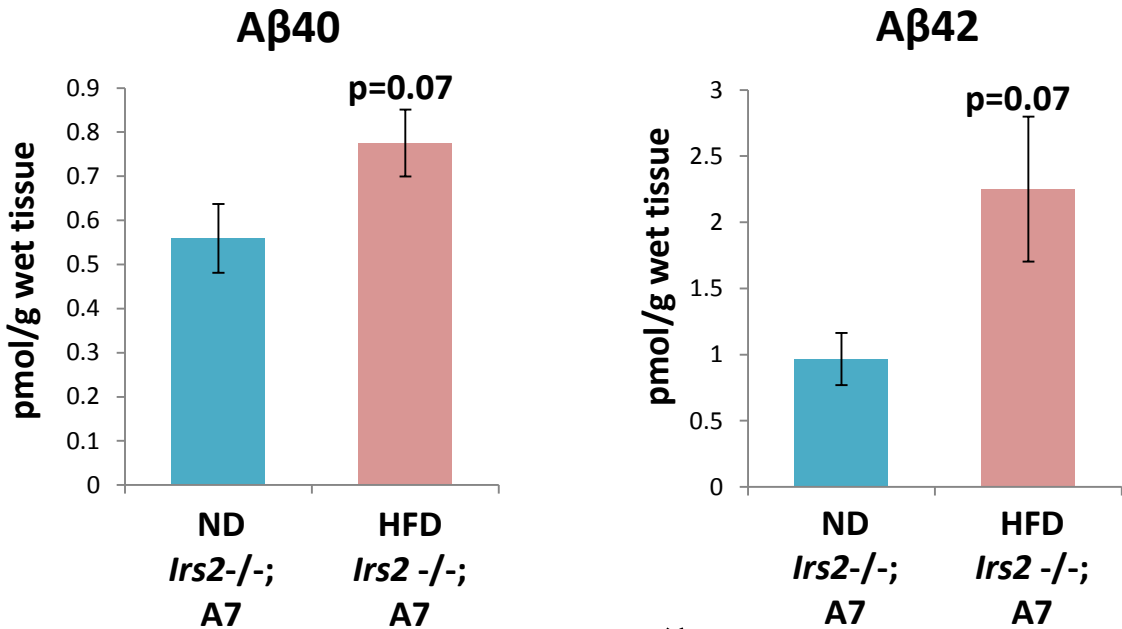
Irs2 -/-;A7マウスにおいて、9か月齢におけるインスリン抵抗性試験によるインスリン応答性の評価 (A)、血中インスリン濃度の測定 (B) を行った。また、3か月齢から9か月齢までの体重変化 (C) 及び血糖値変化 (D) を測定した。

Irs2 -/-;A7マウスでは、HFD負荷によりインスリン応答性低下や血中インスリン濃度や体重の増加、血糖値の上昇傾向が観察され、糖尿病病態の増悪が示された。

(n=3-6, t-test, *p<0.05***p<0.005 ; mean ± SEM)

10か月齢♂A7

TBS画分



FA画分

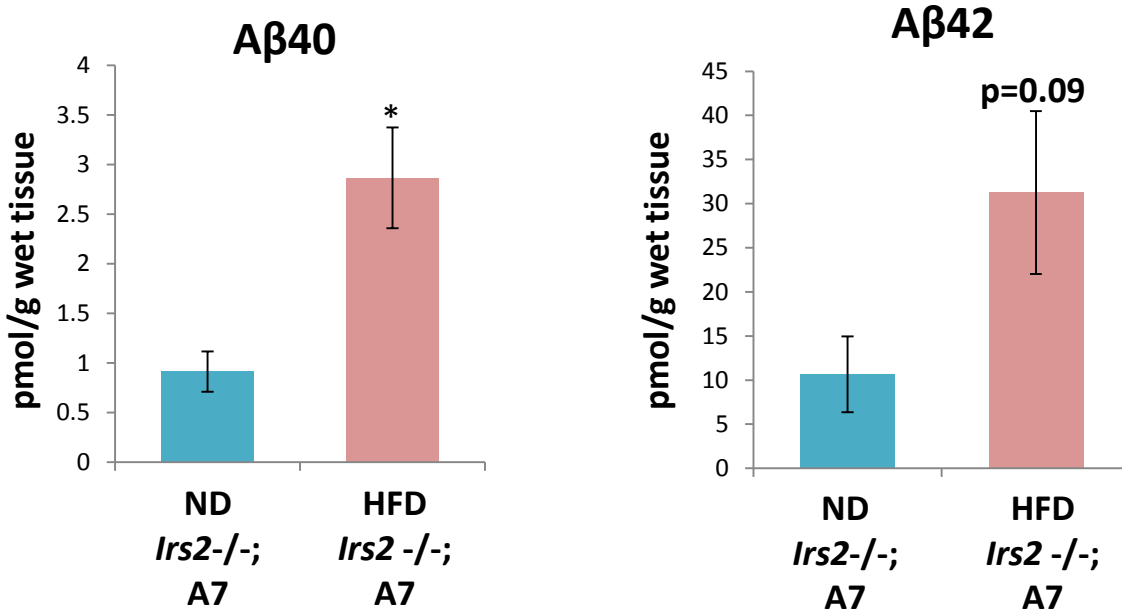


Fig. 19 10か月齢 *Irs2*^{-/-};A7マウスの大脳皮質におけるAβ量

10か月齢の*Irs2*^{-/-};A7マウスにおいて、HFD負荷時の大脳皮質におけるAβ濃度をELISAにより測定した。*Irs2*^{-/-};A7マウスでは、HFD負荷により不溶性Aβ40量が有意な増加を示し、その他の可溶性・不溶性Aβ量は増加傾向を示した。

(n=5-6, t-test, *p<0.05; mean ± SEM)

15か月齢♀A7

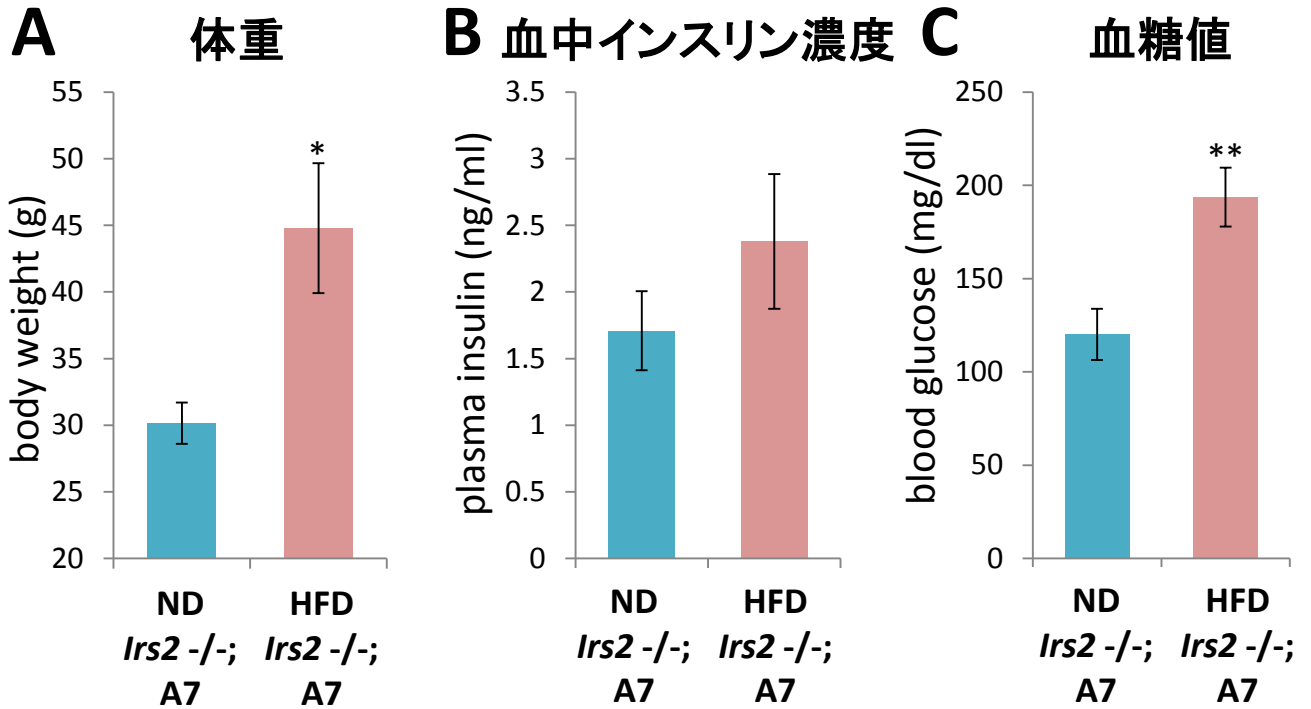


Fig. 20 15か月齢 *Irs2*^{-/-};A7マウスのHFD負荷による代謝性指標の変化

Irs2^{-/-};A7マウスにおいて、15か月齢における体重値 (A)、血中インスリン濃度 (B) 及び空腹時の血中グルコース濃度の測定 (C) を行った。

高齢の*Irs2*^{-/-};A7マウスでは、HFD負荷により体重値や血中インスリン濃度、血中グルコース濃度の上昇見られ、HFD負荷群と同様に糖尿病病態を示した。

(n=6; t-test, *p<0.05**p<0.01; mean ± SEM)

15か月齢♀A7

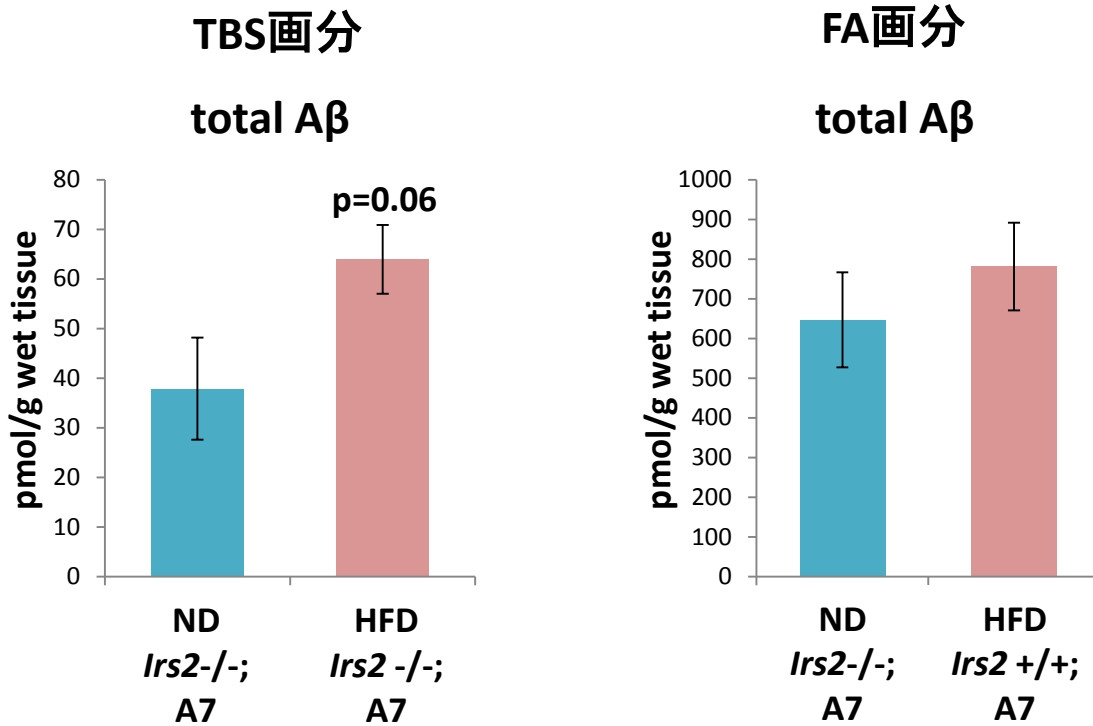


Fig. 21 15か月齢 *Irs2*^{-/-};A7マウスの大脳皮質における総Aβ量

15か月齢♀ *Irs2*^{-/-};A7マウスにおいて、代謝負荷時の大脳皮質における総Aβ量をWBにより測定した。*Irs2*^{-/-};A7マウスは、HFD負荷により可溶性の総Aβ量に増加傾向が見られた。(n=6; t-test; mean ± SEM)

15か月齢♀A7

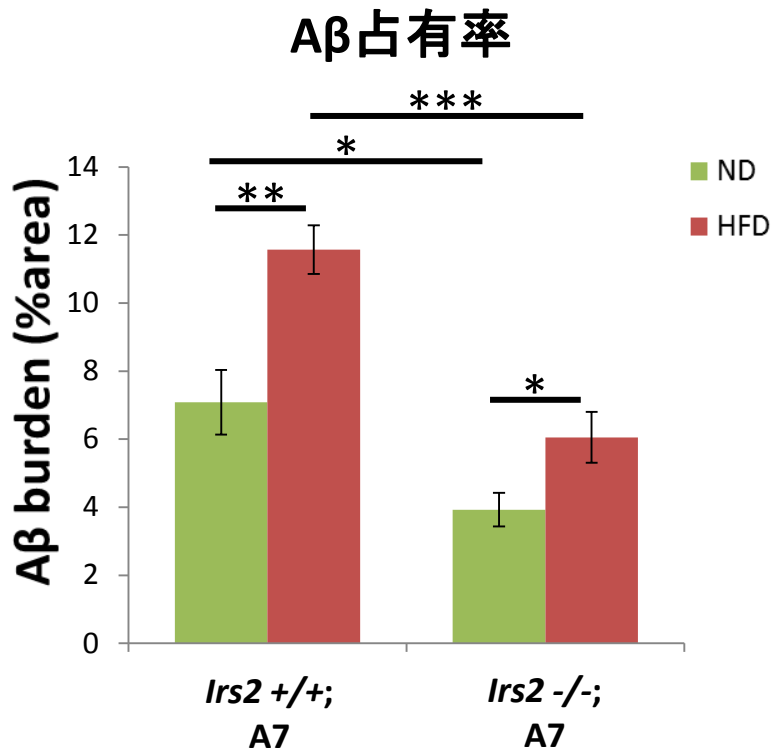


Fig. 22 15か月齢 HFD負荷による*Irs2*+/+;A7マウス及び*Irs2*-/-;A7マウスの脳内A β 蓄積量変化

15か月齢♀ *Irs2*+/+;A7マウス及び*Irs2*-/-;A7マウスの脳におけるA β 斑占有率を定量し評価した。IRS-2の欠損により、HFD負荷によるA β 蓄積の増加は抑制された。同時に、HFD負荷によりIRS-2欠損の有無にかかわらずA β 蓄積は有意に増加した。

(n=5-6; Tukey-Kramer, *p<0.05**p<0.01***p<0.005; mean \pm SEM)

10か月齢♂A7_脂肪組織

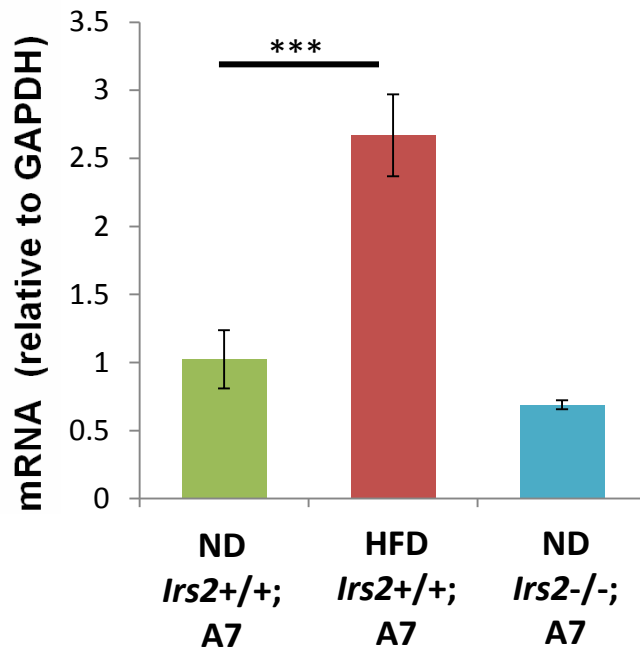


Fig. 23 10か月齢 HFD負荷による脂肪組織の炎症性シグナル分子のmRNA発現量の変化 (A7♀)

10か月齢 ♀A7マウスの脂肪組織における、TNF α のmRNA発現量をqRT-PCR法により測定した。HFD負荷により、A7マウスではTNF α の発現量が顕著に増加した。一方、IRS-2欠損では発現量は変化しなかった。

(n=6-9; Tukey-Kramer, *** p<0.005; mean \pm SEM)

15か月齢♀A7 脂肪組織

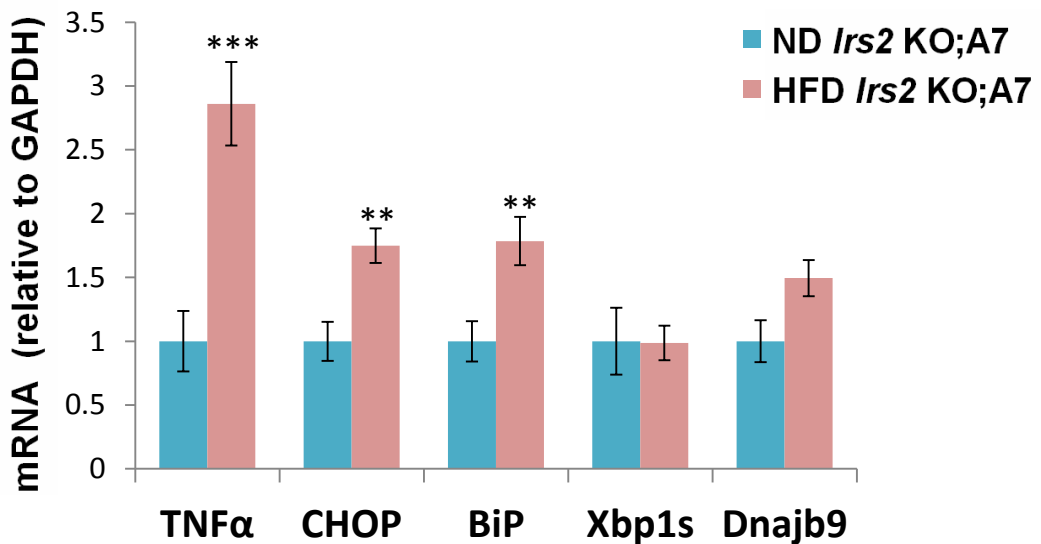


Fig. 24 15か月齢 HFD負荷による脂肪組織の炎症性・小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (A7♀)

15か月齢♀A7マウスの脂肪組織における、代表的な炎症性・小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量をqRT-PCR法により測定した。HFD負荷により、IRS-2欠損A7マウスでは、TNFα、CHOP、BiPのmRNA発現量に有意な増加が観察された。
(n=4-6; t-test, **p<0.01 ***p<0.005; mean ± SEM)

15か月齢♀A7 脂肪組織

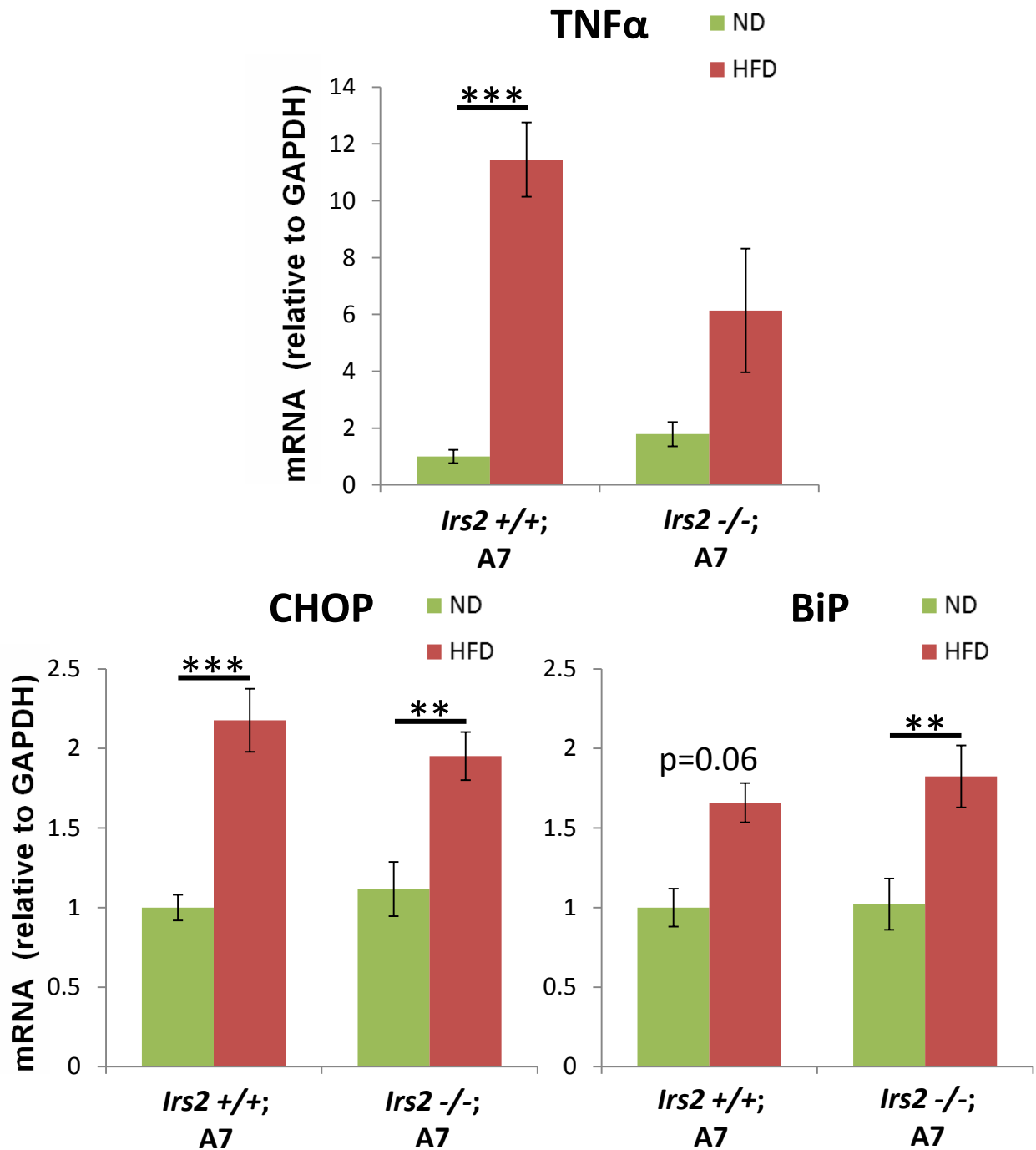


Fig. 25 15か月齢 HFD負荷による脂肪組織の炎症性・小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量変化の比較 (A7♀)

15か月齢♀A7マウスの脂肪組織において、TNF α 、CHOP、BiPのmRNA発現量を*Irs2*+/+; A7マウスと*Irs2*-/-; A7マウスで比較検討した。HFD負荷により、IRS-2欠損の有無にかかわらず、炎症性シグナル分子及び小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量は増加した。

(n=5-6; Tukey-Kramer, **p<0.01 ***p<0.005; mean \pm SEM)

5か月齢♂WT 脂肪組織

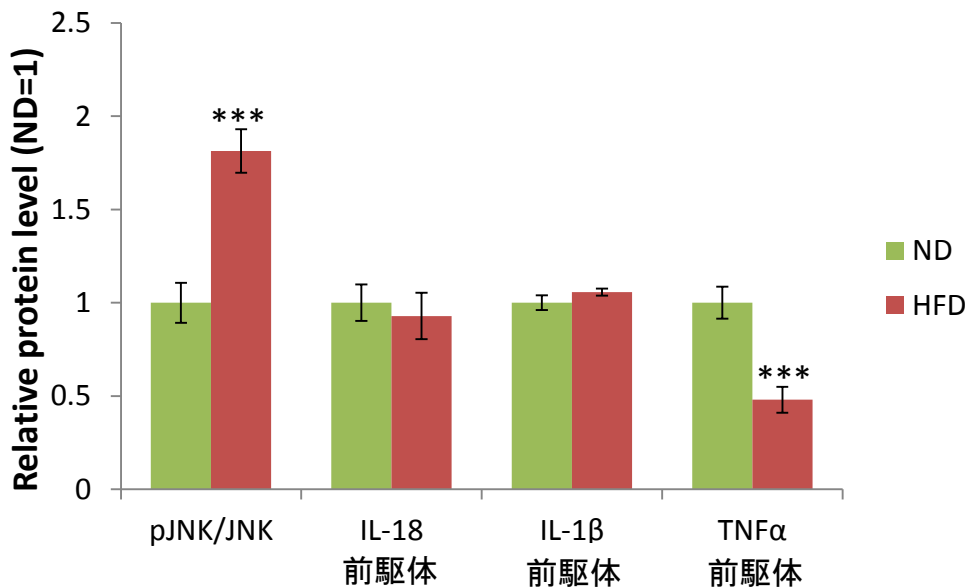
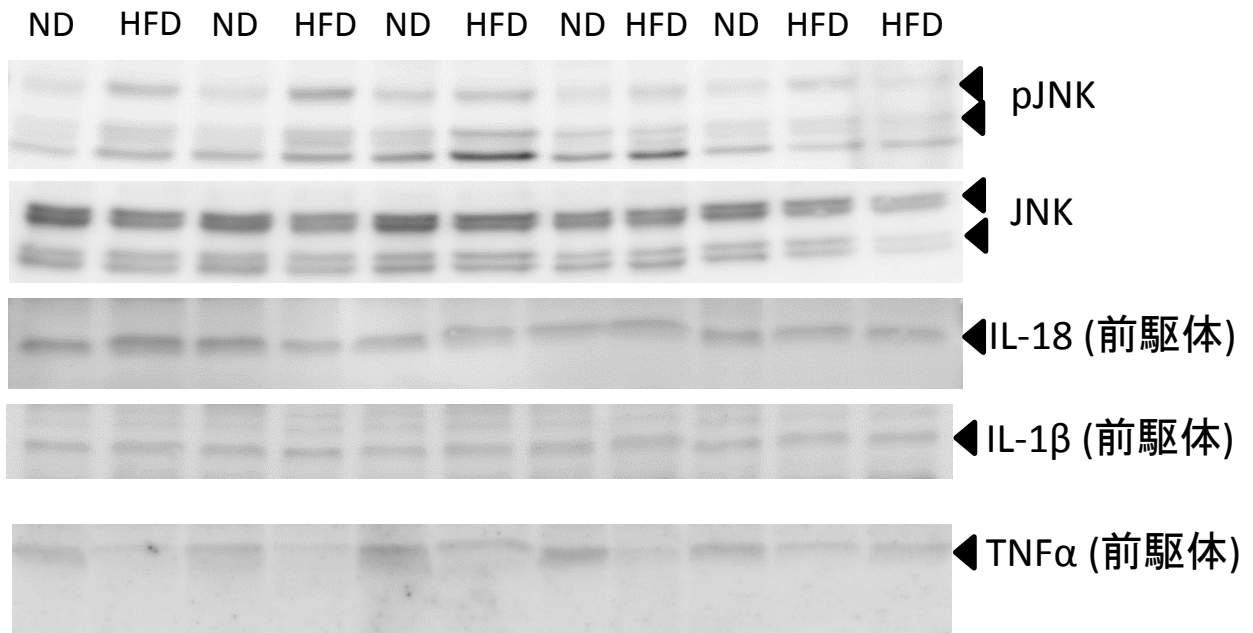


Fig. 26 5か月齢 HFD負荷による脂肪組織の炎症性シグナル分子発現量の変化 (WT♂)

5か月齢♂WTマウスの脂肪組織における、代表的な炎症性シグナル分子のタンパク発現量をWB法により測定した。HFD負荷により、JNKのリン酸化率に有意な増加が見られ、TNFα前駆体の発現量は有意に減少した。

(n=5-6; t-test, ***p<0.005; mean±SEM)

5か月齢♂WT 視床下部

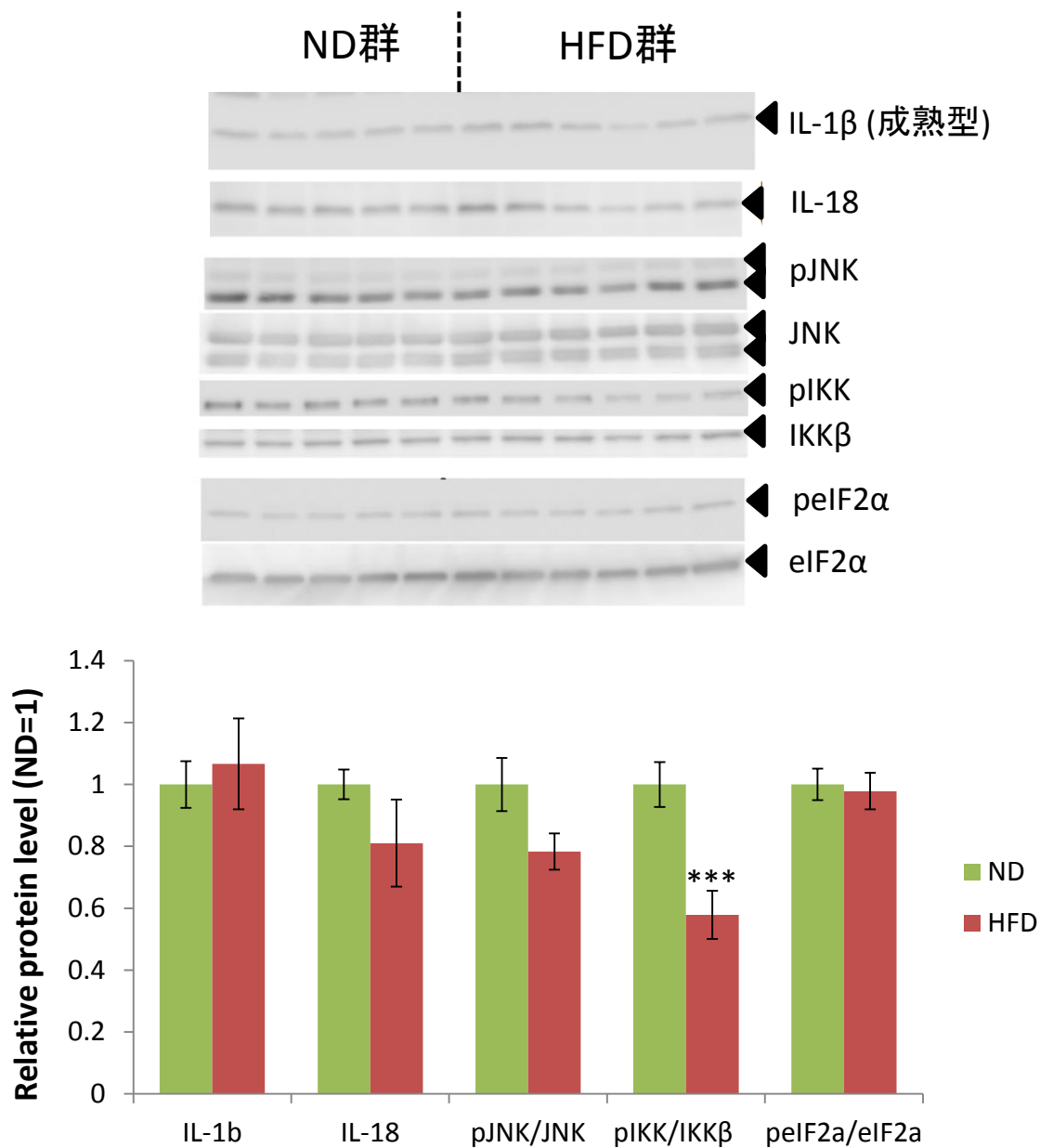


Fig. 27 5か月齢 HFD負荷による脳内の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化(WT♂)

5か月齢♂WTマウスの視床下部における、代表的な炎症性シグナル分子及び小胞体ストレスシグナル分子 ((p) ϵ IF2 α) のタンパク発現量をWBにより測定した。HFD負荷により、視床下部のIKKリン酸化比率に有意な低下が見られたが、それ以外に顕著なタンパクレベルの発現量変化は観察できなかった。

(n=5-6; t-test, ***p<0.005; mean \pm SEM)

5か月齢♂WT 海馬

ND群

HFD群

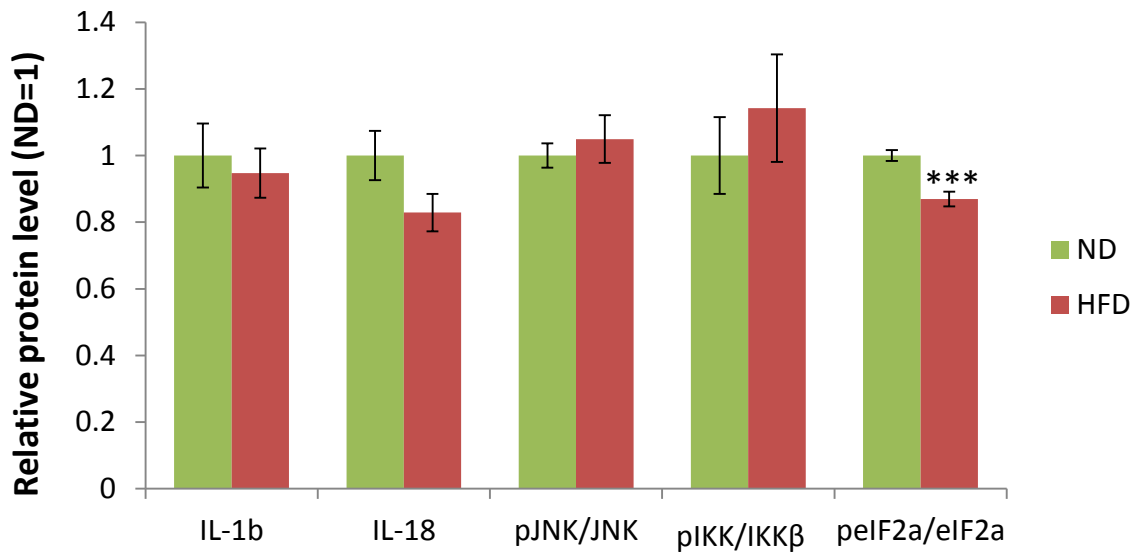
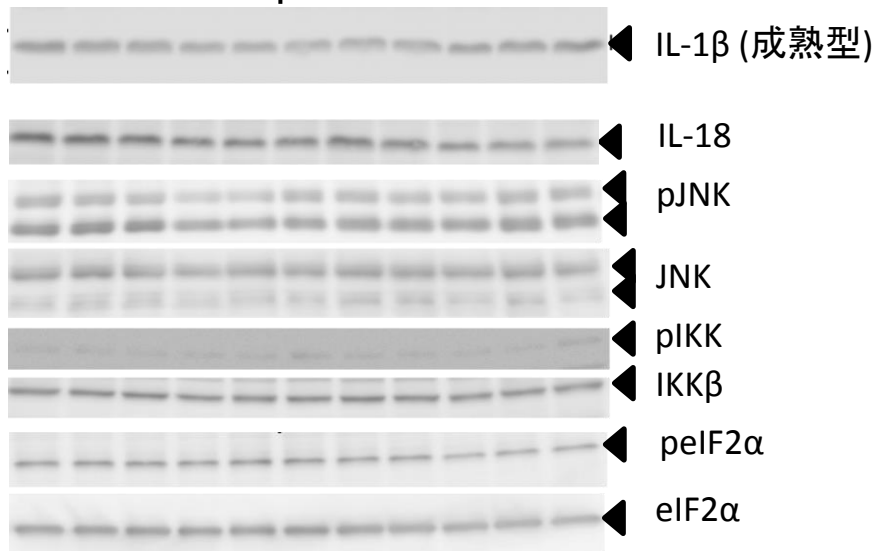


Fig. 28 5か月齢 HFD負荷による脳内の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (WT♂)

5か月齢♂WTマウスの海馬における、代表的な炎症性シグナル分子及び小胞体ストレスシグナル分子 ((p)eIF2α) のタンパク発現量をWBにより測定した。HFD負荷により、eIF2αのリン酸化率に有意な低下が見られたが、それ以外に顕著なタンパクレベルの発現量変化は観察できなかった。(n=5-6; t-test, ***p<0.005; mean ± SEM)

6か月齢♂A7 視床下部

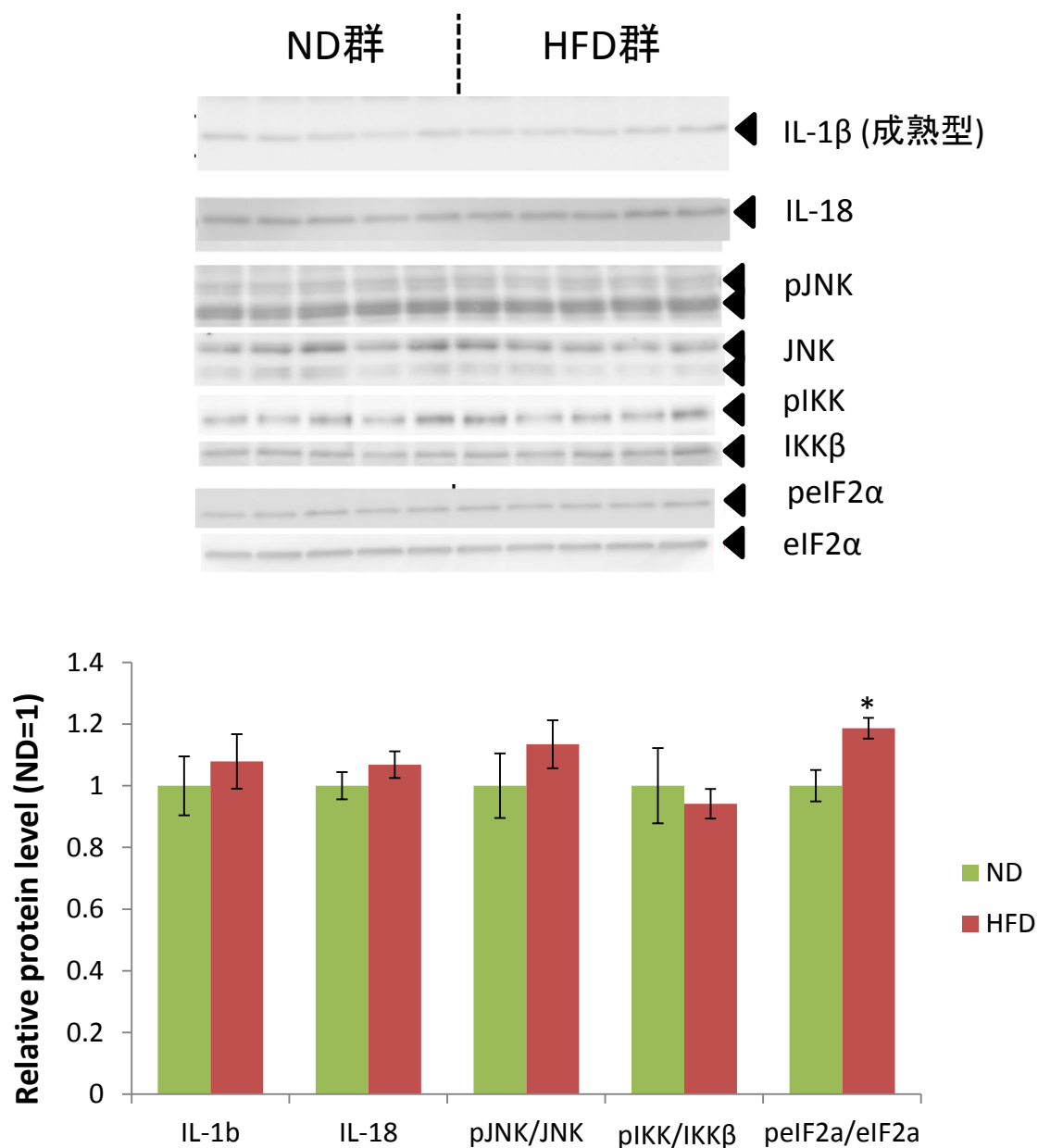


Fig. 29 6か月齢 HFD負荷による脳内の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (A7♂)

6か月齢♂A7マウスの視床下部における、代表的な炎症性シグナル分子及び小胞体ストレスシグナル分子 ((p)eIF2α) のタンパク発現量をWBにより測定した。HFD負荷によりeIF2αのリン酸化率が有意に増加していたが、それ以外に顕著なタンパクレベルの発現量変化は観察できなかった。(n=5; t-test, *p<0.05; mean±SEM)

6か月齢♂A7 海馬

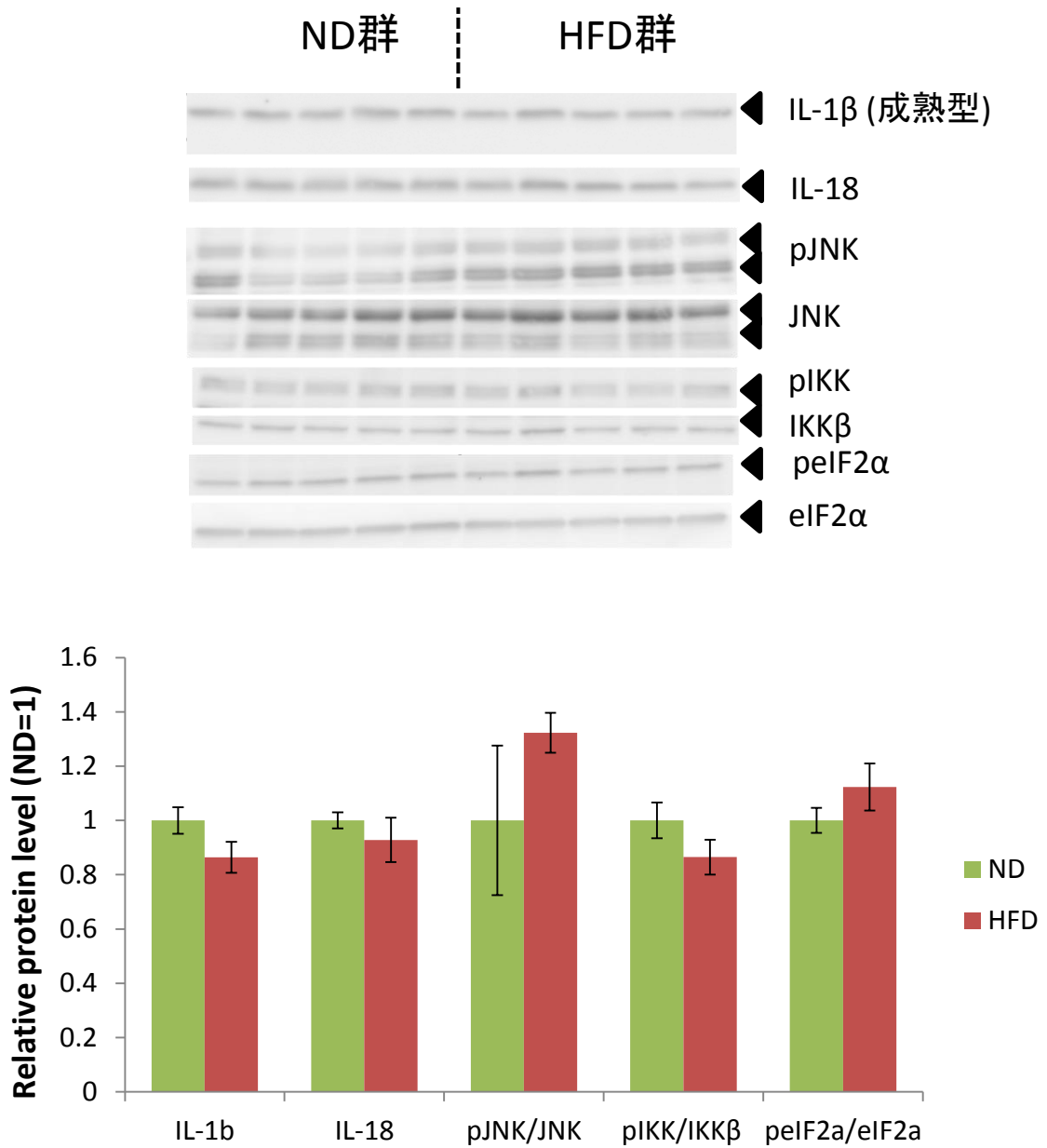


Fig. 30 6か月齢 HFD負荷による脳内の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (A7♂)

6か月齢♂A7マウスの海馬における、代表的な炎症性シグナル分子及び小胞体ストレスシグナル分子 ((p) ϵ IF2 α) のタンパク発現量をWBにより測定した。HFD負荷による顕著なタンパクレベルの発現量変化は観察できなかった。

(n=5; t-test; mean \pm SEM)

5か月齢♂
WTマウス

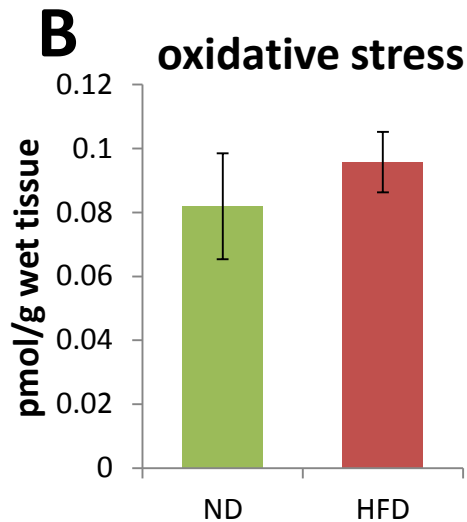
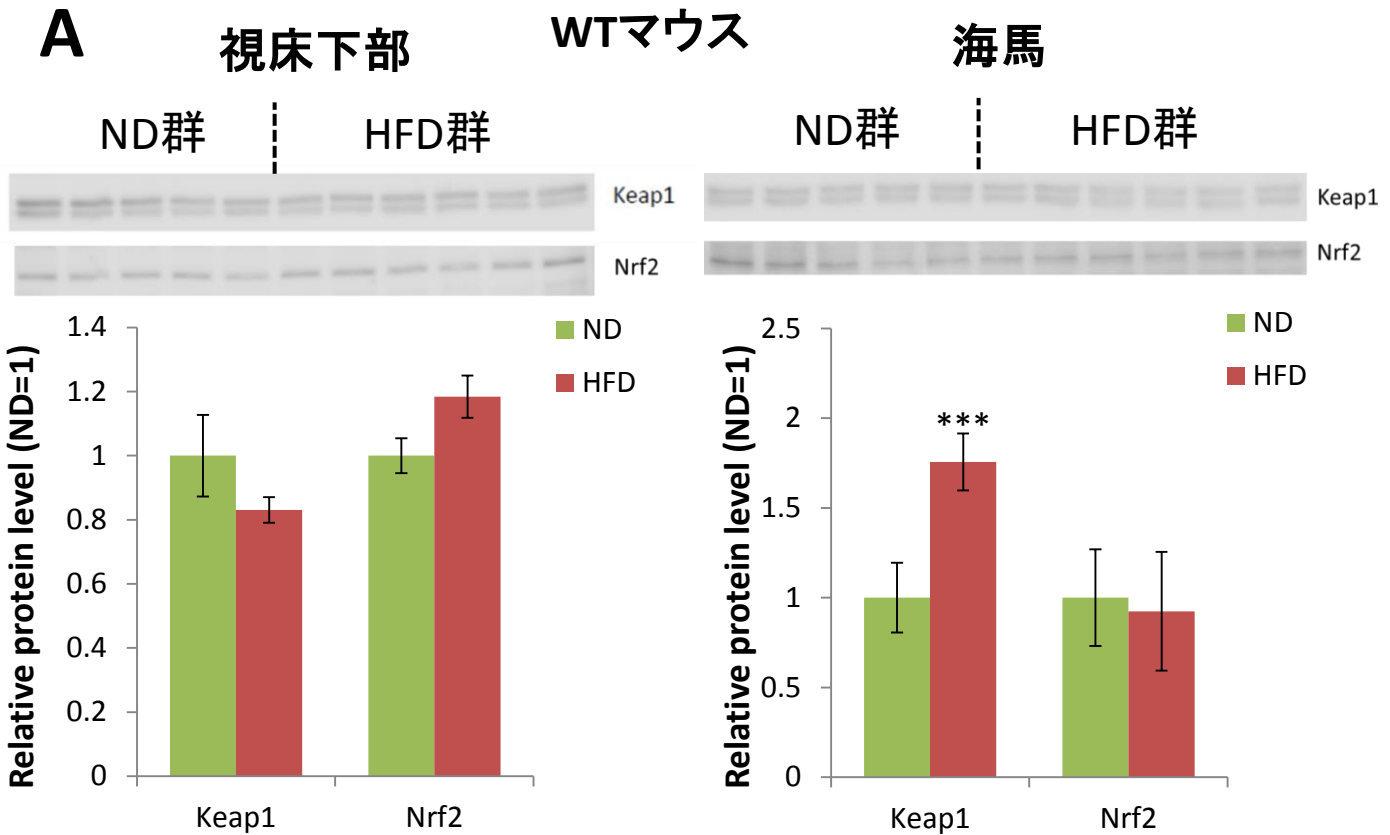


Fig. 31 5か月齢 HFD負荷による脳内の酸化ストレス関連シグナル分子のタンパク発現量の変化、及び酸化ストレス活性の測定 (WT♂)

視床下部及び海馬における、代表的な酸化ストレス関連シグナル分子 (Keap1, Nrf2) のタンパク発現量をWBにより測定した (A)。また、海馬におけるタンパクカルボニル化をELISAにより測定することにより、酸化ストレスの活性を評価した (B)。

HFD負荷によりKeap1の発現量は海馬で有意に増加したが、Nrf2の発現量は視床下部・海馬共に変化しなかった。また、酸化ストレスの活性にも変化は見られなかった。

(n=5-6; t-test, *p<0.05; mean ± SEM)

6か月齢♂
A7マウス

視床下部

海馬

ND群

HFD群

ND群

HFD群

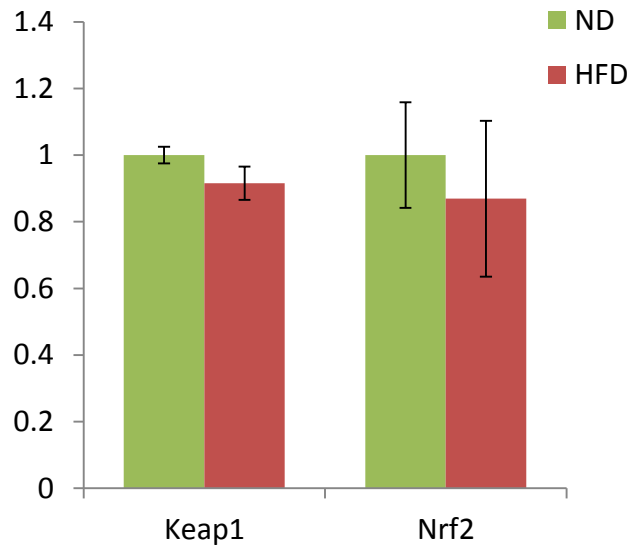
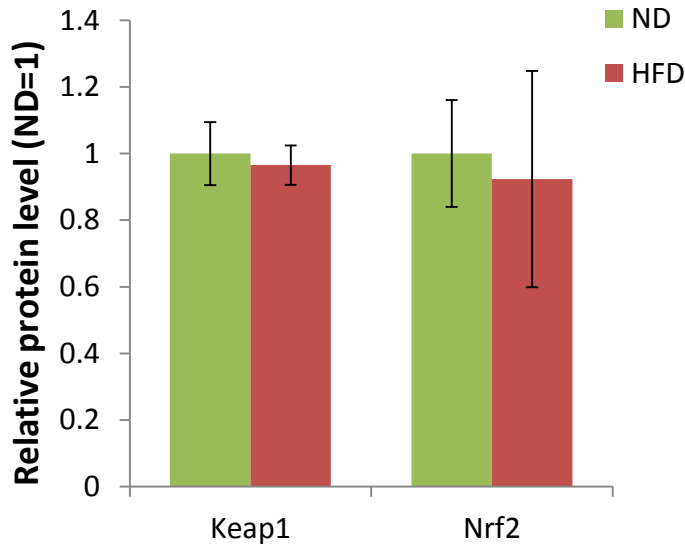
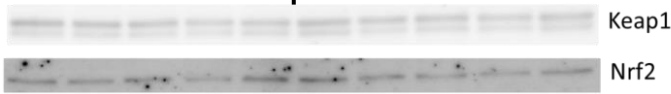


Fig. 32 6か月齢 HFD負荷による脳内の酸化ストレス関連シグナル分子のタンパク発現量の変化 (A7♂)

6か月齢♂A7マウスの視床下部及び海馬における、代表的な酸化ストレス関連シグナル分子 (Keap1, Nrf2) のタンパク発現量をWBにより測定した。測定したシグナル分子に関して、タンパクレベルでの発現量変化は見られなかった。

(n=5; t-test; mean ± SEM)

9か月齢♂WT

視床下部

海馬

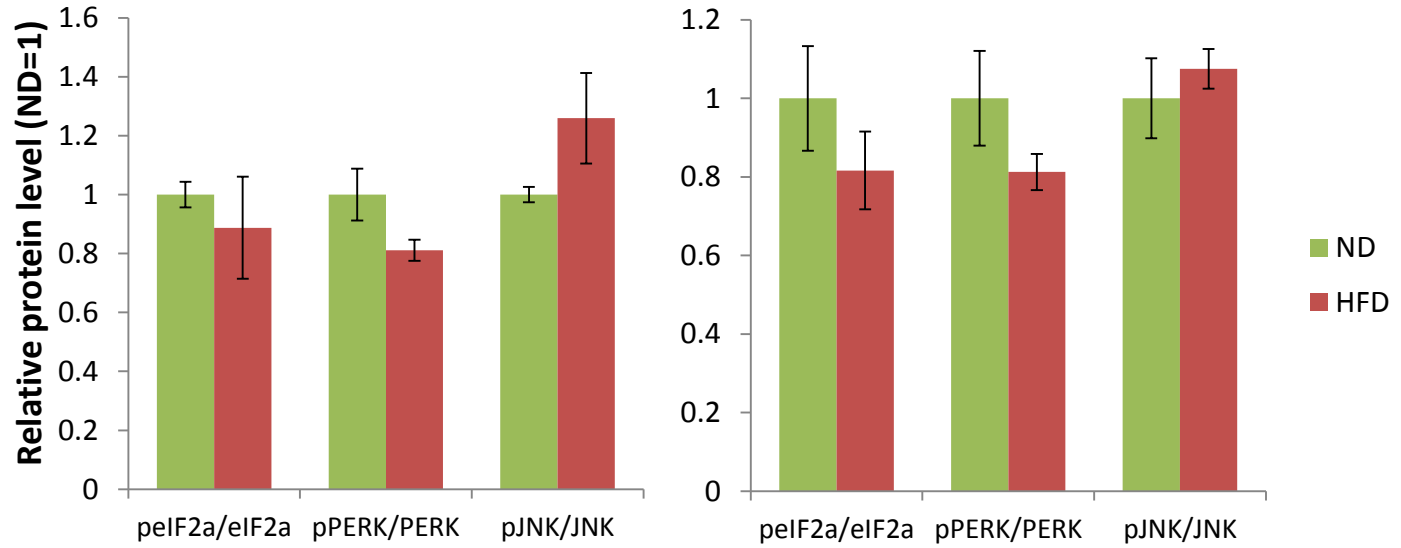
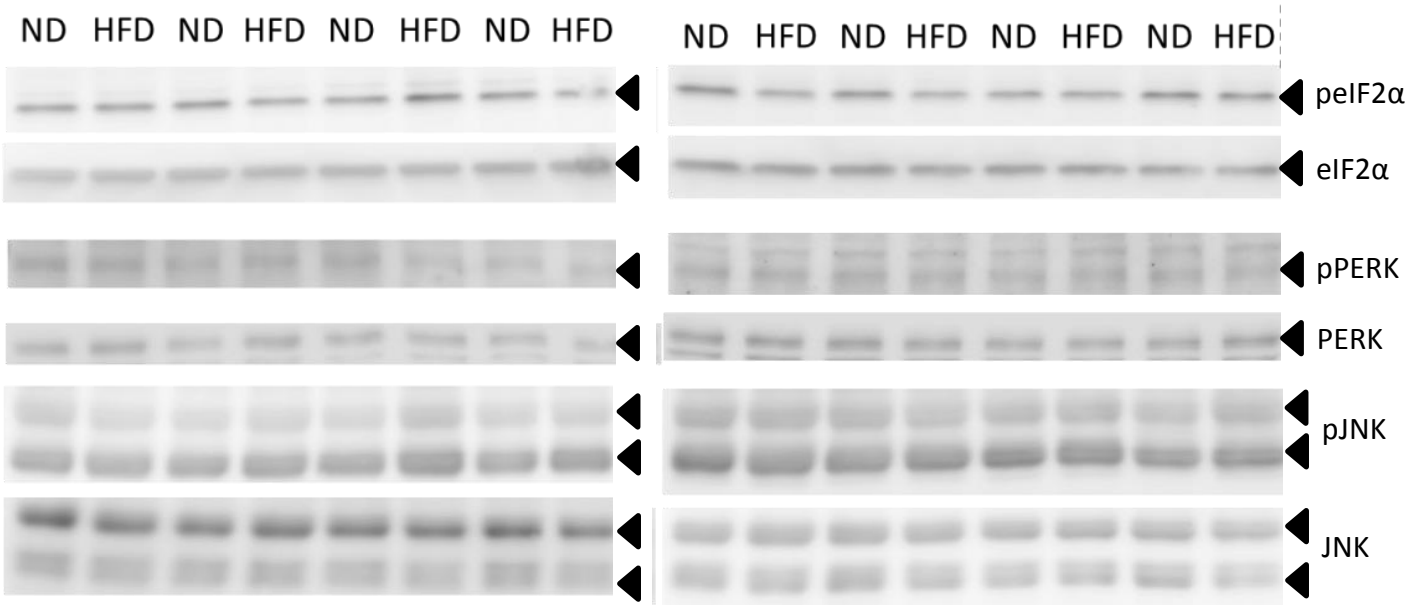


Fig. 33 9か月齢 HFD負荷による脳内の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (WT♂)

9か月齢♂WTマウスの視床下部・海馬における、eIF2α、PERK、JNKのタンパクレベルでのリン酸化比率をWBにより測定した。HFD負荷によるタンパク発現量の有意な変化は見られなかった。(n=4; t-test; mean ± SEM)

18か月齢♂WT

視床下部

海馬

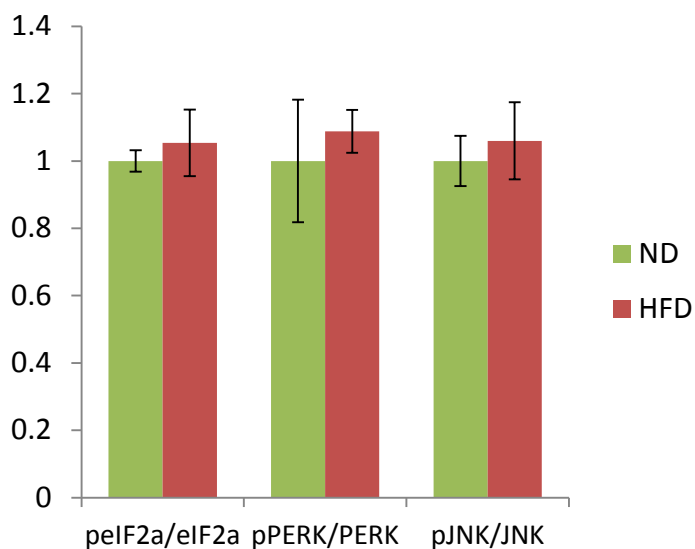
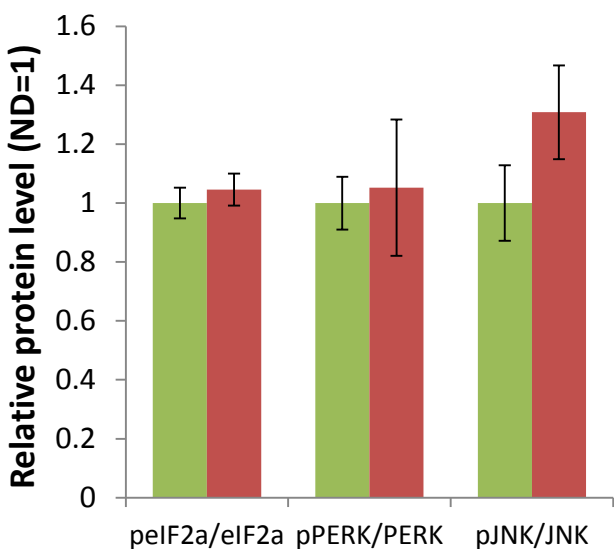
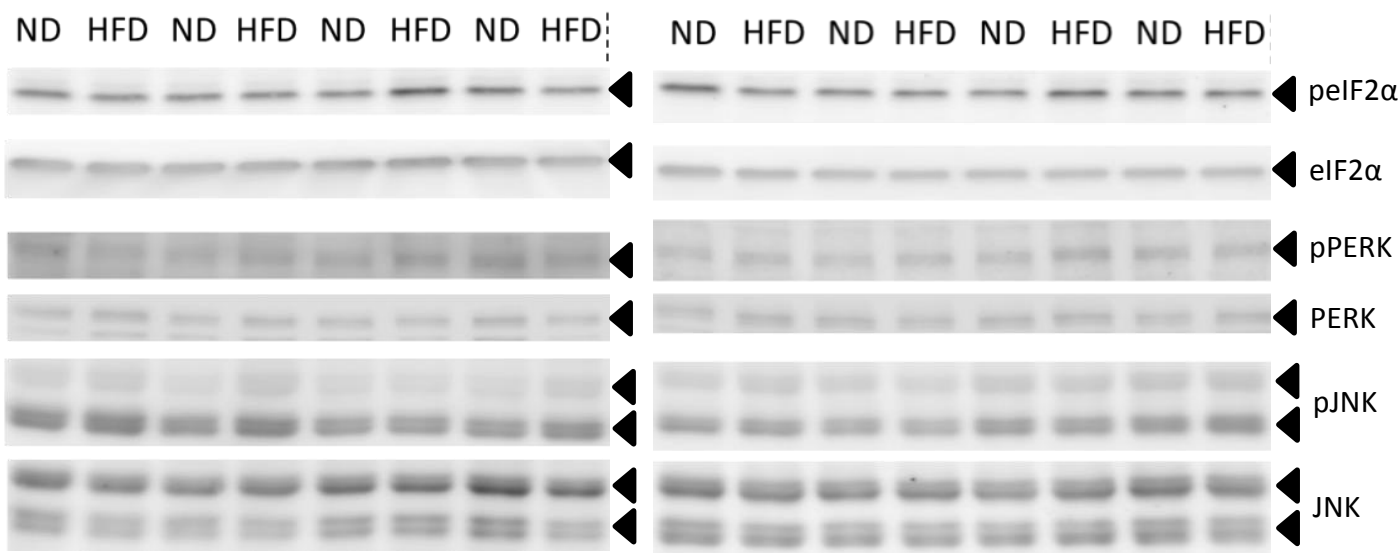


Fig. 34 18か月齢 HFD負荷による脳内の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (WT♂)

18か月齢♂WTマウスの視床下部・海馬における、eIF2α、PERK、JNKのタンパクレベルでのリン酸化比率をWBにより測定した。HFD負荷によるタンパク発現量の有意な変化は見られなかった。(n=4; t-test; mean ± SEM)

9か月齢♂ 脂肪組織

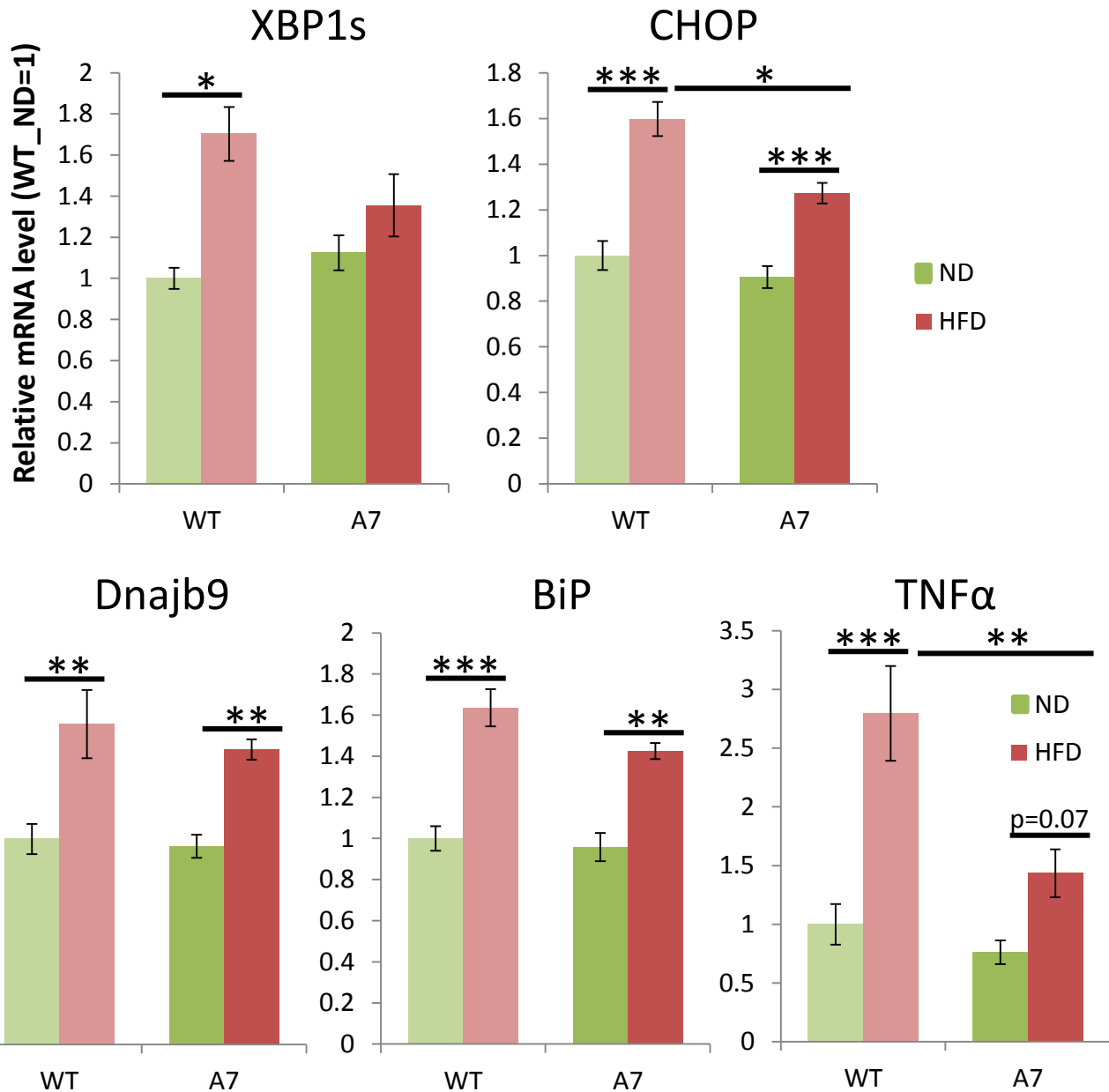
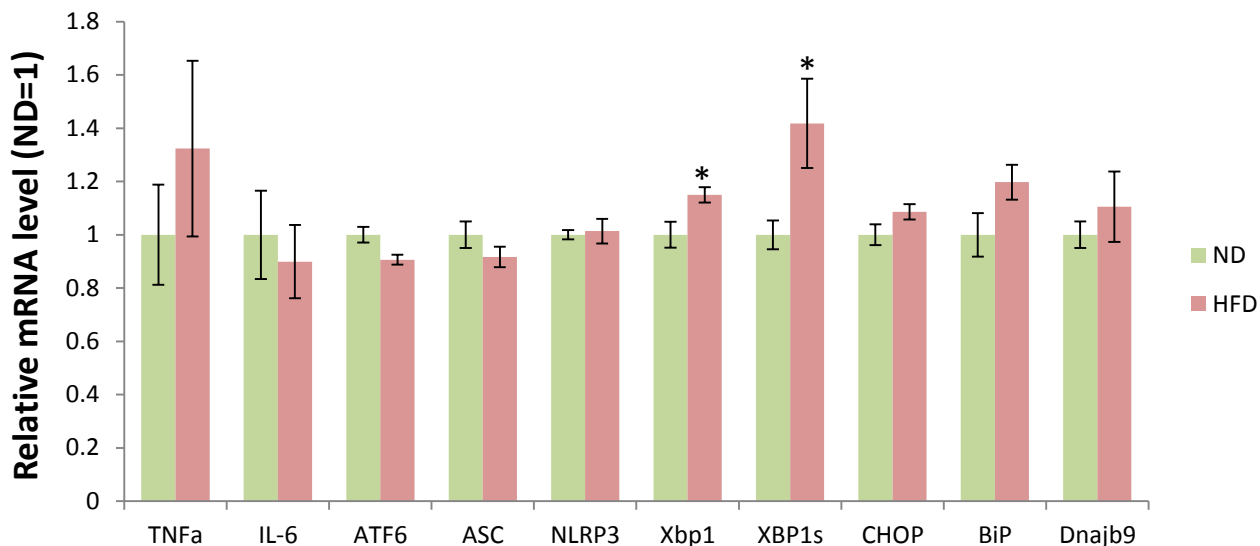


Fig. 35 9か月齢 HFD負荷による脂肪組織の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂、A7♂)

9か月齢♂WTマウス及びA7マウスの脂肪組織における、TNFα及び代表的な小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量をqRT-PCR法により測定した。HFD負荷により、WTマウス、A7マウス共に測定した各シグナル分子においてmRNA発現量に有意な増加が見られた。(n=4-9; Tukey-Kramer, *p<0.05**p<0.01***p<0.005; mean±SEM)

6か月齢♂海馬

WT



A7

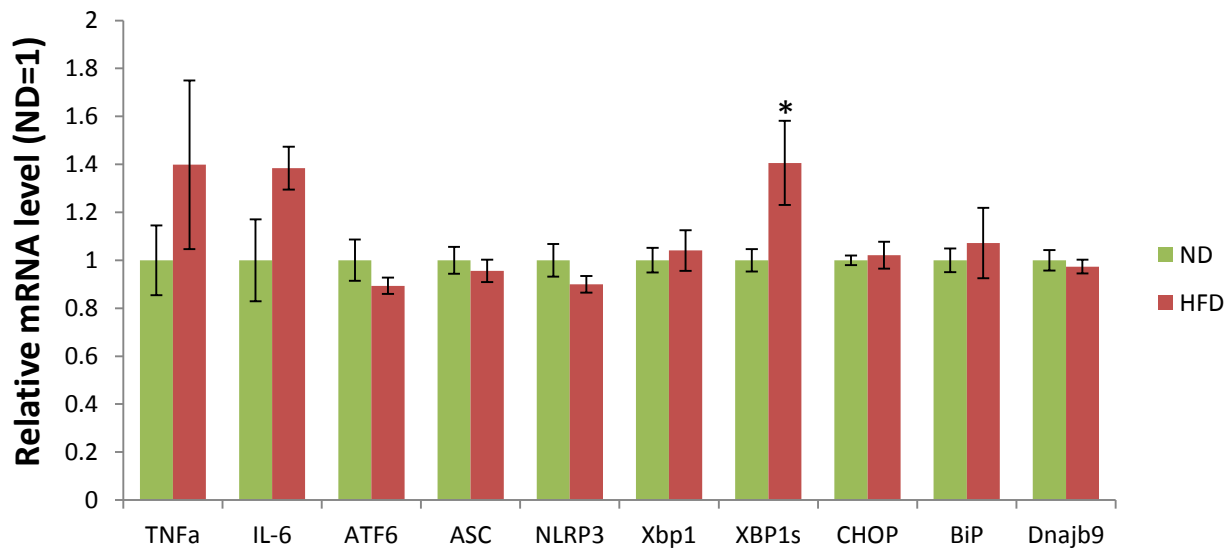


Fig. 36 6か月齢 HFD負荷による海馬の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化(WT♂、A7♂)

6か月齢♂WTマウス及びA7マウスの海馬における、代表的な炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量をqRT-PCR法により測定した。HFD負荷により、WTマウス、A7マウス共にXBP1sの発現量に有意な増加が観察された。

(n=5; t-test, *p<0.05; mean \pm SEM)

9か月齢♂海馬

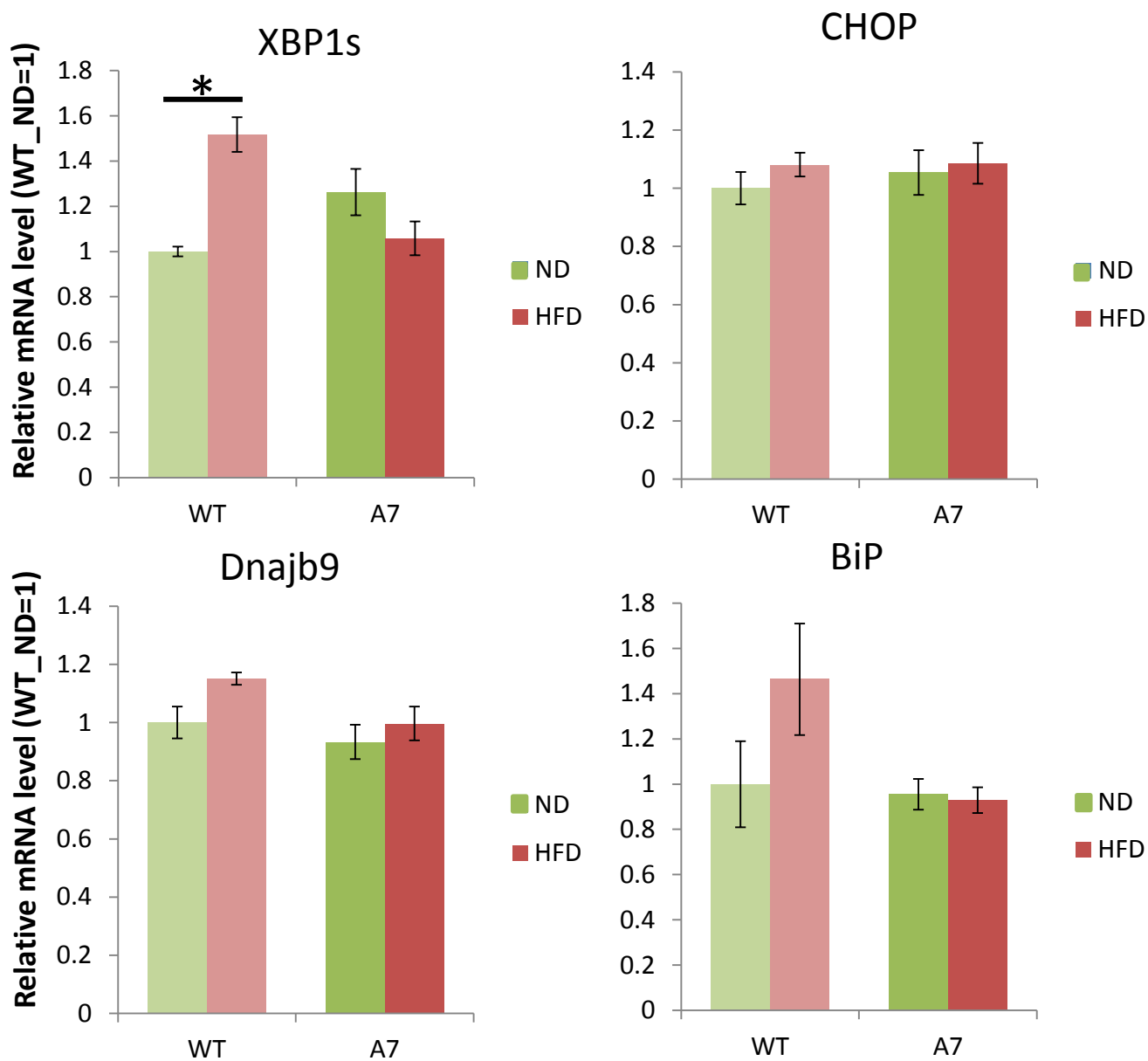


Fig. 37 9か月齢 HFD負荷による海馬の小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂、A7♂)

9か月齢♂WTマウス及びA7マウスの海馬における、代表的な小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量をqRT-PCR法により測定した。HFD負荷により、WTマウスにおいてのみXBP1sの発現量に有意な増加が見られた。

(n=4-9; Tukey-Kramer, *p<0.05; mean ± SEM)

18か月齢♂WT 海馬

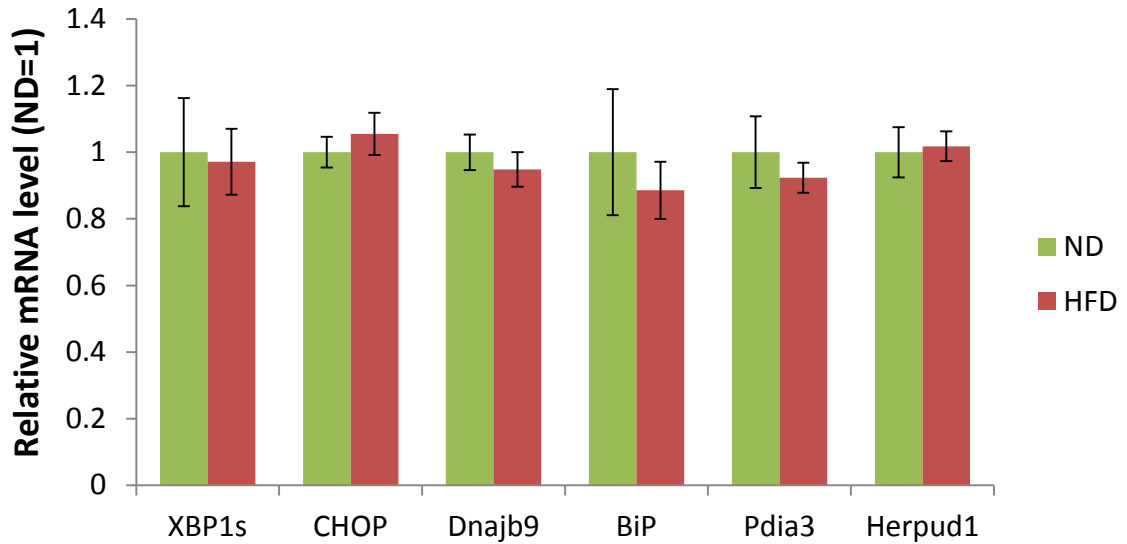


Fig. 38 18か月齢 HFD負荷による脳内の小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂)

18か月齢♂WTマウスの海馬における、小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量を測定した。HFD負荷による有意な変化は見られなかった。
(n=4; t-test; mean ± SEM)

5か月齢♂WT 肝臓

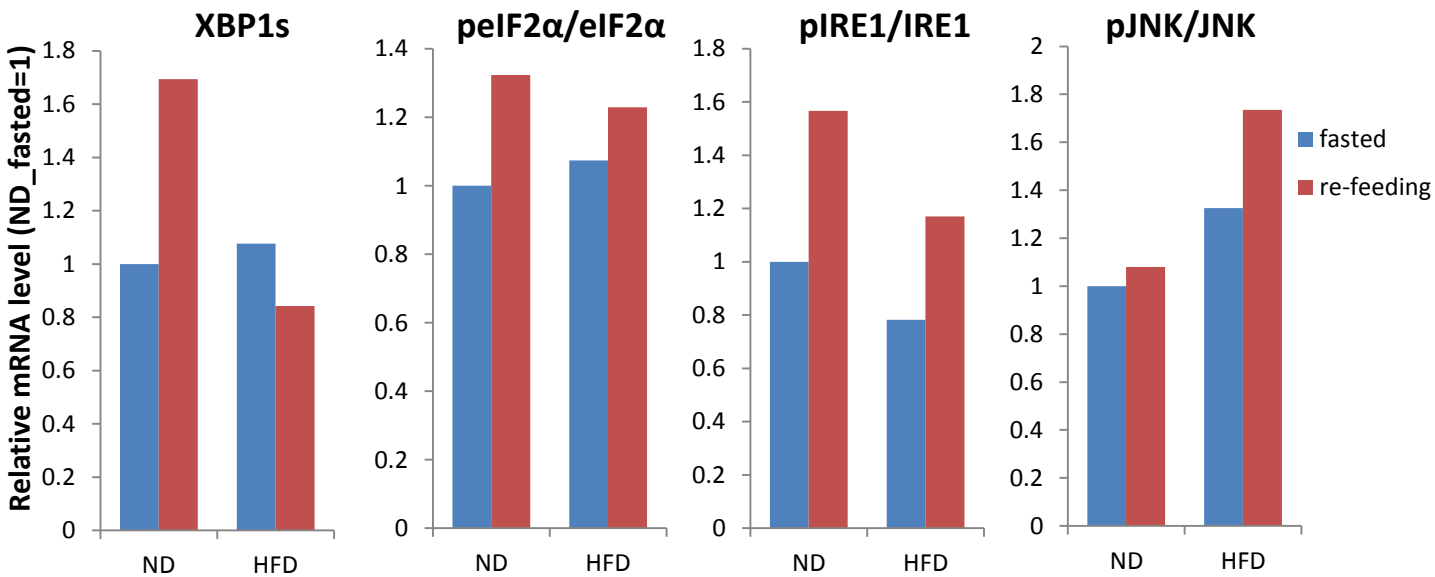
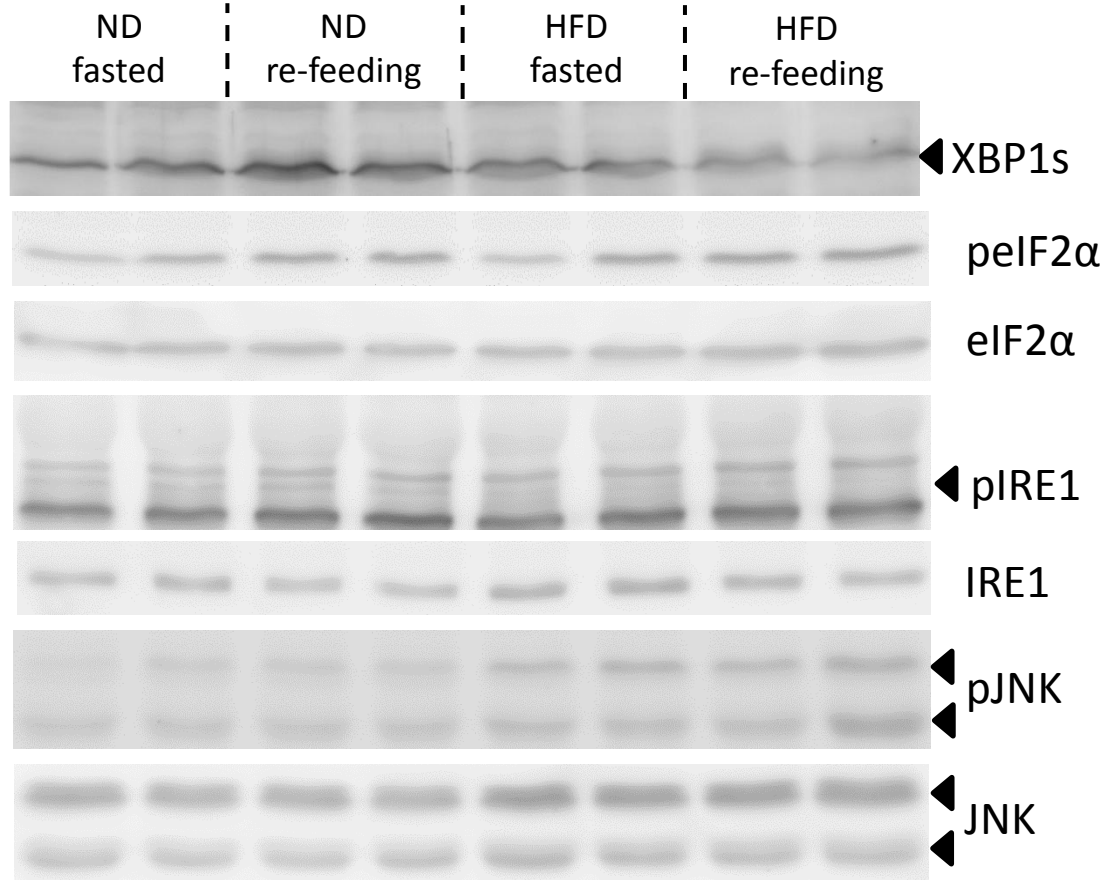


Fig. 39 5か月齢 Re-feedingによる肝臓の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (WT♂)

5か月齢♂WTマウスの肝臓において、炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量を測定した。Re-feedingによりND群でXBP1sの発現量が大きな増加を示した一方、HFD群では大きな変化は認められなかった。また、peIF2α及びpIRE1に関しては、HFD群において再給餌による発現量の上昇が僅かに抑えられていた。(n=2)

5か月齢♂WT 海馬

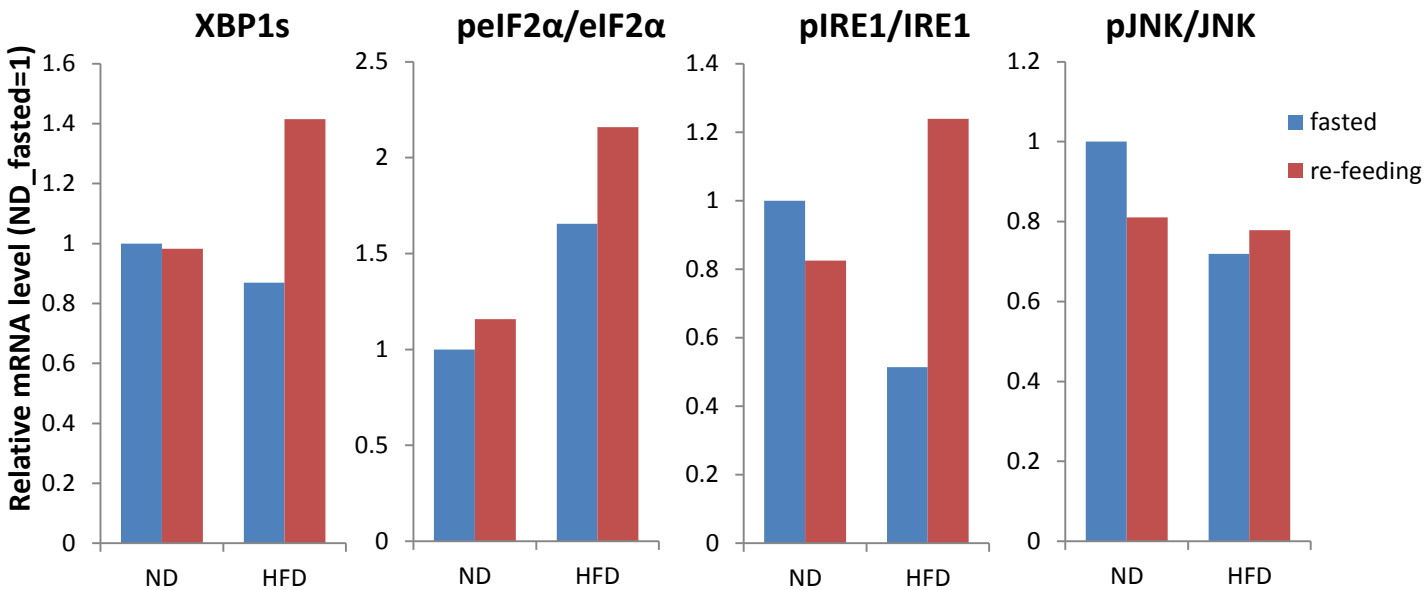
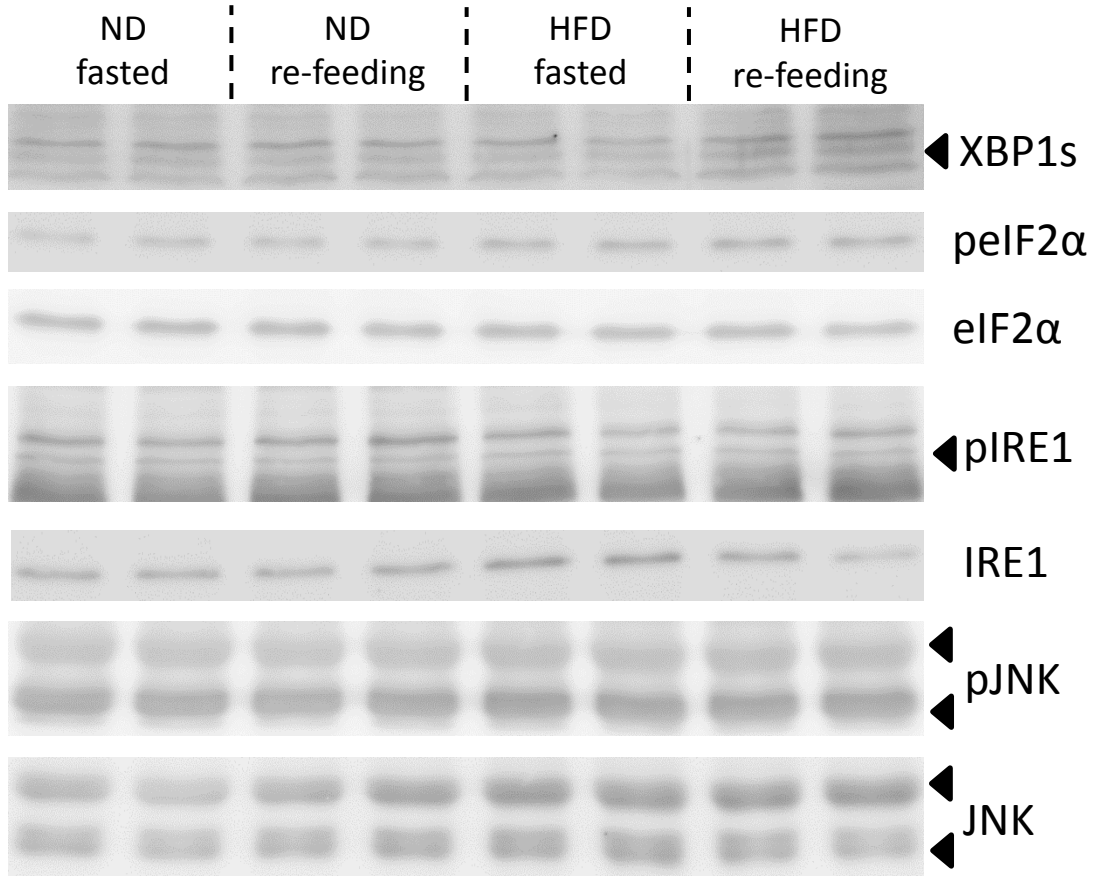


Fig. 40 5か月齢 Re-feedingによる海馬の炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量の変化 (WT♂)

5か月齢♂WTマウスの海馬において、炎症性及び小胞体ストレスシグナル分子のタンパク発現量を測定した。測定したシグナル分子に関して、ND群でre-feedingによるタンパク発現量の顕著な上昇は見られなかった。(n=2)

5か月齢♂WT_視床下部

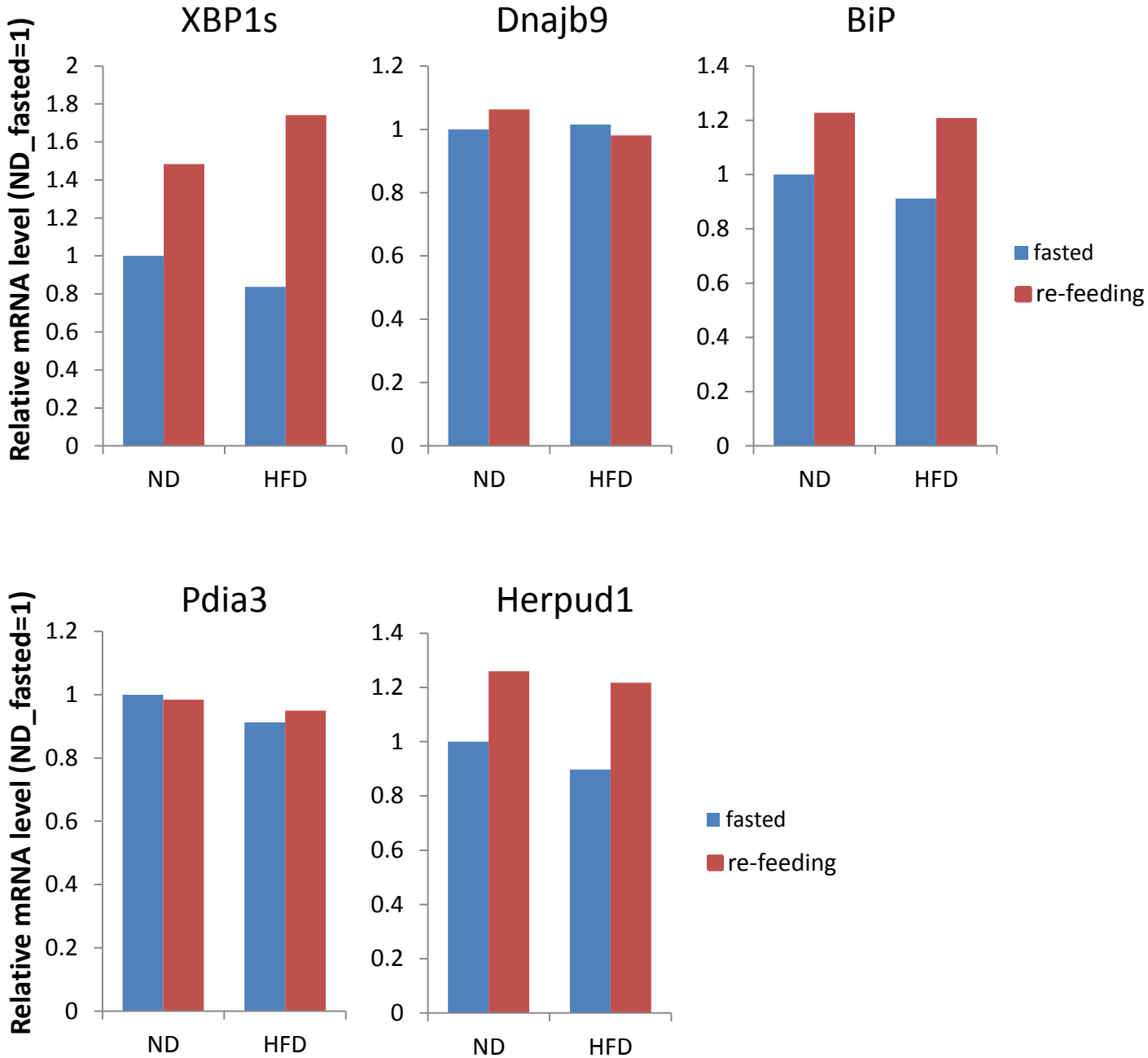


Fig. 41 5か月齢 Re-feedingによる小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂)

5か月齢♂WTマウスの視床下部において、小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量を測定した。re-feedingにより、XBP1s、BiP及びHerpud1の発現量の上昇がND群、HFD群共に観察された。(n=2)

5か月齢♂WT 大脳皮質

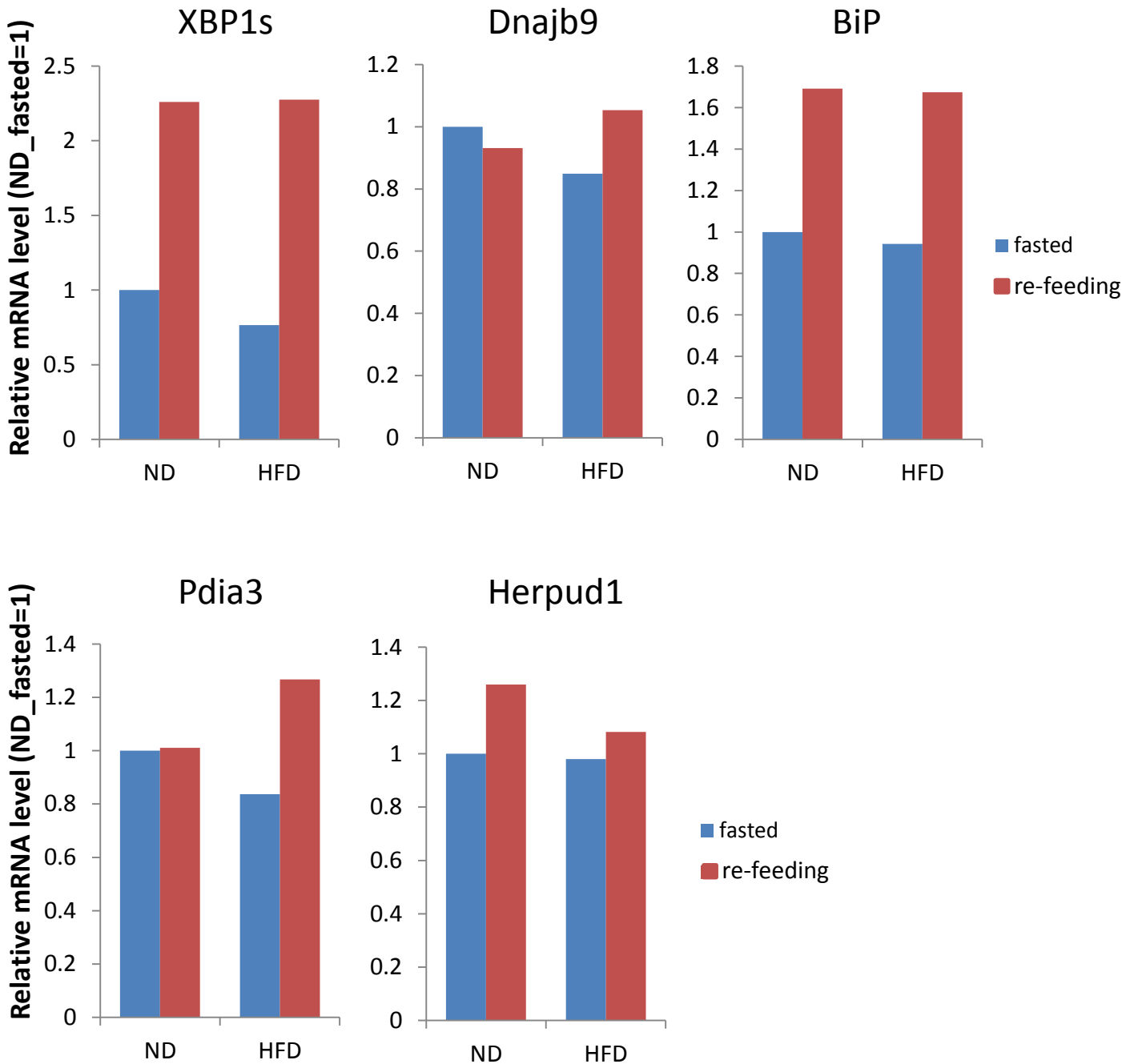


Fig. 42 5か月齢 Re-feedingによる小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂)

5か月齢♂WTマウスの大脳皮質において、小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量を測定した。re-feeding処理により、XBP1s、BiP及びHerpud1の発現量の上昇がND群、HFD群共に観察された。(n=2)

6か月齢♂_肝臓

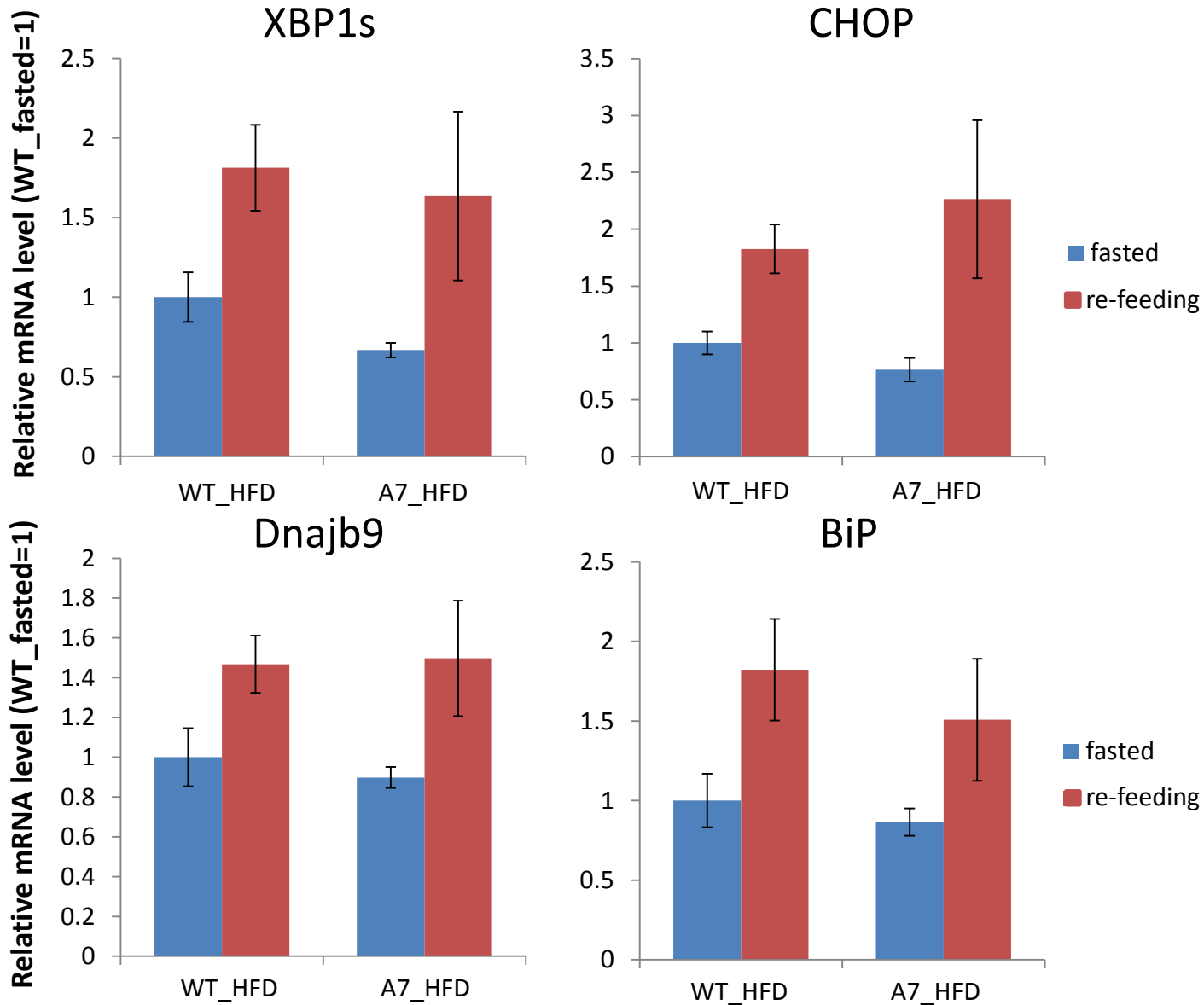


Fig. 43 6か月齢 HFD群におけるre-feedingによる小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂、A7♂)

6か月齢♂WTマウス及びA7マウスの肝臓において、小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量を測定した。re-feedingにより、WTマウス、A7マウス共に各種シグナル分子の発現量が上昇傾向を示した。

(n=4; Tukey-Kramer; mean ± SEM)

6か月齢♂_大脳皮質

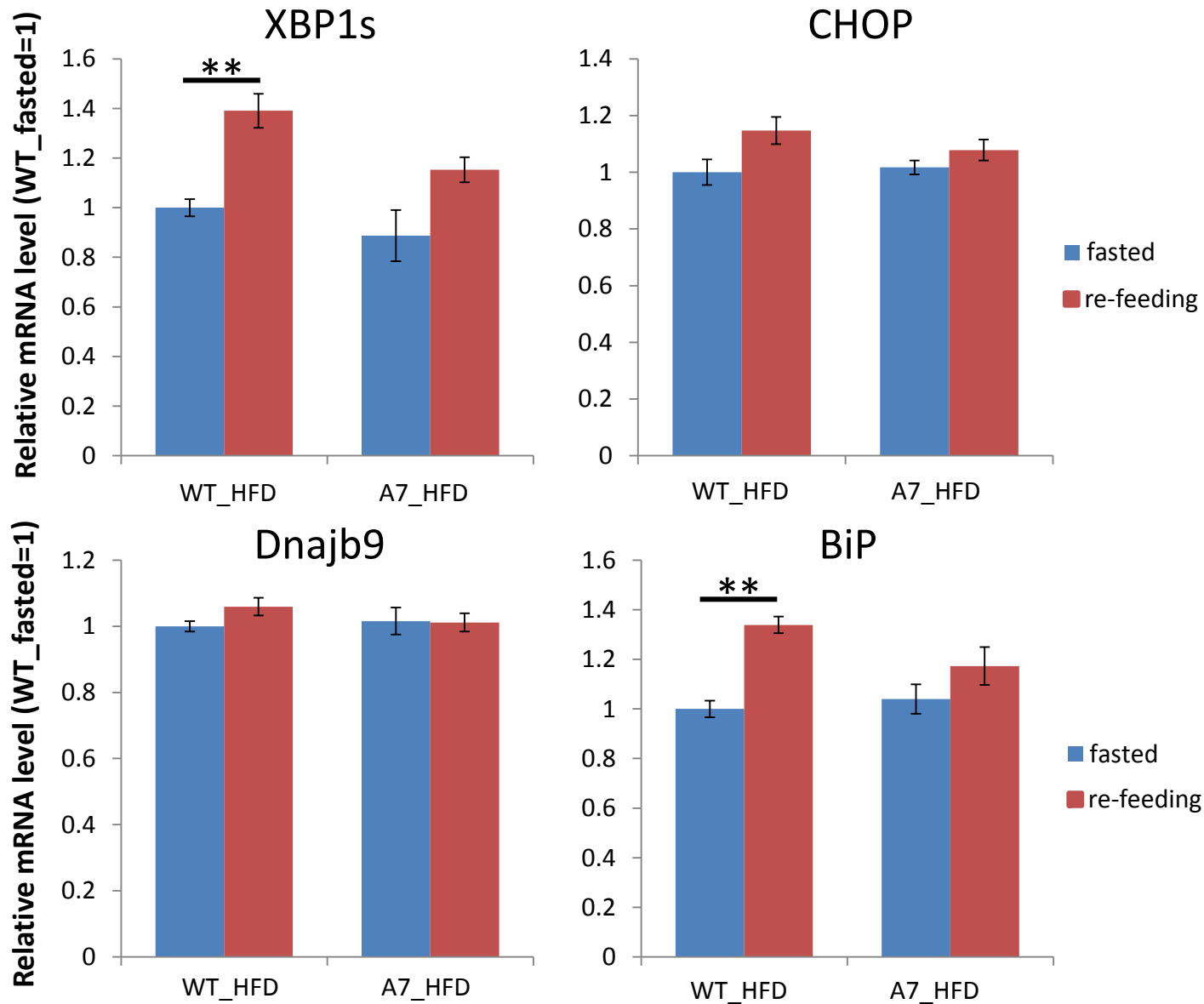


Fig. 44 6か月齢 HFD群におけるre-feedingによる小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂、A7♂)

6か月齢♂WTマウス及びA7マウスの大脳皮質において、小胞体ストレスシグナル分子の mRNA発現量を測定した。re-feedingにより、WTマウスのみXBP1s及びBiPの発現量が有意に増加した。

(n=4; Tukey-Kramer, **p<0.01; mean±SEM)

6か月齢♂_海馬

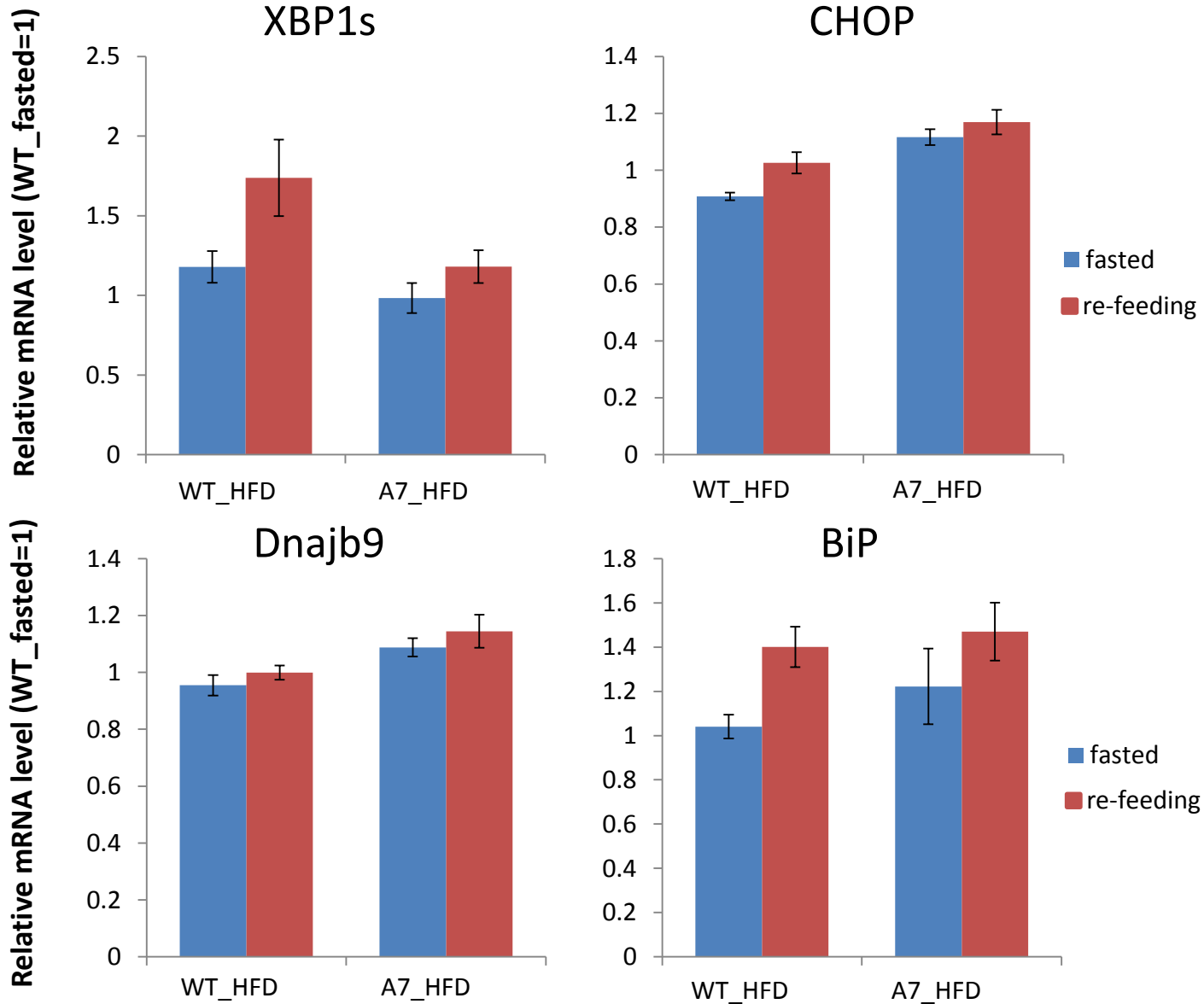


Fig. 45 6か月齢 HFD群におけるre-feedingによる小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量の変化 (WT♂、A7♂)

6か月齢♂WTマウス及びA7マウスの海馬において、小胞体ストレスシグナル分子のmRNA発現量を測定した。大脳皮質に比して、re-feedingによる顕著な発現量の変化は見られなかったが、XBP1sに関しては増加傾向を示した。

(n=4; Tukey-Kramer; mean ± SEM)

謝辞

本研究の機会を与えて下さり、懇切丁寧かつ的確にご指導して下さいました東京大学大学院医学系研究科 神経病理学分野の岩坪威教授に厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院 若林朋子助教には、研究室配属当初より卒業に至るまで、実験の基礎知識からご指導頂くと同時に、実験の遂行手順や考察について議論させて頂きました。また、東京大学大学院 橋本唯史特任准教授には、実験結果に対する考察及び実験の方向性について共に考えて下さり、盛んに議論して下さいました。心から感謝致します。そして、東京大学大学院 山田薫助教と桑原知樹助教には、実験手法についてご助言頂くと同時に研究生生活面でも支えて頂きました。この場をお借りして感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、東京大学大学院医学系研究科 門脇孝先生、窪田直人先生及び窪田哲也先生には、糖尿病関連の研究の遂行法や考察の仕方についてご教授頂きました。深謝致します。

東京大学大学院薬学系研究科機能病態学教室、および医学系研究科神経病理学分野の皆様には大変お世話になりました。特に、糖尿病研究の手法について、山口一樹さんには研究室配属当初より基礎から丁寧に教えて頂き、実験結果について真剣に議論して下さいましたと同時に研究生生活においても支えて頂きました。同じ糖尿病研究メンバーである佐野俊春

さん、落合敏平さんは共に研究に取り組み、より良い実験に向けて盛んに議論してくださいました。心から感謝しております。また、データを共有して下さった真野絢子さんにも感謝致します。そして、仲泰史さん、藤本哲太さん、宗實悠佳さん、箱崎真結さん、石田和久君、西田達君、小森禎之君、渡邊成晃君、櫻井まりあさん、佐竹響子さん、平澤朋子さんには多くのアドバイスを頂くとともに、研究生活を様々な面で支えて頂きました。大変感謝しております。技術補佐員としてマウスの管理をして下さった松尾祥子さんにも、この場をお借りして御礼申し上げます。

最後に、研究生活以外の様々な面で私の精神的支柱となり励ましてくれた、私の家族、故郷の知り合いの方々、そしてかけがえのない親友たちに、この場をお借りして深く感謝申し上げます。

2019年1月30日 松井 健太郎