

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 佐野 俊春

本研究はアルツハイマー病においてインスリンシグナルがアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の蓄積に与える影響を明らかにするため、家族性アルツハイマー病変異を有するヒトのアミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質 (APP) を神経細胞特異的に過剰発現するマウス (A7 マウス) においてインスリン受容体基質 2 (IRS-2) を欠損させ、 $A\beta$  動態および IRS-2 の下流で変化する分子について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 6 ヶ月齢と 9 ヶ月齢において IRS-2 欠損 A7 マウス的大脑皮質の可溶性および不溶性  $A\beta$  量を ELISA により測定した結果、6 ヶ月齢では IRS-2 欠損 A7 マウスと A7 マウスで同等であったが、9 ヶ月齢では IRS-2 欠損 A7 マウスでより低値であった。IRS-2 欠損による  $A\beta$  蓄積抑制効果は、不溶性  $A\beta$  量が上昇した時期に一致して生じると考えられた。
2. 9 ヶ月齢における IRS-2 欠損 A7 マウス的大脑皮質の APP 断片および APP 切断酵素の量をイムノブロット解析により調べた結果、いずれの分子の量も IRS-2 欠損 A7 マウスと A7 マウスで同等であった。したがって、IRS-2 欠損によって  $A\beta$  の産生能は変化しないと考えられた。
3. *in vivo* 微小透析法を用いて 9 ヶ月齢の IRS-2 欠損 A7 マウスの海馬の間質液中  $A\beta$  の濃度を経時的に測定し、 $\gamma$  セクレターゼ阻害剤投与下で  $A\beta$  産生を抑制した際の  $A\beta$  濃度の減少速度から半減期を算出した。海馬の間質液中  $A\beta$  の半減期は IRS-2 欠損 A7 マウスと A7 マウスで同等であった。したがって、IRS-2 欠損によって脳間質液中  $A\beta$  の除去速度は変化しないと考えられた。
4. 29 ヶ月齢の A7 マウス脳の可溶性抽出画分を  $A\beta$  シードとして 3 ヶ月齢の IRS-2 欠損 A7 マウスの海馬に注入し、3 ヶ月後に誘発される  $A\beta$  沈着を調べた。IRS-2 欠損 A7 マウスでは、シード誘発性の  $A\beta$  沈着の量が A7 マウスと比べて少なかった。したがって、IRS-2 欠損によって  $A\beta$  の線維伸長が抑制される可能性が示された。合成ヒト  $A\beta$  から調整したプロトフィブリルを IRS-2 欠損マウスの海馬に注入したところ、3 時間後の残存  $A\beta$  量は IRS-2 欠損マウスと野生型マウスで同等であったため、IRS-2 欠損 A7 マウスにおけるシード誘発性  $A\beta$  沈着の抑制が  $A\beta$  シードの除去速度の亢進に起因する可能性は低いと考えられた。
5. RNA-Seq 解析を用いて 9 ヶ月齢の IRS-2 欠損 A7 マウスと A7 マウス的大脑皮質における遺伝子発現を網羅的に比較した。エンリッチメント解析の結果、細胞外マトリックスに関連する遺伝子オントロジーの遺伝子セットのエンリッチメントスコアが高か

った。RNA-Seq 解析で発現上昇遺伝子として同定された細胞外マトリックスの遺伝子について、IRS-2 欠損 A7 マウス的大脑皮質の mRNA 量を RT-qPCR 法で測定した結果、A7 マウスと比較して mRNA 量が多かった。その一部の遺伝子に関して、大腦皮質中のタンパク質の量をイムノブロット解析で調べたところ、IRS-2 欠損 A7 マウスにおける増加が認められた。したがって、A7 マウス的大脑皮質において IRS-2 欠損によって細胞外マトリックスの遺伝子発現が上昇することが示された。

6. 9 ヶ月齢における IRS-2 欠損 A7 マウス的大脑皮質の Akt、Smad2、Smad3 のリン酸化をイムノブロット解析により調べた結果、A7 マウスと比較して Akt のリン酸化レベルは低く、Smad2 と Smad3 のリン酸化レベルは高かった。TGF- $\beta$ /Smad シグナルは細胞外マトリックスの遺伝子発現を制御するシグナルであることや、インスリンや IGF-1 が Akt のリン酸化を介して Smad3 の活性化を阻害するという知見があることを考慮すると、IRS-2 欠損により Smad2/3 シグナルが活性化され、細胞外マトリックスの遺伝子発現が上昇する可能性が考えられた。

以上、本論文はアルツハイマー病モデルマウスである A7 マウスにおいて、脳内の A $\beta$  動態および遺伝子発現の変化の解析から、IRS-2 欠損により A $\beta$  の線維伸長が抑制される可能性を示し、IRS-2 欠損により脳内において Smad2/3 シグナルが活性化すること、細胞外マトリックスの遺伝子発現が上昇することを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、インスリンシグナル抑制による A $\beta$  蓄積抑制の分子メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士（医学）の学位請求論文として合格と認められる。