

博士論文（要約）

インスリン受容体基質 2 の欠損が  
脳内のアミロイド  $\beta$  動態に及ぼす影響の解析

佐野 俊春

論文題目 インスリン受容体基質 2 の欠損が脳内のアミロイド  $\beta$  動態に及ぼす影響の解析  
氏名 佐野 俊春

### 【序文】

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は緩徐進行性の認知機能障害を呈する神経変性疾患であり、加齢に伴い発生率が上昇する。AD 患者脳の神経病理学的特徴である老人斑は、主にアミロイド  $\beta$  ペプチド (amyloid  $\beta$ : A $\beta$ ) から構成される。A $\beta$  は凝集性が高く、アミロイド線維を形成し、老人斑として蓄積する。A $\beta$  はアミロイド  $\beta$  前駆体タンパク質 (amyloid-beta precursor protein: APP) がプロテアーゼによる 2 段階の切断を受けて産生される。家族性 AD の原因遺伝子はいずれも A $\beta$  の産生、凝集に関連する遺伝子であることが証明されたことに基づいて、A $\beta$  の蓄積が AD 発症の最上流の原因だと考えるアミロイド仮説が提唱されている。

糖尿病が AD 発症リスクを高めることや AD 患者の死後脳にはインスリン抵抗性が存在することなどから、脳のインスリン抵抗性が AD 病態の増悪因子となる可能性が考えられてきた。一方、インスリン受容体の主要な下流シグナル伝達タンパク質であるインスリン受容体基質 2 (insulin receptor substrate-2: IRS-2) を欠損したマウスは、糖尿病病態を示すにもかかわらず、AD モデルマウスにおいて IRS-2 を欠損させると A $\beta$  の脳への蓄積が抑制される。インスリン受容体や IGF-1 受容体の欠損も AD モデルマウス脳内の A $\beta$  量を減少させることを考慮すると、インスリン/IGF-1 シグナル (insulin/insulin growth factor-1 signaling: IIS) の阻害は A $\beta$  蓄積を抑制すると考えられる。また糖尿病においては、インスリン抵抗性それ自体ではなく、インスリン抵抗性を引き起こす小胞体ストレス、炎症などの上流の要因が AD 病態の増悪を招く可能性も示唆されている。IIS は寿命や老化を制御するシグナルと考えられており、IIS 分子の遺伝学的な抑制は生物種を超えて寿命延長効果を示すことが知られている。加齢が AD 発症の最大の危険因子であることも、IIS の阻害による抗老化作用が A $\beta$  蓄積の抑制に寄与している可能性を想起させる。しかし、IIS の阻害が A $\beta$  動態に与える影響に関しては一貫した見解が乏しく、IIS の下流で A $\beta$  動態に影響を与える分子・経路に関する知見も乏しい。そこで本研究において申請者は、IRS-2 欠損により起こる A $\beta$  動態の変化を明らかにすると同時に、IIS の下流で A $\beta$  蓄積抑制効果に寄与する因子を同定することを目的として、AD モデルマウスを用いて検討を行った。

### 【方法】

AD モデルマウスとして、2 種類の家族性 AD 変異を有するヒト APP を、神経細胞特異的に過剰発現する A7 マウスを用いた。まず、IRS-2 欠損が A7 マウスの脳内 A $\beta$  量に与える影響を明らかにするため、脳内の A $\beta$  量が少量である 6 ヶ月齢と、アミロイド斑は観察

されないものの不溶性 A $\beta$  が顕著に増加している 9 ヶ月齢の 2 段階の月齢で、脳内の可溶性、不溶性 A $\beta$  量を ELISA により測定した。続いて、IRS-2 欠損 A7 マウスの A $\beta$  産生能を評価するため、イムノブロット解析で APP 断片及び APP 切断酵素の量を調べた。次に A $\beta$  除去能を評価するため、*in vivo* 微小透析法を用いて海馬の間質液中 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。A $\beta$  凝集能を *in vivo* で評価するために、高齢 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。更に、A $\beta$  シードの除去能を *in vivo* で評価するために、合成ヒト A $\beta$  からプロトフィブリルを調製し、海馬に注入 3 時間後の残存 A $\beta$  量を調べた。

IRS-2 の下流で A $\beta$  動態を変化させる分子を同定するために、IIS の代表的な下流因子の活性化状態についてイムノブロット解析で評価した。また、RNA-Seq 解析を用いて脳における遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。エンリッチメント解析により、IRS-2 欠損が細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の遺伝子発現を上昇させる可能性が示唆されたため、RNA-Seq 解析で発現上昇遺伝子として同定された ECM 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 で測定した。その一部の遺伝子に関しては、脳で発現するタンパク質量をイムノブロット解析で調べた。ECM の遺伝子発現の上昇に TGF- $\beta$ /Smad シグナルが関与している可能性を検証するために、IRS-2 欠損 A7 マウス的大脑皮質における Smad2 と Smad3 のリン酸化をイムノブロット解析で調べた。

## 【結果】

脳内の A $\beta$  量は、6 ヶ月齢では IRS-2 欠損 A7 マウスと A7 マウスで同レベルであったが、9 ヶ月齢では IRS-2 欠損 A7 マウスでより低値を示した。この結果は、IRS-2 欠損による A $\beta$  蓄積抑制効果は、不溶性 A $\beta$  量が増加した時期に一致して生じることを示すものと考えた。このとき、APP 断片や APP 切断酵素の量は IRS-2 欠損による影響を受けなかった。また海馬間質液中の A $\beta$  量および半減期も IRS-2 欠損により変化しなかった。一方、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 マウスよりも少なかった。また、A $\beta$  プロトフィブリルの除去能は 2 群間で同等であった。これらの結果から、IRS-2 欠損は A $\beta$  の産生能や除去能には影響を与えずに、線維伸長を抑制する可能性が示唆された。

A7 マウス的大脑皮質においては IRS-2 の欠損により、IIS の主要なシグナル伝達分子である Akt のリン酸化レベルが低下したが、寿命延長や抗老化に関与すると考えられる FoxO、HSF1、NRF2、mTOR などの下流因子の活性化状態については、IRS-2 欠損による変化はみられなかった。RNA-Seq 解析で得られた遺伝子発現プロファイルからエンリッチメント解析を行ったところ、ECM 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。この結果は、IRS-2 欠損 A7 マウスでは ECM の遺伝子の多くが発現上昇することを示唆するものと考えた。RNA-Seq 解析で発現上昇遺伝子として同定された ECM の遺伝子の大部分について、RT-qPCR 法でも IRS-2 欠損に伴う mRNA 量の

増加が確認された。一部の遺伝子に関しては、IRS-2 欠損に伴いタンパク質の量も増加していることを確認した。TGF- $\beta$ /Smad シグナルは ECM の遺伝子発現を制御するシグナルとして知られており、インスリンや IGF-1 が Smad3 の活性化を阻害するという知見に基づいて、Smad2、Smad3 のリン酸化状態を定量的に評価したところ、IRS-2 欠損 A7 マウスの大脳皮質ではいずれのリン酸化レベルも上昇していた。これらの結果から、IRS-2 欠損により Smad2/3 シグナルが活性化され、ECM の遺伝子の発現上昇を引き起こす可能性が示唆された。

### 【考察】

本研究において申請者は、IRS-2 の欠損が AD モデルマウスにおいて A $\beta$  の線維伸長を抑制する可能性を示した。また、IRS-2 欠損が脳内において Smad2/3 シグナルを活性化し、ECM の遺伝子発現を上昇させる可能性を示唆した。以上の結果から、IRS-2 の欠損による IIS の低下は、AD モデルマウスにおいて Smad2/3 シグナルの活性化を介して ECM 遺伝子の発現上昇をもたらし、それによる脳内の細胞外環境の変化が A $\beta$  の線維伸長を抑制した結果、最終的に A $\beta$  蓄積の抑制に寄与する可能性を提唱した。今後、ECM 分子の A $\beta$  凝集に対する作用や、Smad2/3 シグナルを *in vivo* で制御することにより、A $\beta$  動態への影響を検証し、この仮説を検証したい。

本研究及び既報の動物実験の結果を考え合わせると、IIS の阻害は A $\beta$  蓄積を抑制すると考えられ、この過程はアルツハイマー病の治療標的となる可能性も想定される。しかし、インスリンは認知機能に関与するとの知見もあり、IIS の阻害は認知機能に悪影響を及ぼす可能性がある。IIS の下流において A $\beta$  蓄積抑制効果に寄与する分子・経路を同定することにより、認知機能への悪影響を避けつつ、A $\beta$  蓄積の抑制が達成できることも期待される。本研究において申請者が見出した Smad2/3 や ECM 分子群は、そのようなポテンシャルを有する分子の候補と考える。