

インスリンシグナル伝達障害が アルツハイマー病に及ぼす影響

春日 健作

新潟大学大学院医歯学総合研究科神経内科学分野
(主任：西澤正豊教授)

Impaired Insulin Signal Transduction Promotes Alzheimer's Disease Pathology

Kensaku KASUGA

*Department of Neurology, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine/
Molecular Neuroscience and Brain Disease/Neurology
(Director: Professor Masatoyo NISHIZAWA)*

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is by far the most common form of dementia, and its prevalence is increasing all over the world. The pathology of AD is characterized by senile plaque and neurofibrillar tangle, which consist of β -amyloid ($A\beta$) and hyperphosphorylated tau, respectively. Although amyloid hypothesis in AD pathogenesis is widely accepted, the mechanisms how $A\beta$ deposition leads to abnormal accumulation of hyperphosphorylated tau remain unclear. Recent epidemiological studies have suggested that there is a close association between AD and type 2 diabetes mellitus (T2DM). In this study, I investigated the molecular regulatory mechanisms of insulin signal transduction with special reference to AD pathology. When neuroblastoma-derived Neuro2a cells were treated with various concentrations of insulin, insulin receptor (IR) was proteolytically processed and extracellular $A\beta$ was accumulated in a dose-dependent manner. Treating with high concentration of insulin resulted in impaired responses of phosphorylation of Akt and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) upon insulin stimulation, which is reminiscent of insulin resistance in T2DM. Interestingly, Neuro2a cells producing a large amount of intracellular $A\beta$ showed the similar insulin resistance. Furthermore, when cells stably expressing human tau were cocultured with cells producing a large amount of $A\beta$, the levels of phosphorylated tau detected with the AT8 antibody were increased. These results suggest that $A\beta$ accumulation might cause abnormal tau phosphorylation through impaired insulin signal transduction and that improvement of insulin signal transduction could be a new therapeutic target of AD treatment.

Key words: Alzheimer's disease (AD), Insulin signal transduction, Presenilin 1 (PS1), β -Amyloid ($A\beta$), phosphorylated tau

Reprint requests to: Kensaku KASUGA
Department of Neurology
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学脳研究所神経内科 春日 健作

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は神経細胞脱落に加えて老人斑 (Senile plaque; SP) および神経原線維変化 (Neurofibrillar tangle; NFT) に特徴づけられる神経変性疾患である¹⁾。AD は認知症の原因疾患として最も頻度が高く、現在世界中で患者数が増加の一途をたどっているが²⁾³⁾、いまだその根本的治療法は確立していない。

AD の危険因子は遺伝的因子と非遺伝的因子に大別される。これまで家族性早発型 AD の原因遺伝子としてアミロイド前駆体蛋白 (Amyloid precursor protein; APP), プレセニリン 1 (Presenilin 1; PS1), およびプレセニリン 2 をコードする遺伝子がそれぞれ同定されている⁴⁾。APP がプレセニリン依存性にプロセッシングを受けることで β アミロイド (β -Amyloid; A β) が産生される⁵⁾。この A β が SP の主要構成成分であり⁶⁾、AD 病態の本質的な機序を A β 蓄積に求めるアミロイドカスケード仮説が広く受け入れられている^{7)–9)}。しかし、AD 患者脳における A β 蓄積の程度と分布は病勢を反映せず、むしろ NFT 蓄積の程度および分布が病期に相関するとの報告がある¹⁰⁾。A β は NFT の蓄積を強めることで病態に関与すると考えられているが¹⁾⁹⁾、その機序は明らかでない。

一方、非遺伝的因子として、生活習慣病である 2 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus; T2DM) およびその前段階に位置づけられる高インスリン血症が AD の危険因子であるとの報告が近年蓄積しつつある^{11)–13)}。また AD 患者が T2DM を合併すると SP や NFT などの病理変化がより高度になることが報告されている¹¹⁾。T2DM に伴う糖利用障害、インスリン抵抗性、および慢性炎症などさまざまな病態が AD 病態に関与することが示唆されているが¹⁴⁾¹⁵⁾、詳細な分子病態機序は不明である。

インスリン受容体 (Insulin receptor; IR) は I 型膜貫通蛋白である前駆体蛋白として産生され、furin により α と β の subunit に切断を受ける。さらに 2 つの α -subunit (IR- α) と 2 つの β -subunit

(IR- β) によるヘテロ 4 量体を形成することで機能型 IR になる。インスリンが細胞表面の IR- α に結合すると、IR- β の細胞質内ドメインのチロシンキナーゼが活性化し IR- β を自己リン酸化する¹⁶⁾。リン酸化した IR- β は細胞質内の insulin receptor substrate (IRS) をリン酸化し、さらに phosphoinositide 3-kinase (PI3K), phosphoinositide-dependent protein kinase (PDK1), Akt, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) と一連のリン酸化カスケードを介し細胞内にシグナルを伝達することで糖代謝を調節する¹⁷⁾。インスリンシグナルの下流に位置する GSK3 β は、NFT の構成成分であるタウ¹⁸⁾ のリン酸化を調節することが知られている¹⁹⁾。

今回筆者は、T2DM および高インスリン血症が AD と疫学的に関連することに着目し、高インスリン状態負荷による A β およびインスリンシグナルへの影響に関し検討を行った。さらに A β がインスリンシグナル伝達障害を介して NFT 蓄積を起こす機序を想定し、A β 蓄積下におけるインスリンシグナル伝達およびその下流に位置するタウのリン酸化を評価した。

材料と方法

細胞培養と遺伝子導入

C6 ラット神経膠腫細胞およびマウス線維芽細胞は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) に適宜ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum; FBS) を 10% 添加した培養液で培養した。Neuro2a マウス神経芽腫細胞 (N2a 細胞) は DMEM 50%, Opti-MEM I (Invitrogen) 50% に適宜 FBS を 5% 添加した培養液で培養を行った。 γ -secretase 阻害剤 (L-685, 458 2 μ M, Calbiochem) による細胞処理は 4 時間行った。共培養は Cell Culture Inserts (BD Falcon) を用いて行った。スウェーデン型 APP 変異を安定発現する N2a 細胞 (N2a swe10)²⁰⁾、4R1N 型ヒトタウ遺伝子を安定発現する N2a 細胞、APP E693 Δ 変異を安定発現する N2a 細胞²¹⁾、および PS1 欠損マウス由来線維芽細胞²²⁾ を解析に用いた。遺伝

子導入は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて行った。

ウェスタンブロット

細胞を 0.5 mM Na_3VO_4 および 1 mM NaF を添加した可溶性バッファー (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 % NP-40, 0.5 % Sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) に溶解した。可溶性蛋白を SDS ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い分離し、さらに polyvinylidene difluoride 膜 (Millipore) に電氣的に転写した。内在性 IR, Akt, リン酸化 Akt, GSK3 β およびリン酸化 GSK3 β の検出にはそれぞれ抗 IR 抗体 (CT-3) (NeoMarkers), ウサギポリクローナル抗 Akt 抗体 (Cell Signaling), マウスモノクローナル抗リン酸化 Akt (Ser473) 抗体 (Cell Signaling), マウスモノクローナル抗 GSK3 β 抗体 (BD Transduction Laboratories) およびウサギポリクローナル抗リン酸化 GSK3 β 抗体 (Cell Signaling) を用いた。A β , タウおよびリン酸化タウはそれぞれマウスモノクローナル抗 A β 抗体 (82E1) (IBL), マウスモノクローナル抗タウ抗体 (tau-1) (Roche), およびマウスモノクローナル抗リン酸化タウ抗体 (AT8) (Pierce) を用いた。抗体を enhanced chemiluminescence detection system (Millipore) により可視化し、densitometry による半定量化を行った。

細胞表面蛋白アッセイ

細胞表面蛋白を 4°C, 30 分間, ビオチン化した後 (NHS-SS-Biotin, Pierce), 可溶性バッファーに溶解し, streptavidin 結合アガロースビーズ (Pierce) によりビオチン化蛋白を回収した。ビオチン化蛋白は Laemmli SDS サンプルバッファーを用いて streptavidin から溶離し, ウェスタンブロットを行った。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; ELISA

N2a 細胞から回収した培養液に 0.5mM phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma) を添加し, ヒト β アミロイド (1-40) ELISA キットおよびヒト β アミロイド (1-42) キット (Wako) により培養

液中 A β の定量を行った。結果は 3 回の独立した検討から得た。

インスリン刺激および免疫沈降

種々の培養細胞をヒトインスリン (Sigma-Aldrich) により 37°C で処理した。リン酸化 IR は抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) (Zymed Laboratories) と Protein G 結合アガロースビーズ (Pierce) を用いて免疫沈降し, Laemmli SDS サンプルバッファーを用いて溶離した後, ウェスタンブロットを行った。

結 果

インスリンによる IR プロセッシングへの影響

これまで筆者らは IR- β が PS1/ γ -secretase 依存性のプロセッシングを受けることを報告した (図 1A)²³⁾。Notch をはじめとするいくつかの受容体膜蛋白質はリガンドによる刺激でプロセッシングが促進されることが知られている²⁴⁾²⁵⁾。そこで C6 ラット神経膠腫細胞を, 種々の濃度のインスリンを添加した培養液で 16 時間培養し, IR の PS1/ γ -secretase 依存性プロセッシングに対する影響を検討した。~190 kDa の全長型 IR のインスリン添加による変化は明らかでなかったが, ~95 kDa の IR- β はインスリン濃度依存性に減少した (図 1B)。次に培養液へのインスリン 1 μ g/mL 添加後の経時的变化を検討した。IR- β はメタロプロテアーゼによる切断を受け IR C-terminal fragment (IR-CTF) となり, さらに IR-CTF が PS1/ γ -secretase により切断されるが (図 1A)。IR- β はインスリン添加 30 分後より減少し 4 時間後にほぼ消失し, IR- β の分解とともに ~50 kDa の IR-CTF の出現を認め, 2 時間以降 IR-CTF は減少した (図 1C)。

次にインスリン添加による細胞表面の IR 局在への影響について細胞表面ビオチン化ラベルにより検討した。N2a 細胞を 0.1 および 1 μ M のインスリンを添加した培養液で 16 時間培養したところ, 総 IR- β の減少に加え, 細胞表面に存在する IR- β がインスリン濃度依存性に減少した (図

1D).

インスリンが細胞外 A β に及ぼす影響

インスリン添加による A β 量への影響を検討する目的で、0–1000 nM の濃度のインスリンを N2a swe10 細胞の培養液に添加し、16 時間後に培養液中の A β をウェスタンブロットにより検討した。培養液中の A β はインスリン濃度依存性に増加した (図 2A, B)。さらに ELISA により培養液中の A β 40 および A β 42 を分子種特異的に定量したところ、インスリン添加により A β 40 および 42 ともに有意な増加を認めたが (図 2C, D)。A β 42/40 比はインスリン添加により有意な変化は示さなかった (図 2E)。

高インスリン状態および PS1/ γ -secretase によるインスリンシグナル伝達への影響

PS1 をヘテロで欠損するマウス線維芽細胞 (PS1^{+/-}) を 10% FBS を添加した培養液 (通常インスリン濃度群) と、10% FBS に加えさらに T2DM 初期で認める濃度 (10 nM) のインスリンを添加した培養液 (高インスリン濃度群) とでそれぞれ 16 時間培養した後、インスリン 1 μ M 添加刺激によるインスリンシグナル伝達関連分子の挙動を検討した。その結果、通常インスリン濃度群に比し高インスリン濃度群ではインスリン刺激前のリン酸化 Akt およびリン酸化 GSK3 β が増加していたが、インスリン刺激に対するリン酸化 Akt およびリン酸化 GSK3 β の増加率は高インスリン濃度群において有意に低下していた (図 3A, B, C)。

次にインスリンシグナル伝達へのプレセニリンの関与を検討する目的で、PS1 をヘテロで欠損するマウス線維芽細胞 (PS1^{+/-}) とホモで欠損するマウス線維芽細胞 (PS1^{-/-}) を 10% FBS を添加した培養液で 16 時間培養した後、インスリン 1 μ M 添加刺激によるインスリンシグナル伝達を検討した。PS1^{+/-}-細胞に比して PS1^{-/-}-細胞ではリン酸化 Akt およびリン酸化 GSK3 β が増加する傾向にあった (図 3A, D, E)。

A β がインスリンシグナルに及ぼす影響

細胞内外の A β によるインスリンシグナル伝達障害を検討する目的で、変異 A β を過剰に産生する N2a 細胞 (APP swe \times E693 Δ) を作成した。この細胞では、細胞外のみならず細胞内にも過剰の A β が蓄積する (図 4A)。野生型 N2a 細胞にインスリン 1 μ M 刺激を加えたところ、刺激後 15–30 分で Akt のリン酸化がピークを示したのに対し、N2a 細胞 (APP swe \times E693 Δ) では Akt のリン酸化のピークは刺激後 60 分と遅延していた (図 4A, B)。また N2a 細胞 (APP swe \times E693 Δ) では野生型 N2a 細胞に比し、GSK3 β のリン酸化レベルはインスリン刺激前で蓄積を認める一方、インスリン刺激後ほとんど増加を認めなかった (図 4A, C)。

次に外来性 A β によるインスリンシグナル伝達障害がタウに及ぼす影響を検討する目的で、タウ安定発現 N2a 細胞を recipient, N2a 細胞 (APP swe \times E693 Δ) を donor とする共培養実験を行った。この共培養システムではタウ安定発現 N2a 細胞に APP 遺伝子導入を行うことなく、培養液を介した donor 細胞由来の外来性 A β の影響を観察することが可能である。タウ安定発現 N2a 細胞の単独培養では細胞外に A β は検出されないが (図 4D, レーン 1), N2a 細胞 (APP swe \times E693 Δ) を donor として 16 時間共培養を行うと、recipient であるタウ安定発現 N2a 細胞の培養液中に外来性と思われる A β の蓄積を認め、さらに外来性 A β を取り込んだと考えられる細胞内 A β の蓄積も認めた (図 4D, レーン 2)。この共培養により細胞内外の A β 蓄積に加え、IR- β のリン酸化レベルの増加およびリン酸化タウの蓄積を認めた (図 4D)。

考 察

AD は認知症の最大の原因となる神経変性疾患であるが、いまだ病態機序は不明であり、その根本的治療法は確立していない。現在病態仮説としてアミロイドカスケード仮説が広く受け入れられているが^{7)–9)}、A β がどのようにして NFT の蓄

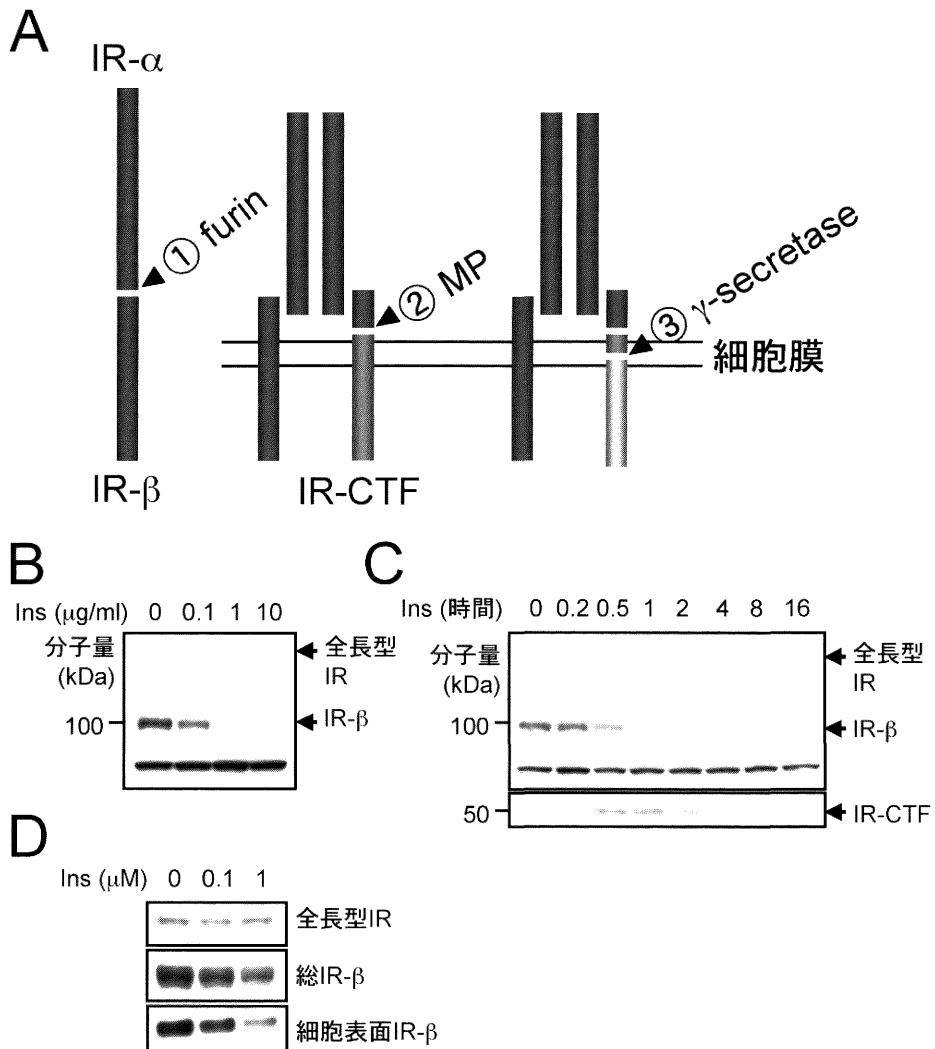


図1 インスリンによるIRプロセッシングへの影響

- (A) IRの模式図。①全長型IRはfurinによりIR- α とIR- β に切断される。②機能型IRは2つのIR- α と2つのIR- β によるヘテロ四量体からなる。IR- β の細胞外ドメインがメタロプロテアーゼ(metalloprotease; MP)による切断を受け、IR C末断片(IR C-terminal fragment; IR-CTF)を生じる。③IR-CTFは細胞膜内で γ -secretaseによる切断を受け、細胞内ドメインを細胞内に放出する。
- (B) C6ラット神経膠腫細胞に種々の濃度のヒトインスリン(Ins)を16時間添加し、ウェスタンブロットによりIR- β の発現レベルを確認した。
- (C) C6ラット神経膠腫細胞に種々の時間ヒトインスリン10 μ g/mLを添加し、ウェスタンブロットによりIR- β の発現レベルを確認した。
- (D) Neuro2aマウス神経芽腫細胞に種々の濃度のインスリンを16時間添加したのち、細胞表面蛋白をビオチンで標識しstreptavidinによりビオチン化蛋白を回収した。ウェスタンブロットによりIR- β の発現レベルを確認した。

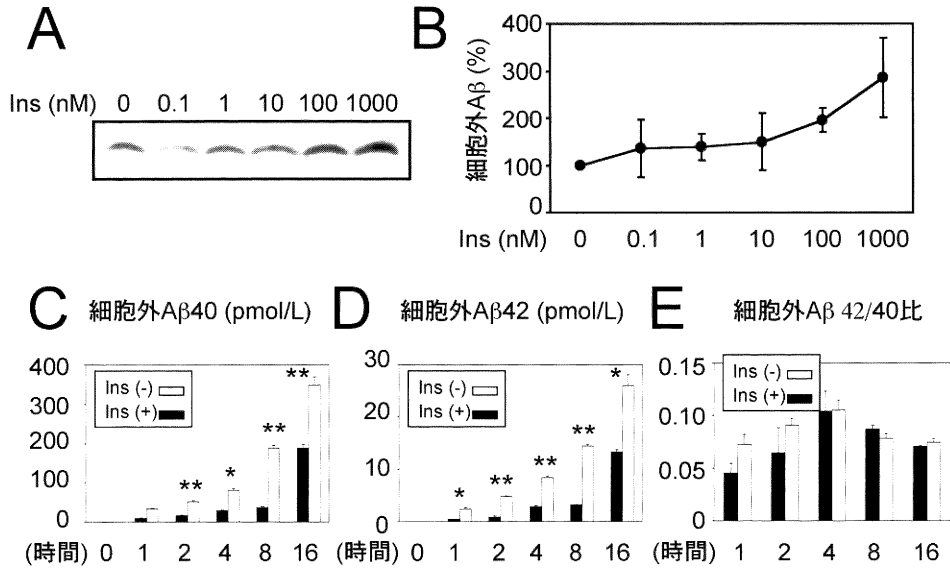


図2 インスリンが細胞外Aβに及ぼす影響

- (A) Neuro2a マウス神経芽腫細胞 (APP スウェーデン型変異安定発現細胞; APP swe10) に種々の濃度のインスリン (Ins) を 16 時間添加し、ウェスタンブロットにより細胞培養液中の Aβ を評価した。
- (B) (A) の細胞外 Aβ を densitometry により定量を行い、添加インスリン濃度 0 nM を基準に評価した (n = 3, 平均±標準誤差)。
- (C) N2a 細胞 (APP swe10) にインスリン 1 μM を添加し培養した培養液中の Aβ 40 を ELISA により定量をした (n = 3, 平均±標準誤差)。サンプルは duplicate で測定した。黒塗りバーはインスリン非添加群。白抜きバーはインスリン添加群。各群を t-test により比較した。* P < 0.05. ** P < 0.01。
- (D) (C) と同様に Aβ 42 の ELISA 定量結果を示す。
- (E) ELISA で得られた実測値から Aβ 42/40 比を算出した。各群に有意差なし。

積に関与するかは依然として不明である。今回筆者は T2DM および高インスリン血症が AD と疫学的に関連すること^{11) - 13)}に着目し、Aβ がインスリンシグナル伝達障害を介して NFT 蓄積を起こす機序を想定し、本研究を行った。

IR は脳内を含め²⁶⁾ 広く全身臓器に発現するチロシンキナーゼ型受容体であり、インスリンと結合する 2 つの IR-α とキナーゼ活性部位をもつ 2 つの IR-β からなるヘテロ 4 量体機能型 IR として細胞表面に局在する¹⁶⁾。T2DM の病初期においては、肝や骨格筋といった全身臓器でインスリン抵抗性を来し、代償性に高インスリン血症を来

すことが知られ¹³⁾、その際、脳脊髄液中でのインスリン濃度は上昇しているとの報告がある²⁷⁾。また AD 患者の脳脊髄液におけるインスリン濃度は上昇しているとの報告がある²⁸⁾。今回の解析において、IR-β はインスリン濃度および添加時間依存性に細胞表面の局在が減少していたことから (図 1D)、リガンド存在下、すなわち高インスリン状態下では機能型 IR が減少することが想定された。この機能型 IR の減少は、リガンド依存性の IR internalization に加え、IR-β のプロセッシングの促進 (図 1B, C, D) が寄与していると考えられた。AD 患者の脳内 IR は減少しているとの報告

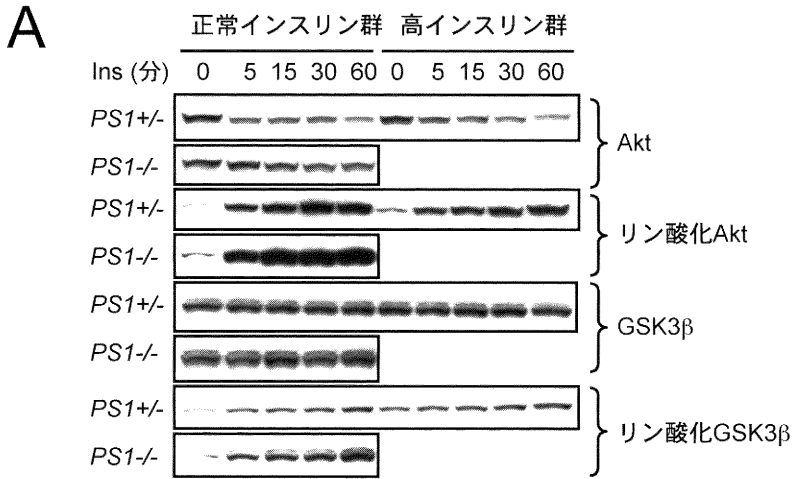


図3 高インスリン状態およびPS1/γ-secretaseによるインスリンシグナル伝達への影響
(A) PS1+/-およびPS1-/-マウス線維芽細胞を通常インスリン濃度(10% FBSのみ)または高インスリン濃度(10% FBSにインスリン10 nMを追加)で16時間培養後、インスリン1 μMを含む培養液を添加した。Akt, リン酸化Akt, GSK3β, およびリン酸化GSK3βをウェスタンブロットにより検出した。

があり²⁹⁾, 今回示したインスリン依存性のIRプロセッシングが関与している可能性が考えられる。

今回, 高インスリン状態において機能型IRの減少に加え, 細胞外Aβが増加することを見出した(図2A, B). AD患者脳において, Aβは40アミノ酸残基からなるAβ40および42アミノ酸残基からなるAβ42が検出され, 後者は凝集性が高く病的な役割を果たすと考えられている³⁰⁾. 今回の解析では, インスリン添加により細胞外のAβ40, Aβ42ともに有意な増加を認めたが, インスリンはAβ42/40比には影響を及ぼさなかった(図2C, D, E). 細胞外でAβはインスリン分解酵素(Insulin degrading enzyme; IDE)による分解を受け, インスリンはこれを競合阻害することが報告されている³¹⁾. 今回確認したインスリン添加による細胞外Aβの増加は, IDEによる細胞外Aβ分解がインスリンにより競合阻害された可能性は否定できない。しかし, IDEは主にAβ40を分解することが知られており³²⁾, 今回の解析では細胞外Aβ42の増加も認めた点からは, 細

胞外Aβの増加はインスリンによるIDEの競合阻害以外の機序も関与していると考えられた。Gaspariniらもインスリンを細胞培養液に添加することで細胞外Aβが増加することを報告している³³⁾. 彼女らは, インスリンがmitogen-activated protein kinase kinase経路を介したシグナル伝達により細胞内Aβを細胞外に移行させる機序を想定している。今回確認した細胞外Aβの増加が, この機序による可能性も考えられたが, 筆者の解析ではインスリン刺激による細胞内Aβの明らかな減少は見出せなかった(データ非提示)。

IRはインスリンが結合することで細胞質内のIR-βを自己リン酸化し¹⁶⁾. リン酸化したIR-βは細胞質内のIRSをリン酸化することで, さらにPI3K, PDK1, Aktと次々に下流にシグナルを伝達する¹⁷⁾. AktはさらにGSK3βをリン酸化し, 不活化することでグリコーゲン合成を行う³⁴⁾. 今回筆者はAktおよびGSK3βのリン酸化レベルによりインスリンシグナルを評価し, 高インスリン状態が持続すると, インスリン刺激に対する反応

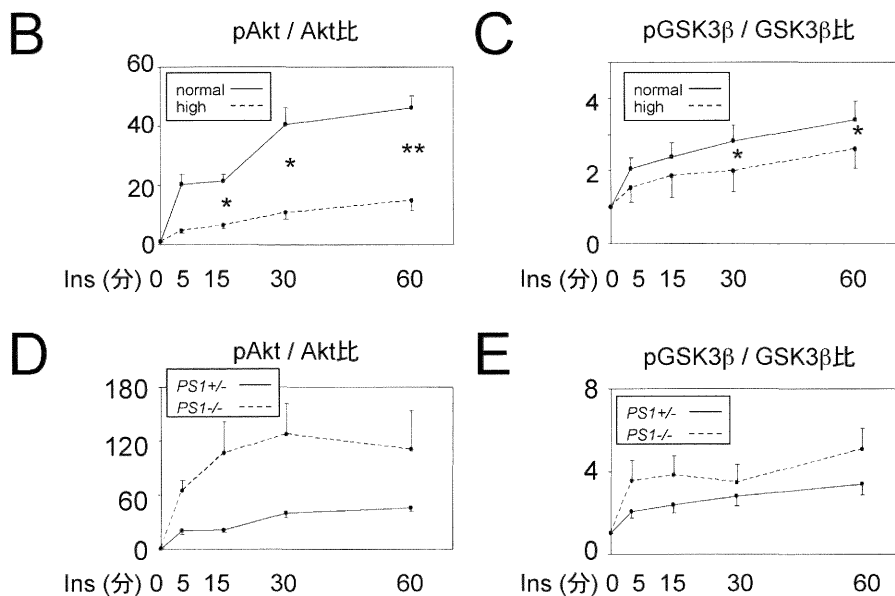


図3 高インスリン状態および PS1/ γ -secretase によるインスリンシグナル伝達への影響
 (B) *PS1*^{+/-}-マウス線維芽細胞を通常インスリン濃度で培養後インスリン刺激したものを実線 (normal), *PS1*^{+/-}-マウス線維芽細胞を高インスリン濃度で培養後インスリン刺激したものを破線 (high) で示す。(A) で得られた結果を densitometry で半定量し、リン酸化 Akt/Akt 比 (pAkt/Akt 比) を算出し、インスリン刺激前 (0 分) を基準に表示した (n = 3, 平均±標準誤差)。各群を t-test により比較した。* P < 0.05。 ** P < 0.01。
 (C) (B) と同様にしてリン酸化 GSK3 β /GSK3 β 比 (pGSK3 β /GSK3 β 比) を算出し、インスリン刺激前 (0 分) を基準に表示した (n = 3, 平均±標準誤差)。各群を t-test により比較した。* P < 0.05。
 (D) マウス線維芽細胞をそれぞれ通常インスリン濃度で培養後インスリン刺激した。*PS1*^{+/-}-細胞を実線。*PS1*^{-/-}-細胞を破線で示す。(A) で得られた結果を densitometry で半定量し、リン酸化 Akt/Akt 比 (pAkt/Akt 比) を算出し、インスリン刺激前 (0 分) を基準に表示 (n = 3, 平均±標準誤差)。各群を t-test により比較した。各群に有意差なし。
 (E) (D) と同様にしてリン酸化 GSK3 β /GSK3 β 比 (pGSK3 β /GSK3 β 比) を算出し、インスリン刺激前 (0 分) を基準に表示した (n = 3, 平均±標準誤差)。各群を t-test により比較した。各群に有意差なし。

性が低下することを見出した (図 3A, B, C)。この現象の機序としては、高インスリン状態により前述の IR プロセッシングが促進され、機能型 IR の数および細胞表面の局在が減少したことによる可能性が考えられる。また A β はリガンドであるインスリンと IR の結合を競合阻害すること

が知られており³⁵⁾、高インスリン状態により増加した細胞外 A β がインスリンを競合阻害した可能性も否定できない。APP は β -secretase に次いで γ -secretase による切断を受けることで A β を生じ⁵⁾、この γ -secretase の活性中心が PS1 である³⁶⁾。PS1 をノックアウトすると A β 産生は著

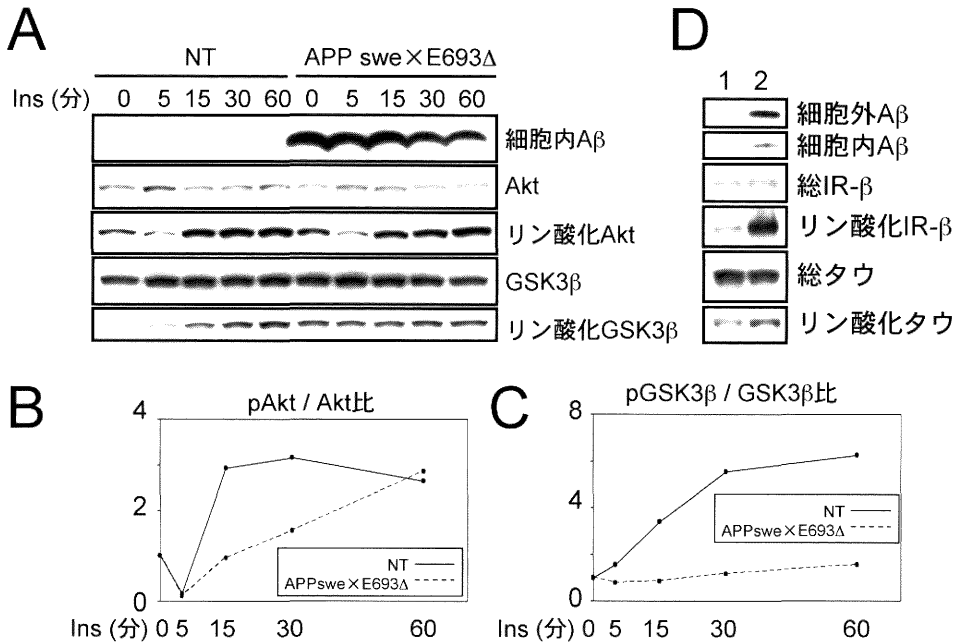


図4 A β がインスリンシグナルに及ぼす影響

- (A) N2a細胞 (Non-transfected; NT) および APP swe X E693 Δ 変異安定発現 N2a細胞それぞれにインスリン (Ins) 1 μ M を添加刺激し、種々の時間で細胞溶解液を回収しウェスタンブロットを行った。
- (B) NTを実線, APP swe X E693 Δ を破線で示す。(A)をdensitometryにより半定量を行い、リン酸化Akt/Akt比 (pAkt/Akt比)を算出した。インスリン刺激前(0分)を基準に表示した。
- (C) (B)と同様にリン酸化GSK3 β /GSK3 β 比 (pGSK3 β /GSK3 β 比)を算出し、インスリン刺激前(0分)を基準に表示した。
- (D) ヒトタウ安定発現N2a細胞を16時間単独培養したもの(レーン1)とAPP swe X E693 Δ 変異安定発現N2a細胞と16時間共培養したもの(レーン2)から得た細胞培養液および細胞溶解液を用いてウェスタンブロットを行った。

明に減少することから、今回PS1 $^{-/-}$ 細胞においてインスリンシグナルが改善したのは、細胞外A β の減少を介しインスリンへの競合阻害が减弱したことによる可能性が唆される。さらに、PS1はNotchをはじめとするいくつかの膜蛋白の膜内切断を介して細胞内のシグナル伝達に関与することが知られている²⁴⁾²⁵⁾。以前筆者らはIR- β がPS1/ γ -secretase依存性にプロセッシングを受け、細胞内ドメインを一部核内に移行させることを報告した²³⁾。高インスリン状態によりIR- β 細胞内ド

メインの核内への移行が増加し、核内シグナルを介してインスリンシグナル伝達を障害した可能性も考えられる。今回、PS1欠損細胞においてインスリン刺激によるリン酸化Aktおよびリン酸化GSK3 β の上昇を認め(図3A, D, E)、さらに、 γ -secretase阻害剤(L-685, 458)を細胞に添加した実験でも、同様にインスリン刺激後のリン酸化Aktおよびリン酸化GSK3 β の増加を確認しており(データ非提示)、PS1/ γ -secretase活性はインスリンシグナル伝達を抑制的に制御している

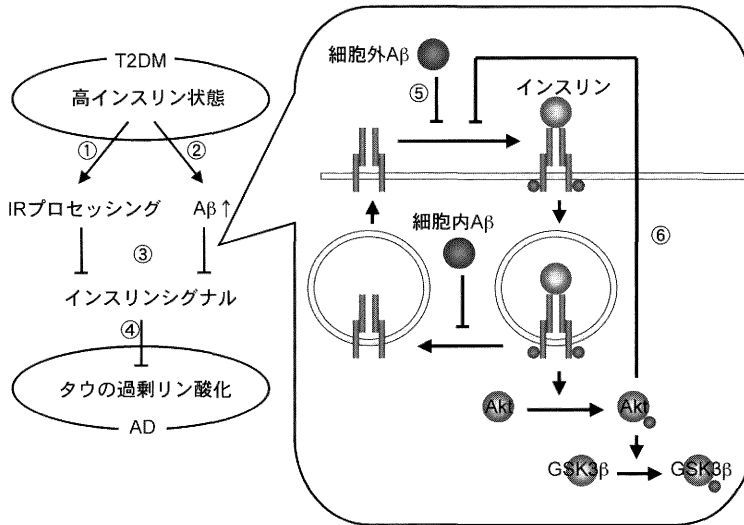


図5 高インスリン状態によるタウリン酸化への影響

①高インスリン状態はIRプロセッシングを促進しIR数を減少させインスリンシグナルを障害する。②高インスリン状態は細胞外のAβ蓄積を促進する。③①②およびその他の影響により高インスリン状態はインスリンシグナルを障害する。④インスリンシグナル障害はタウの過剰リン酸化を引き起こす。⑤細胞外Aβの蓄積はインスリンを競合阻害しインスリンシグナルを障害する。⑥細胞内AβはIR脱リン酸化を障害し、リン酸化Akt蓄積によるネガティブフィードバックを介してインスリンシグナルを障害する。

ものと思われる。この視点に立てば、PS1変異を有するAD患者においてインスリンシグナル伝達障害が生じているか否かについては、今後検討に値する。

次にAPPの人工的変異体 (APP swe × E693Δ) を用いて細胞内外にAβの蓄積を生じさせたところ、インスリン刺激前にもかかわらずリン酸化IR-βの著明な蓄積を認め (図4D)、さらにインスリン刺激に対する反応性の低下を認めた (図4A, B, C)。インスリン刺激前に培養液を交換し、細胞外Aβを除去した状態においても、インスリン刺激後のリン酸化Aktおよびリン酸化GSK3βの増加率が減少した点からは、単に細胞外AβによるIRの競合阻害という機序のみではなく、細胞内の過剰なAβがインスリンシグナル伝達障害

を引き起こす機序も想定された。IRはインスリン刺激により細胞内ドメインを自己リン酸化した後、internalizationし、脱リン酸化を受け、細胞表面にリサイクルされることが知られている¹⁶⁾。またAktは過剰にリン酸化を受けると、ネガティブフィードバック機構によりインスリンによるIR-βの自己リン酸化を阻害し、インスリンシグナル伝達を障害する³⁷⁾³⁸⁾。今回の結果から、Aβの蓄積はIR-βの脱リン酸化、およびリサイクルを阻害することで過剰なリン酸化Aktの蓄積を引き起こし、インスリンシグナル伝達障害を引き起こす可能性が考えられた。IRは主にprotein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B)により脱リン酸化を受ける。PTP1Bのノックアウトマウスはインスリン感受性が増強し³⁹⁾、PTP1Bの過剰発現マウ

スはインスリン抵抗性を示すことが報告されている⁴⁰⁾。またインスリン抵抗性マウスではPTP1Bの発現が増加するとの報告もある³⁹⁾。今回A β の蓄積に伴いリン酸化IRの蓄積を認めたことから、A β はPTP1Bの発現レベルあるいは機能に影響を与える可能性も考えられる。GSK3 β は恒常状態では活性型として存在し、インスリンシグナル下流でリン酸化を受けることで不活化する³⁴⁾。また活性型GSK3 β はタウを過剰にリン酸化する¹⁹⁾。今回の実験においてA β の蓄積はインスリン刺激前のリン酸化GSK3 β を増やしたものの、インスリン刺激に対する反応は欠如しており(図4B, D)、その結果リン酸化タウの蓄積を来したと考えられた。この結果は、AD患者脳においてリン酸化Aktおよびリン酸化GSK3 β が蓄積していること⁴¹⁾、および細胞内A β の蓄積とNFT程度が相関する知見⁴²⁾とも矛盾しない。これらを総合すると、A β 蓄積からタウ異常リン酸化によるNFT形成に至る機序の一つとして、インスリンシグナル伝達障害が関与している可能性が示唆された。これまで小規模ながらインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジンによりAD患者の認知機能が改善したとの報告があるが⁴³⁾⁴⁴⁾、ADに対する詳細な作用機序は明らかでない。今後AD病態におけるインスリンシグナル伝達障害をさらに検討することが、ADの新たな治療法につながると考えられた。

結 論

インスリン添加によりIRプロセッシングが増加すること、および細胞外A β が増加することを確認した。さらに高インスリン状態および細胞内外のA β の蓄積はインスリンシグナル伝達を障害し、タウの過剰なリン酸化を来すことを確認した。すなわちA β はIRの脱リン酸化を抑制し、そのリサイクルを阻害することでPI3K経路を介したインスリンシグナル伝達を障害し、結果としてリン酸化タウの過剰な蓄積を来すと考えられた(図5)。この結果はT2DM初期の高インスリン状態がAD病態へ及ぼす分子生物学的機序を示すと

もに、アミロイドカスケード仮説における課題であったA β の蓄積とタウの過剰リン酸化を結ぶ病態機序を説明していると考えられ、今後インスリンシグナル伝達障害の改善がAD治療の新たな標的となる可能性が示唆された。

謝 辞

最後に、本研究をご指導いただきました新潟大学脳研究所 神経内科学分野教授 西澤正豊先生、新潟大学脳研究所 分子神経疾患資源解析学分野同助教 池内健先生に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) LaFerla FM and Oddo S: Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction. *Trends Mol Med* 11: 170 - 176, 2005.
- 2) Sloane P D, Zimmerman S, Suchindran C, Reed P, Wang L, Boustani M and Sudha S: The public health impact of Alzheimer's disease, 2000 - 2050: potential implication of treatment advances. *Annu Rev Public Health* 23: 213 - 231, 2002.
- 3) Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland R P, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX and Antuono P: Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* 7: 812 - 826, 2008.
- 4) Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275: 630 - 631, 1997.
- 5) Thinakaran G and Koo EH: Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283: 29615 - 29619, 2008.
- 6) Glenner GG and Wong CW: Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885 - 890, 1984.
- 7) Selkoe DJ: The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid. *Jama* 283: 1615 - 1617, 2000.
- 8) Selkoe DJ: Alzheimer's disease is a synaptic

- failure. *Science* 298: 789 - 791, 2002.
- 9) Hardy J and Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353 - 356, 2002.
 - 10) Braak H and Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239 - 259, 1991.
 - 11) Peila R, Rodriguez BL and Launer LJ: Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes* 51: 1256 - 1262, 2002.
 - 12) Biessels GJ, Staekenborg S, Brunner E, Brayne C and Scheltens P: Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5: 64 - 74, 2006.
 - 13) Luchsinger JA: Adiposity, hyperinsulinemia, diabetes and Alzheimer's disease: an epidemiological perspective. *Eur J Pharmacol* 585: 119 - 129, 2008.
 - 14) Cole GM and Frautsch SA: The role of insulin and neurotrophic factor signaling in brain aging and Alzheimer's Disease. *Exp Gerontol* 42: 10 - 21, 2007.
 - 15) Zhao WQ and Townsend M: Insulin resistance and amyloidogenesis as common molecular foundation for type 2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2008.
 - 16) Knutson VP: Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *Faseb J* 5: 2130 - 2138, 1991.
 - 17) Khan AH and Pessin JE: Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45: 1475 - 1483, 2002.
 - 18) Grundke - Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM and Binder LI: Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4913 - 4917, 1986.
 - 19) Hong M and Lee VM: Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 272: 19547 - 19553, 1997.
 - 20) Thinakaran G, Teplow DB, Siman R, Greenberg B and Sisodia SS: Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "beta-secretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem* 271: 9390 - 9397, 1996.
 - 21) Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y and Mori H: A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63: 377 - 387, 2008.
 - 22) Ikeuchi T and Sisodia SS: Cell-free generation of the notch1 intracellular domain (NICD) and APP-CTF γ : evidence for distinct intramembranous "gamma-secretase" activities. *Neuromolecular Med* 1: 43 - 54, 2002.
 - 23) Kasuga K, Kaneko H, Nishizawa M, Onodera O and Ikeuchi T: Generation of intracellular domain of insulin receptor tyrosine kinase by gamma-secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 360: 90 - 96, 2007.
 - 24) Kopan R and Ilagan MX: Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 499 - 504, 2004.
 - 25) Landman N and Kim TW: Got RIP? Presenilin-dependent intramembrane proteolysis in growth factor receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 337 - 351, 2004.
 - 26) Havrankova J, Brownstein M and Roth J: Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetologia* 20 Suppl: 268 - 273, 1981.
 - 27) Neumann KF, Rojo L, Navarrete LP, Farias G, Reyes P and Maccioni RB: Insulin resistance and Alzheimer's disease: molecular links & clinical implications. *Curr Alzheimer Res* 5: 438 - 447, 2008.
 - 28) Fujisawa Y, Sasaki K and Akiyama K: Increased insulin levels after OGTT load in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with dementia of Alzheimer type. *Biol Psychiatry* 30: 1219 - 1228, 1991.

- 29) Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR and de la Monte SM: Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease - is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* 7: 63 - 80, 2005.
- 30) Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N and Ihara Y: Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). *Neuron* 13: 45 - 53, 1994.
- 31) Qiu WQ and Folstein MF: Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging* 27: 190 - 198, 2006.
- 32) Qiu WQ, Borth W, Ye Z, Haass C, Teplow DB and Selkoe DJ: Degradation of amyloid beta-protein by a serine protease-alpha2-macroglobulin complex. *J Biol Chem* 271: 8443 - 8451, 1996.
- 33) Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross RS, Beal MF, Greengard P and 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 - 2570, 2001.
- 34) Cohen P, Alessi DR and Cross DA: PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett* 410: 3 - 10, 1997.
- 35) Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W and Martins R: Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 22: RC221, 2002.
- 36) Steiner H, Fluhrer R and Haass C: Intramembrane proteolysis by gamma-secretase. *J Biol Chem* 283: 29627 - 29631, 2008.
- 37) Tian R: Another role for the celebrity: Akt and insulin resistance. *Circ Res* 96: 139 - 140, 2005.
- 38) Zhao WQ, De Felice FG, Fernandez S, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA and Klein WL: Amyloid beta oligomers induce impairment of neuronal insulin receptors. *Faseb J* 22: 246 - 260, 2008.
- 39) Kennedy BP and Ramachandran C: Protein tyrosine phosphatase - 1B in diabetes. *Biochem Pharmacol* 60: 877 - 883, 2000.
- 40) Zabolotny JM, Kim YB, Peroni OD, Kim JK, Pani MA, Boss O, Klamann LD, Kamatkar S, Shulman GI, Kahn BB and Neel BG: Overexpression of the LAR (leukocyte antigen-related) protein-tyrosine phosphatase in muscle causes insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 5187 - 5192, 2001.
- 41) Griffin R J, Moloney A, Kelliher M, Johnston J A, Ravid R, Dockery P, O'Connor R and O'Neill C: Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates and loss and altered distribution of Akt and PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem* 93: 105 - 117, 2005.
- 42) LaFerla FM, Green KN and Oddo S: Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 8: 499 - 509, 2007.
- 43) Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker L D, Plymate SR, Asthana S, Fishel MA, Kulstad JJ, Green PS, Cook D G, Kahn SE, Keeling ML and Craft S: Preserved cognition in patients with early Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment during treatment with rosiglitazone: a preliminary study. *Am J Geriatr Psychiatry* 13: 950 - 958, 2005.
- 44) Risner ME, Saunders AM, Altman JF, Ormandy GC, Craft S, Foley IM, Zvartau-Hind ME, Hosford DA and Roses AD: Efficacy of rosiglitazone in a genetically defined population with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Pharmacogenomics J* 6: 246 - 254, 2006.

(平成21年1月14日受付)