
 原 著

βアミロイド依存性異常タウリン酸化における インスリンシグナル障害の関与

徳 武 孝 允

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 in Neurons May be Involved in β - amyloid Induced Hyperphosphorylation of Tau

Takayoshi TOKUTAKE

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: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)

要 旨

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は認知症の原因として最も頻度が高い神経変性疾患である。AD を特徴付ける病理学的所見は、神経細胞の脱落に加えてβアミロイド (Aβ) を主要構成成分とする老人斑およびリン酸化タウを主要構成成分とする神経原線維変化である。AD 病態を時間軸からみると、Aβ蓄積が最も早く出現し、それに続きリン酸化タウの蓄積、神経細胞障害が生じることが知られている。Aβ蓄積に至るメカニズムの解明が進む一方で、Aβ蓄積が異常タウリン酸化を誘導する分子機序は不明な点が多い。一方で、2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus: T2DM) やインスリン抵抗性がAD発症のリスクとなるという疫学報告が相次いでいる。T2DMとAD病態を結びつける経路として、インスリンシグナル伝達の下流に位置するGSK3βがタウをリン酸化するキナーゼであることが挙げられる。Aβ依存性のタウリン酸化過程にインスリン抵抗性が関与するという仮説を立て、これを検証するために本研究を行った。まず、Aβを産生する細胞とヒト型タウを安定発現するN2a神経芽細胞腫細胞または内

Reprint requests to: Takayoshi TOKUTAKE
Department of Neurology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Science
Course for Molecular and Cellular Medicine/
Molecular Neuroscience and
Brain Disease/Neurology
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
新潟大学大学院医歯学総合研究科神経内科学分野
徳武孝允

在性タウを発現するラット初代神経培養細胞との共培養により、 $A\beta$ 依存性にタウのリン酸化が誘導される共培養システムを構築した。次に、時間依存性に生じる Akt (ser473) および GSK3 β (ser9) のリン酸化によりインスリン刺激依存性のシグナル伝達効率を検討したところ、 $A\beta$ 依存性のタウ異常リン酸化が生じる条件において、インスリンシグナル伝達が有意に抑制されていた。インスリン抵抗性改善剤であるチアゾリジン系薬剤 rosiglitazone を細胞培養液に添加すると、 $A\beta$ 依存性に生じるタウ異常リン酸化が抑制された。以上の結果から $A\beta$ 依存性に生じるタウ異常リン酸化にはインスリンシグナル伝達の障害が関与している可能性があり、脳内インスリンシグナルを標的とした治療がタウリン酸化抑制に有効であることが示唆された。

キーワード：Alzheimer's disease, insulin resistance, β -amyloid, phosphorylated tau, insulin signaling, coculture

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は進行性の認知機能障害を呈する神経変性疾患である¹⁾。病理学的には神経細胞の脱落に加えて β アミロイド (β -amyloid: $A\beta$) を主要構成成分とする老人斑 (senile plaque: SP)²⁾ およびリン酸化タウを主要構成成分とする神経原線維変化 (neurofibrillary tangle: NFT)³⁾ に特徴づけられる¹⁾。AD は認知症の原因疾患として最も頻度が高く、その患者数は増加しているが⁴⁾、いまだ根本的治療法は確立していない。AD の病態機序として、 $A\beta$ 蓄積をアルツハイマー病の病態の中核に位置づけるアミロイドカスケード仮説が考えられている⁵⁾。その根拠として、① $A\beta$ 蓄積は NFT の出現に先行する病理変化であること⁶⁾⁷⁾、②若年性家族性 AD の原因遺伝子としてアミロイド前駆体蛋白 (Amyloid precursor protein; APP) や、APP から $A\beta$ のプロセッシングに関わるプレセニリン 1 (presenilin 1: PS 1)、および PS2 が同定されていること⁸⁾、③ APP 遺伝子が存在する第 21 染色体のトリソミーであるダウン症では AD に類似した $A\beta$ 病理所見が出現する⁷⁾ ことがあげられる。アミロイドカスケード仮説は広く受けられているが、AD 患者脳における $A\beta$ 蓄積の程度と分布は神経細胞の脱落を反映せず、むしろ NFT 蓄積の程度および分布が認知障害に相関するとの報告がある⁹⁾。 $A\beta$ は NFT の蓄積を誘導し AD の病態に関与すると考えられているが⁵⁾、その分子機序は明らかでな

い。

一方、生活習慣病である 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus: T2DM) およびインスリン抵抗性が AD 発症のリスクファクターとなることが疫学的に示されている^{10)–13)}。T2DM による AD 発症への影響に関しては、動脈硬化、微小血管障害、糖毒性、インスリン抵抗性などさまざまな病態が関与することが示唆されているが¹⁴⁾、詳細な分子病態機序は明らかにされていない。最近になり、AD ヒト剖検脳の解析により、AD 患者の中樞神経系でインスリンシグナル伝達不全が生じている可能性が報告されている^{15)–17)}。インスリンシグナルは、細胞外においてインスリンがインスリン受容体 (insulin receptor: IR) に結合することにより活性化される。IR は 1 型膜貫通蛋白であり、インスリンが細胞表面の IR に結合すると、IR のチロシンキナーゼが活性化し IR を自己リン酸化する。リン酸化した IR は細胞質内の insulin receptor substrate (IRS) をリン酸化し、さらに phosphoinositide 3-kinase (PI3K)、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¹⁸⁾。インスリンシグナルの下流に位置する GSK3 β は、タウをリン酸化する主要なキナーゼのひとつで、インスリン刺激によりインスリンシグナルが活性化されると GSK3 β は不活化されタウのリン酸化は抑制される¹⁹⁾。

本研究において筆者は、 $A\beta$ 依存性のタウ異常リン酸化の分子機序を解明することを目的に、 $A\beta$

依存性にタウのリン酸化を誘導する共培養モデルを構築し、様々な $A\beta$ 分子種がタウリン酸化に与える影響を検討した。さらに $A\beta$ がタウリン酸化を誘導する機序としてインスリンシグナル伝達障害の関与を想定し、 $A\beta$ 存在下におけるインスリン依存性のシグナル伝達を評価した。またインスリンシグナル伝達を標的とした治療介入がAD病態の改善に有効である可能性を考え、インスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン系薬剤によるタウリン酸化に対する抑制効果を検討した。

材料と方法

細胞培養と遺伝子導入

Human embryonic kidney (HEK) 293T細胞はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) にウシ胎仔血清 (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FBSを5%添加した培養液で培養を行った。ラット大脳皮質初代神経培養細胞は、神経細胞培養システム (Sumitomo Bakelite) を使用した。ラット大脳皮質 (胎生17日) から初代神経細胞を調整し、poly-D-lysineをコートしたディッシュに播種した。解析には、4R1Nヒト型タウ遺伝子を安定発現するN2a細胞 (N2a MAPT細胞)、ラット大脳皮質初代神経培養細胞、HEK293T細胞、野生型 (wild-type: WT) PS1を安定発現するHEK293T細胞 (HEK293T PS1 WT)、PS1 L166P変異を安定発現するHEK293T細胞 (HEK293T PS1 L166P)²⁰⁾、PS1 Δ T440変異を安定発現するHEK293T細胞 (HEK293T PS1 Δ T440)²¹⁾、PS1 D385A人工変異を安定発現するHEK293T細胞 (HEK293T PS1 D385A)²²⁾を用いた。遺伝子導入はLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い、安定発現細胞樹立にはG418を用いて選択を行った。 γ -Secretase阻害剤 (Compound E, Calbiochem) は25nMの濃度で使用した。ラット初代神経培養細胞に対し、pioglitazone (Enzo) または rosiglitazone (Cayman) による処理を24時間施行した。インスリンシグ

ナルを活性化するために、種々の培養細胞をヒトインスリン (Sigma-Aldrich, 1 μ M) を培養上清に添加し、経時的に細胞を回収した。

共培養システム

多孔膜 (1.0 μ m) を有する Cell Culture Inserts (BD Falcon) に HEK293T細胞を播種し、cDNAコンストラクト (ヒト野生型APP (APP WT)、スウェーデン型APP変異 (APP^{swe}) またはオリゴマー型APP変異 (APP E693 Δ 変異)²³⁾ の遺伝子導入を行った。24時間後、Cell Culture Inserts (ドナー細胞) をレシピエント細胞であるN2a細胞もしくは初代神経培養細胞と共培養を行った。

ウェスタンブロット

レシピエント細胞を0.5 mM Na₃VO₄ および1 mM NaFを添加したRIPAバッファー (150 mM NaCl, 25mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1% SDS, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, 5 mM EDTA) に溶解し、遠心 (14000 rpm, 10分) 後、細胞ライセイトを回収した。細胞ライセイトのタンパク濃度をBCA法で測定し、等量の可溶性蛋白をSDS (sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った。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、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 (ser9) 抗体 (Cell Signaling) を用いた。総タウはマウスモノクローナルタウ抗体 (tau5) (Thermoscientific) を用い、リン酸化タウ、非リン酸化タウはそれぞれ、マウスモノクローナル抗リン酸化タウ抗体 (AT8) (Pierce), マウスモノクローナル非リン酸化タウ抗体 (tau1) (Roche) を用いた。 $A\beta$, 全長型APPはマウスモノクローナル抗 $A\beta$ 抗体 (82E1) (IBL), ウサギポリクローナル抗APP-CTF抗体 (Sigma-Aldrich) を使用した。結合した抗体をenhanced chemiluminescence detection system (Millipore) により可視化

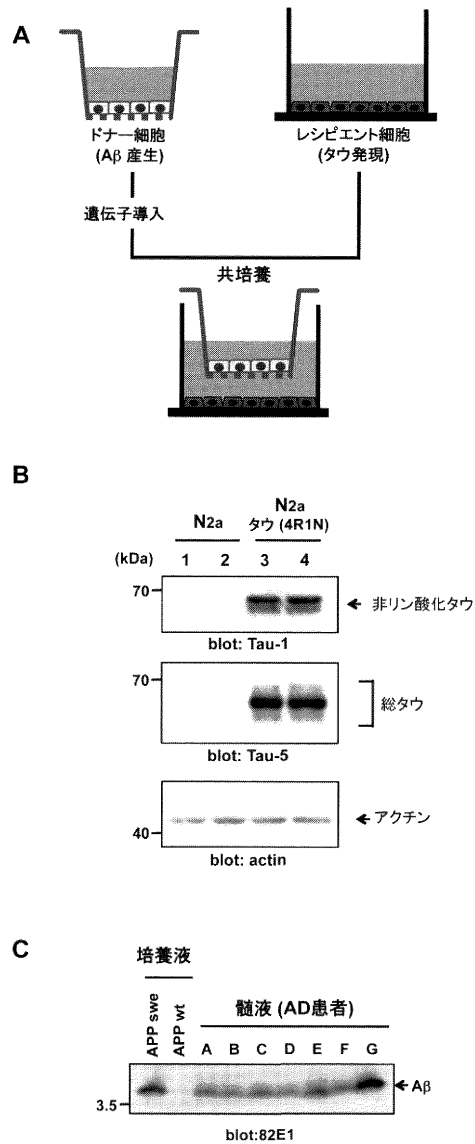


図1 新規共培養システムの構築

- A) 共培養システムの模式図。多孔性の膜 (pore size 1.0 μ m) を介して、ドナー HEK293T 細胞 (上段) とレシピエント細胞 (下段) の共培養を行った。レシピエント細胞には、4R1N ヒト型タウを安定発現する N2a 細胞 (N2a MAPT 細胞) または、ラット初代神経培養細胞を使用した。ドナー細胞に、様々な A β を産生する cDNA コンストラクトを導入し、共培養の後、レシピエント細胞の細胞ライセイトを回収し、タウおよび関連分子について検討した。
- B) 4R1N ヒト型タウ遺伝子を安定発現する N2a 細胞 (N2a MAPT) の細胞ライセイトを回収し、ウエスタンブロットにより総タウを検出する抗タウ Tau-5 抗体、脱リン酸化タウを認識する抗脱リン酸化タウ Tau-1 抗体を用い外来性ヒト型タウを検出した。
- C) 共培養液中の A β 量を検討する目的で、共培養で用いた培養液および7名の AD 患者由来の髄液を等量 SDS-PAGE で泳動後、抗 A β 抗体 82E1 を用い免疫ブロットを行った。

表 1

	mock	APP WT	APP swe	APP Δ E693
A β 40 (pg/mL)	undetectable	722.3 \pm 20.3	4883.7 \pm 154.5	undetectable
A β 42 (pg/mL)	36.9 \pm 4.2	101.0 \pm 5.3	311.7 \pm 9.8	undetectable
dimer/oligomer A β (pM)	undetectable	10.3 \pm 10.3	n/a	61.9 \pm 4.9

平均 \pm 標準誤差 ; n/a, not available

し、ImageQuant LAS system (GE Healthcare) による半定量解析を行った。

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

回収した培養上清に 0.5mM phenyl-methane-sulfonyl fluoride (PMSF, Sigma) を添加し、ヒト β アミロイド (1-40) ELISA キットおよび高感度ヒト β アミロイド (1-42) キット (Wako) により A β を定量測定した。Dimer/oligomer A β を測定する目的に、A β の N 末を認識するマウスモノクローナル抗 A β 抗体 (82E1) (IBL) を capture 抗体に使用し、reporter 抗体にビオチン化された同じ抗 A β 抗体 (82E1) (IBL) を使用した ELISA を用いた²⁴⁾。HRP 標識化された streptavidin (High sensitivity streptavidin HRP, Thermo-scientific) を用いてビオチン化 82E1 を認識し、TMB (1-StepTM Ultra TMB ELISA, Thermo-scientific) を用いて発色させ検出した。検量線作成のための標準物質は human A β (1-16) dimer 合成ペプチドを使用した。

結 果

共培養システムの構築

A β を産生するドナー細胞 (上段) とヒト型タウ、あるいは内在性タウを発現するレシピエント細胞 (下段) を共培養するシステムを構築した

(図 1A)。ドナー細胞 (HEK293T 細胞) に様々な cDNA コンストラクトを導入し各種 A β を培養液中に分泌させ、レシピエント細胞のタウおよび関連分子の解析を行った。レシピエント細胞として 4R1N ヒト型タウを安定発現する N2a 細胞 (N2a MAPT) を作成した。N2a MAPT 細胞のタウ発現を抗タウ抗体で解析すると、外来性に導入したヒト型タウが検出された (図 1B)。次に、培養上清中の A β 濃度と AD 患者髄液中の A β の濃度を免疫ブロットおよびサンドイッチ ELISA にて比較した。免疫ブロット (図 1C) および ELISA (表 1) の結果から、培養液中の A β は、以前筆者らが報告した髄液 A β 濃度²⁵⁾ に近い生理的な濃度と考えられた。

細胞外 A β が N2a MAPT 細胞の外来性タウリン酸化に及ぼす影響

Mock, APP WT または APPswe コンストラクトを一過性に導入した HEK293T ドナー細胞と N2a MAPT レシピエント細胞を 40 時間共培養した。ドナー細胞への APPswe の導入により培養液中の A β は著しく増加した (図 2A)。APPswe を導入したドナー細胞との共培養により、レシピエント細胞のタウのリン酸化は有意に増加した (図 2A, B)。レシピエント細胞のタウリン酸化亢進が A β 依存性に生じているか否かを検証すること目

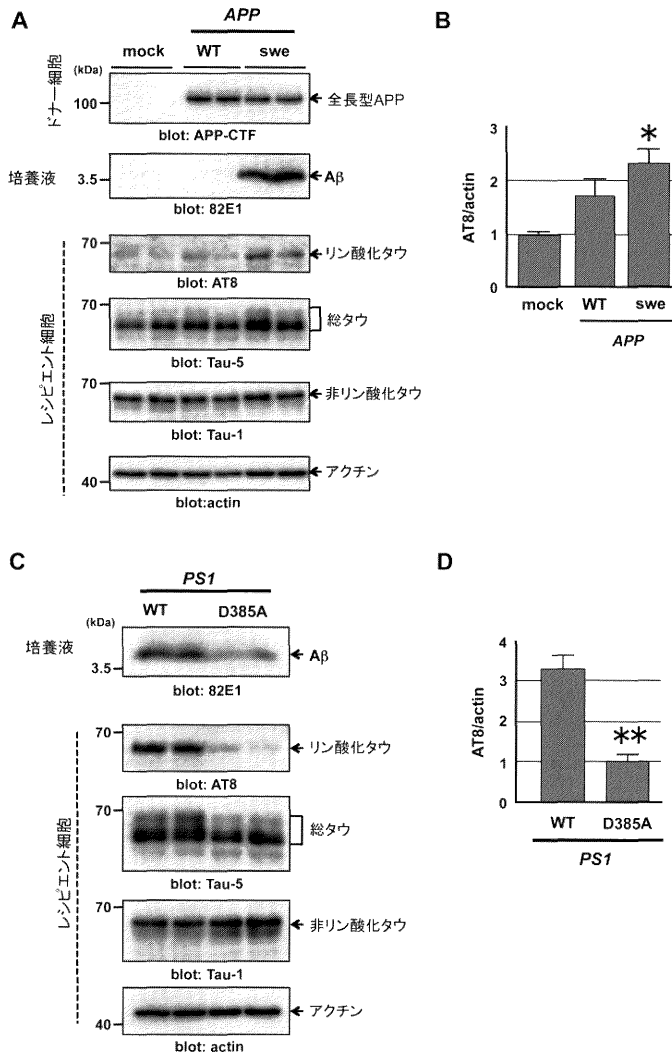


図2 細胞外A β 依存性に生じるN2a MAPT細胞内のタウリン酸化

- A) Mock, APP WT または APPswe を導入したドナー細胞をレシピエント N2a MAPT 細胞と 40 時間共培養を行った。培養上清およびドナー細胞、レシピエント細胞の細胞ライセイトを回収した。ドナー細胞に導入したヒト全長型 APP の発現を APP-CTF 抗体を用い検出した。培養上清の A β は抗 A β 抗体 82E1 を用いて解析した。レシピエント N2a MAPT 細胞ライセイトにおけるリン酸化タウを抗リン酸化タウ AT-8 抗体、総タウを抗タウ Tau-5 抗体、脱リン酸化タウを抗脱リン酸化タウ Tau-1 抗体を用いて検出した。
- B) 抗リン酸化タウ AT-8 抗体で検出したバンドをデンストメーターで半定量化し、アクチンにて補正した値を示した。結果は平均±標準誤差 (n = 4) で示した。群間比較は、analysis of variance (ANOVA) 検討の後、Tukey's 検定を行った。*P < 0.05
- C) 機能喪失型人工変異体である PS1 D385A を安定発現するドナー細胞に APPswe を導入し、レシピエント N2a MAPT 細胞との共培養を行った。PS1 D385A 変異体を安定発現するドナー細胞では、培養液中の A β 産生は著しく抑制され、レシピエント細胞の AT-8 抗体で検出されるリン酸化タウの亢進が抑制された。
- D) AT-8 抗体で検出されたリン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンにより補正した結果を示した。平均±標準誤差 (n = 3)。群間比較は t 検定により比較した。**P < 0.01。

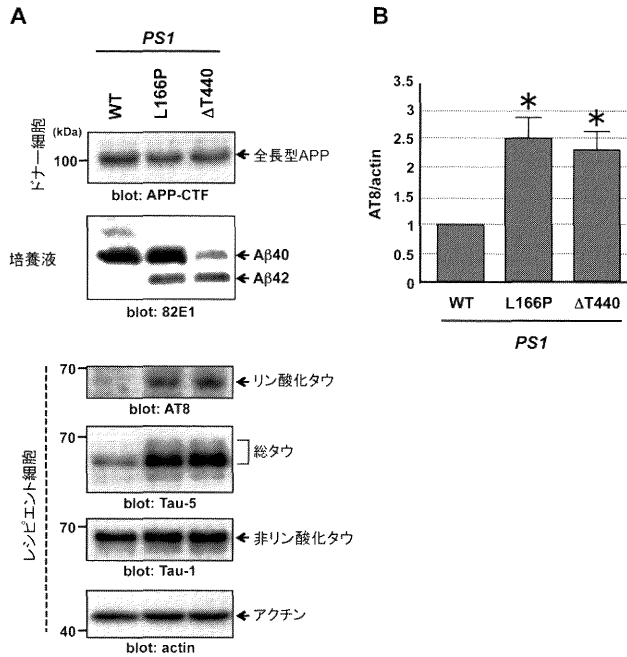


図3 家族性AD関連PS1変異によるタウ異常リン酸化の誘導

- A) 家族性AD関連PS1変異(L166P, ΔT440)を安定発現するドナー細胞にAPP WTを導入し、レシピエントN2a MAPT細胞との共培養を40時間行った。培養上清は、 $A\beta$ 40と $A\beta$ 42の分離が可能なbicine-ureaゲルを用い $A\beta$ を解析した。PS1変異を安定発現するドナー細胞では、培養液中の $A\beta$ 42の産生亢進を認めた。PS1変異を発現するドナー細胞との共培養では、レシピエント細胞におけるリン酸化タウの亢進を認めた。
- B) AT-8抗体で検出されたリン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンによる補正を行った。平均±標準誤差(n=4)。群間比較は、ANOVA検討の後、Tukey's検定を行った。* $P < 0.05$ 。

的に、 γ -secretase活性を消失したPS1 D385A人工変異を安定発現するドナー細胞との共培養を行った。PS1 D385A細胞にAPP^{swe}を導入すると、野生型PS1を発現するドナー細胞と比較し、培養液中の $A\beta$ 量は著しく減少し、さらにレシピエント細胞のリン酸化タウ亢進が抑制された(図2C, D)。これらの結果から、本研究で用いる共培養アッセイ系では、細胞外に存在する生理的な濃度の $A\beta$ に依存してレシピエント細胞のタウリン酸化亢進が誘導されることが示唆された。

家族性AD関連PS1変異およびAPPオリゴマー変異によるタウの異常リン酸化亢進

若年性家族性ADの原因となるPS1変異は、 $A\beta$ 42産生亢進が病態機序と深く関係することが知られている²⁶⁾。そこで、ドナー細胞にPS1変異(L166P, ΔT440)を安定発現させ、細胞外 $A\beta$ 42産生亢進がレシピエント細胞のタウリン酸化に及ぼす影響を検討した。変異PS1を安定発現するドナー細胞にAPP WTを導入すると、既報と同様に培養液中の $A\beta$ 42産生亢進が認められた(図3A)²⁰⁾²¹⁾。レシピエントN2a MAPT細胞と変異PS1安定発現細胞との共培養を行うと、野生型PS1安定発現細胞と比較して、レシピエント細胞のリン酸化タウ

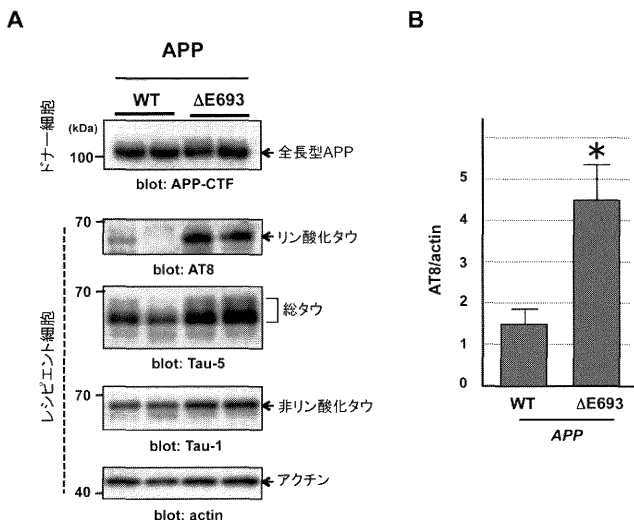


図4 オリゴマー型APP変異によるタウ異常リン酸化の誘導

- A) 家族性ADの原因変異として同定されたオリゴマー型APP変異(ΔE693)を導入したドナー細胞とレシピエントN2a MAPT細胞との共培養を40時間行った。APP WTを導入したドナー細胞と比較し、オリゴマー型APP変異(ΔE693)を導入したドナー細胞との共培養においては、レシピエント細胞のリン酸化タウの亢進を認めた。
- B) AT-8抗体で検出されたリン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンにより補正した結果を示した。平均±標準誤差(n=4)。群間比較はt検定により比較した。*P<0.05。

ウの亢進を認めた(図3A, B)。

最近家族性ADの原因として、オリゴマー形成を生じるAPP ΔE693変異が本邦から報告された²³⁾。この変異により、22番目のアミノ酸を欠失(ΔE22)Aβを産生される。この変異Aβ(ΔE22)は、アミロイド線維をつくらず、オリゴマー型Aβを*in vitro*および*in vivo*で産生させることが報告されている²³⁾²⁷⁾。ドナー細胞にAPP ΔE693コンストラクトを導入すると、培養上清中のAβは、Aβ1-40、およびAβ1-42を検出するELISAでは感度以下であるが、Aβオリゴマーを特異的に検出するELISAでは、APP WT導入細胞と比較して、高い値のAβオリゴマーが認められた(表1)。レシピエントN2a MAPT細胞とAPP ΔE693を導入したドナー細胞との共培養を行うと、レシピエント細胞のリン酸化タウが有意に亢進した(図4A, B)。これらの結果から、家族性ADの原因変異となる

Aβ分子種を産生するドナー細胞との共培養においても、リン酸化タウの亢進が誘導されることが示唆された。

Aβ依存性異常タウリン酸化におけるインスリンシグナル伝達の障害

細胞外Aβ依存性に異常タウリン化が誘導される過程にインスリンシグナル伝達に関与する可能性を考え、インスリンシグナル伝達の下流に存在する関連分子、Akt(Ser473)とGSK3β(Ser9)のインスリン添加によるリン酸化活性を検討した。APP^{swe}を導入したドナー細胞と16時間共培養したレシピエントN2a MAPT細胞にインスリン1μM刺激を加え、時間依存性のAkt(Ser473)とGSK3β(Ser9)リン酸化をリン酸化特異抗体を用いた免疫ブロットにより検出した。Mockを導入したドナー細胞では、時間依存性にAktおよび

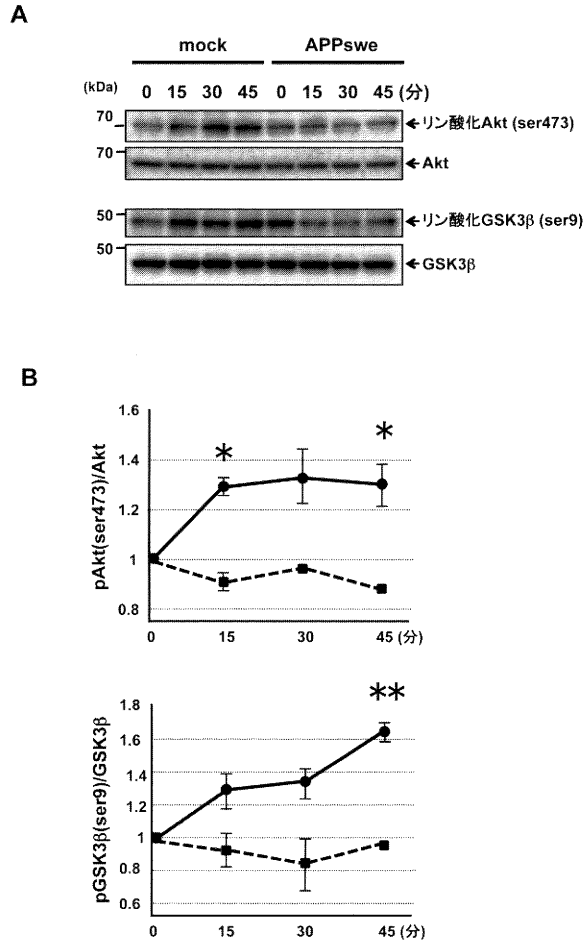


図5 インスリン依存性インスリンシグナル伝達関連 Akt および GSK3 β のリン酸化

- A) Mock または APPswe を導入したドナー細胞とレシピエント N2a MAPT 細胞の共培養を行い、インスリン 1 μ M 添加後に誘導されるインスリンシグナル伝達関連分子 Akt (Ser473), GSK β (Ser9) のリン酸化をリン酸化特異抗体により検討した。APPswe 導入ドナー細胞との共培養条件下では、インスリン刺激による Akt および GSK β のリン酸化が抑制されていた。
- B) リン酸化 Akt およびリン酸化 GSK β のバンドを、それぞれ総 Akt, 総 GSK β で補正を行い半定量化することにより時間依存性のインスリンシグナル活性を示した。インスリン刺激前の比率を基準に、mock 導入ドナー細胞との共培養条件を実線で、APPswe 導入ドナー細胞との共培養条件を破線で示した。平均土標準誤差 (n = 3)。各群を *t* 検定により比較した。**P* < 0.05。***P* < 0.01。

び GSK3 β のリン酸化が誘導されるのに対し、APPswe を導入したドナー細胞との共培養条件下では、インスリン刺激に対する Akt および GSK3 β のリン酸化活性が有意に抑制されていた (図 5A, B)。このことから、細胞外 A β 依存性に異常タウ

リン化が誘導される条件では、細胞内のインスリンシグナル伝達の障害が生じていることが示唆された。

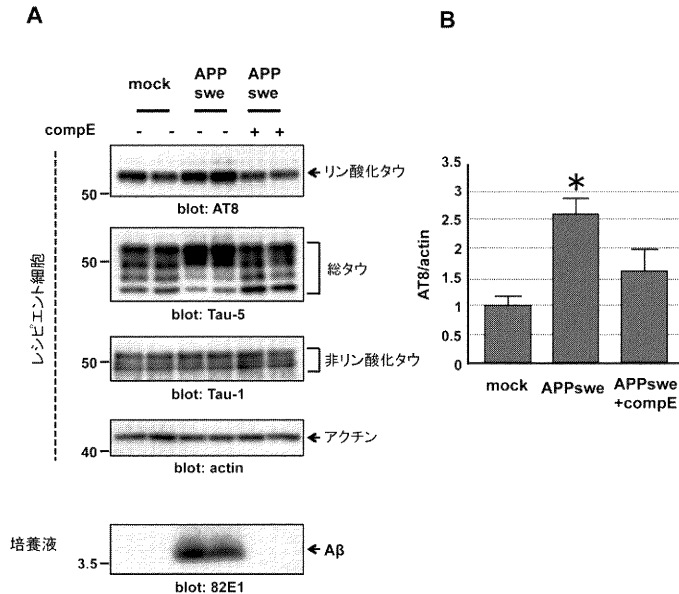


図6 細胞外A β による初代神経培養細胞の内在性タウのリン酸化への影響

- A) MockまたはAPPsweを導入したドナー細胞との共培養を、ラット大脳皮質初代神経培養細胞をレシピエント細胞として用い、細胞外A β が神経細胞の内在性タウに及ぼす影響を検討した。APPsweを導入したドナー細胞との共培養により、初代神経培養細胞の内在性タウの異常リン酸化の亢進が認められた。A β 産生を阻害する γ -secretase阻害剤(compound E 25nM)を培養液に添加すると、細胞外A β により誘発された異常タウリン酸化が抑制された。
- B) AT-8抗体で検出された内在性リン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンにより補正した結果を示した。平均±標準誤差(n=4)。群間比較はANOVA検討の後、Tukey's検定を行った。* $P < 0.05$ 。

細胞外A β による初代神経細胞の内在性タウのリン酸化への影響

次にレシピエント細胞としてラット胎児由来初代神経培養細胞を用いることにより、細胞外A β が神経細胞の内在性タウに及ぼす影響を検討した。MockおよびAPPsweを導入したドナー細胞とレシピエント初代神経培養細胞を40時間共培養を行った。APPsweを導入したドナー細胞との共培養においては、レシピエント初代神経培養細胞の内在性タウのリン酸化は有意に亢進していた(図6A, B)。また、総タウを検出する抗タウTau-5抗体での免疫ブロットでは、APPswe導入ドナー細胞との共培養で、神経細胞の内在性タウのバンドの上方へのシフトがSDS-PAGEゲル上で認められた(図6A)。APPswe導入ドナー細胞

との共培養時に γ -secretase阻害剤(compound E 25nM)を添加すると、培養液中のA β 産生が抑制され、神経培養細胞の内在性タウのリン酸化亢進も抑制された(図6A, B)。

また、家族性ADの原因変異となるPS1変異(L166P, Δ T440)を安定発現させたドナー細胞との共培養を行ったところ、初代神経培養細胞の内在性タウの異常タウリン酸化の亢進を認めた(図7A, B)。さらに、オリゴマー型A β を産生するAPP Δ E693変異を導入したドナー細胞との共培養を行うと、APP WT導入ドナー細胞との共培養と比較して、初代神経培養細胞の内在性タウのリン酸化が有意に増加した(図7C, D)。これらの結果から、ドナー細胞が産生する各種A β 分子種により、初代神経培養細胞の内在性タウの異常リン

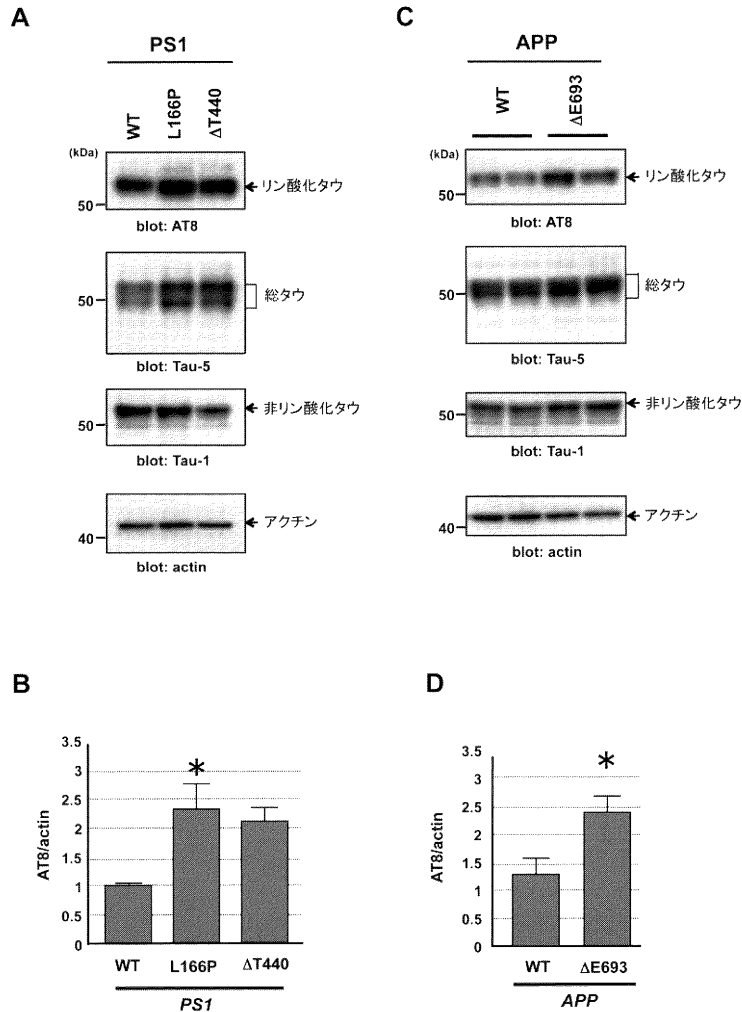


図7 家族性AD関連PS1変異、オリゴマー型APP変異による内在性タウのリン酸化への影響

- A) 家族性ADの原因変異であるPS1変異(L166P, Δ T440)を安定発現するドナー細胞にAPP WTを導入し、レシピエント初代神経培養細胞と40時間の共培養を行った。PS1変異を安定発現するドナー細胞との共培養において、初代神経培養細胞の内在性リン酸化タウの亢進を認めた。
- B) AT-8抗体で検出された内在性リン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンにより補正した結果を示した。平均±標準誤差 (n = 4)。群間比較はANOVA検討の後、Tukey's検定を行った。* $P < 0.05$ 。
- C) オリゴマー型 $A\beta$ を産生するAPP変異(Δ E693)を導入したドナー細胞とレシピエント初代神経培養細胞の共培養を40時間行った。APP WT導入ドナー細胞と比較して、APP Δ E693変異を導入したドナー細胞との共培養において、初代神経培養細胞内の内在性タウのリン酸化の亢進が認められた。
- D) AT-8抗体で検出されたリン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンにより補正した結果を示した。平均±標準誤差 (n = 4)。群間比較はt検定により比較した。* $P < 0.05$ 。

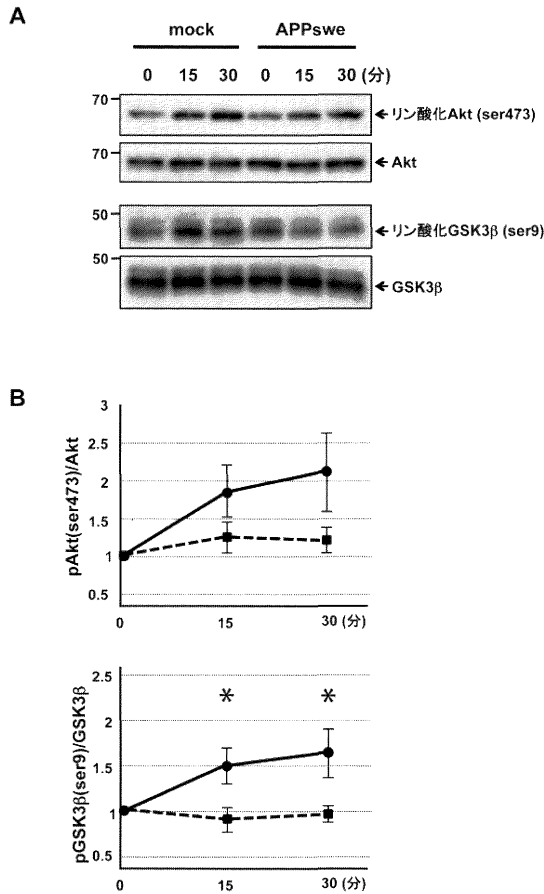


図8 初代神経培養細胞におけるインスリン刺激依存性シグナル伝達の検討

- A) Mock または APPswe を導入したドナー細胞とレシピエント初代神経培養細胞の共培養を行い、インスリン $1\mu\text{M}$ 添加後に誘導されるインスリンシグナル伝達関連分子 Akt (Ser473), GSK β (Ser9) のリン酸化を免疫ブロットにより解析した。APPswe 導入ドナー細胞との共培養条件下では、神経細胞内におけるインスリン刺激に連動した Akt および GSK β のリン酸化が抑制された。
- B) リン酸化 Akt およびリン酸化 GSK β のバンドを、それぞれ総 Akt, 総 GSK β で補正を行い半定量化することによりインスリンシグナルの活性化を示した。インスリン刺激前の比率を基準に、mock 導入ドナー細胞との共培養条件を実線で、APPswe 導入ドナー細胞との共培養条件を破線で示した。平均±標準誤差 (n = 4)。各群を *t* 検定により比較した。**P* < 0.05。

酸化が誘導されることが示唆された。

初代神経細胞におけるインスリンシグナル伝達障害とシグナル改善剤の効果

細胞外 A β を産生するドナー細胞との共培養により初代神経培養細胞内におけるインスリンシグ

ナル伝達の障害が生じているか否かを検討するために、APPswe 導入ドナー細胞と 16 時間共培養した初代神経細胞にインスリン刺激を行い、インスリン依存性に活性化される Akt (Ser473) および GSK3 β (Ser9) のリン酸化を検討した。Mock 導入ドナー細胞との共培養と比較して、APPswe 導

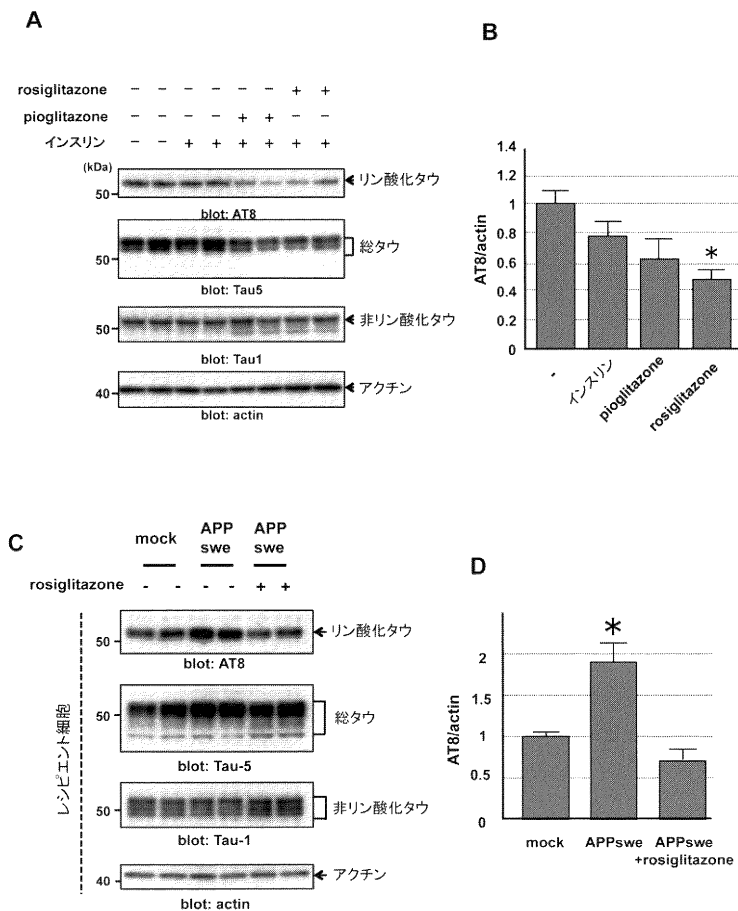


図9 インスリン抵抗性改善薬による内在性タウのリン酸化の変化

- A) 初代神経培養細胞に、インスリン 100nM 存在下にチアゾリジン系薬剤 pioglitazone 50 μ M, rosiglitazone 50 μ M を添加し 18 時間後に細胞ライセイトを回収した。神経細胞の内在性タウの挙動を抗タウ抗体により解析した。Pioglitazone, rosiglitazone 添加により、AT-8 抗体で検出されるリン酸化タウの減少が認められた。
- B) AT-8 抗体で検出されるリン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンの量により補正した値を薬剤非添加の条件を基準に示した。平均土標準誤差 (n = 4)。群間比較は ANOVA 検討の後、Tukey's 検定を行った。* $P < 0.05$ 。
- C) Mock または APPswe を導入したドナー細胞とレシピエント初代神経培養細胞の共培養を行い、チアゾリジン系薬剤 rosiglitazone 50 μ M とインスリン 100nM 添加による神経細胞内のリン酸化タウへの効果を検討した。細胞外 $A\beta$ 依存性に誘導される神経細胞内の異常タウリン酸化が、薬剤添加により抑制された。
- D) AT-8 抗体で検出されるリン酸化タウのバンドの半定量化を行い、アクチンの量により補正した値を薬剤非添加の条件を基準に示した。平均土標準誤差 (n = 3)。群間比較は ANOVA 検討の後、Tukey's 検定を行った。* $P < 0.05$ 。

入ドナー細胞との共培養では、神経細胞内のインスリン刺激依存性の Akt および GSK3 β のリン酸化は抑制されていた (図 8A, B)。このことから、初代神経培養細胞でも、細胞外 A β 依存性に異常タウリン酸化が生じている過程にインスリンシグナル伝達障害が生じている可能性が示唆された。

A β 依存性の異常タウリン酸化の過程にインスリンシグナル伝達が生じている可能性を示唆する知見に基づき、著者は神経細胞内のインスリンシグナル伝達を改善させることにより異常タウリン酸化を抑制できるか否かを検討した。インスリンシグナル伝達を改善させる薬剤として T2DM 患者に臨床応用されている PPAR γ 作動作用を有するチアゾリジン系薬剤 pioglitazone および rosiglitazone の効果を検証した。まず、初代神経培養細胞にインスリン 100nM 存在下に pioglitazone 50 μ M, rosiglitazone 50 μ M を添加し 18 時間培養した。細胞ライセイトを回収し、抗タウ抗体を用いた免疫ブロットで検討したところ、内在性タウのリン酸化が減少し、特に rosiglitazone では有意なリン酸化タウの減少を示した (図 9A, B)。次に、APPswe を導入したドナー細胞との共培養において、インスリン 100nM および rosiglitazone 50 μ M を培養液中に添加したところ、A β 依存性に生じる異常タウリン酸化を抑制する効果が認められた (図 9C, D)。

考 察

AD は認知症の原因として最も頻度が高い神経変性疾患であるが、いまだ病態機序は不明な点が多く、根本的治療法は確立していない。現在 AD 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⁵⁾、A β がどのようにしてタウの異常リン酸化を介し神経細胞脱落を引き起こすかについては明らかにされていない。本研究では新しい共培養アッセイ系を構築することにより、以下の点を明らかにした。1) 生理的な濃度の細胞外 A β により外来性および内在性タウの過剰リン酸化が誘導される、2) 細胞外 A β 依存性にタウ異常リン酸化が生じている条件ではインスリ

ン依存性のシグナル伝達が障害されている、3) インスリン抵抗性改善剤 rosiglitazone は、A β 依存性のタウ異常リン酸化を抑制する作用を有する。これらの知見は、AD 病態における A β 依存性のタウ異常リン酸化の分子病態メカニズムにおける新しい理解に繋がる可能性があると思われる。

本研究で用いた共培養アッセイ系は、A β の神経毒性を検討する上で幾つかの利点を有している。まず、細胞から産生される A β は、その前駆体タンパク APP からセクレターゼにより切断され、AD 病態で重要な A β 40 と A β 42 の比率はヒト生体内の比率と類似している。今までの多くの A β 合成ペプチド添加実験では、A β 40 もしくは A β 42 いずれか一種類の A β ペプチドの毒性が検討されている^{28)–31)}。次に、本研究での共培養アッセイ系で用いる A β 濃度が生体内で認める数 nM 範囲である点があげられる。これまで合成 A β ペプチドにより神経細胞死やタウリン酸化を誘導したという報告があるが、これらの報告では 1 μ M 程度の高い濃度の合成ペプチドが用いられている^{29)–31)}。この濃度は AD 患者髄液中の A β 濃度よりも数百倍程度高くなっており、AD 患者脳内で生じている病態を正確に再現していない懸念がある。このように、本研究で用いた共培養アッセイは、生理的な細胞外 A β により神経細胞内で生じるタウリン酸化あるいはシグナル伝達異常を検証できる優れた *in vitro* システムであると考えられた。

最近の久山町研究およびロッテルダム研究から、T2DM に関連したインスリン抵抗性が AD 発症のリスクになることが明らかにされている¹²⁾¹³⁾。インスリン抵抗性が AD 発症を促進させる分子メカニズムは十分には明らかにされていないが、ヒト剖検脳においてインスリンシグナル伝達を検討したいくつかの報告がある。Lee らは AD 患者脳ではリン酸化 Akt および Akt 活性が低下していると報告し¹⁵⁾、Liu らは T2DM を合併した AD 患者脳ではインスリン受容体基質 (IRS-1)、リン酸化 Akt、リン酸化 GSK3 β が低下していると報告している¹⁶⁾。また、AD 患者脳の神経細胞における IR の局在が、細胞内に濃縮されているという報告も

ある¹⁷⁾。インスリンシグナル伝達関連分子の死後脳における挙動は、生前のAD病態を直接的には反映しないという問題点はあるものの、これらの知見は、T2DMとADに共通した分子機序に脳内のインスリンシグナル伝達障害が存在する可能性を示唆する所見と考えられる。本研究では細胞外 $A\beta$ 依存性に神経細胞のインスリンシグナル伝達障害が認められたことから、 $A\beta$ 毒性によりインスリンシグナル伝達が誘導され、その関連分子であるGSK3 β を介してタウ異常リン酸化が生じる機序が想定された³²⁾。

$A\beta$ 依存性にインスリンシグナル伝達を介して神経細胞の異常タウリン酸化を誘導するという本研究の知見は興味深い。細胞外 $A\beta$ がインスリンシグナル伝達を障害する機序については未解決である。想定される機序としては、インスリンとIRの結合を $A\beta$ が競合阻害する機序³³⁾、オリゴマー型 $A\beta$ が神経細胞表面のIRを減少させる機序³⁴⁾などが報告されている。筆者は、細胞表面のIRをビオチン化標識する実験を行ったが、細胞外 $A\beta$ が存在する条件においても神経細胞表面のIR量に変化は認めなかった(データ非表示)。細胞外 $A\beta$ が神経細胞のIRの機能および局在に及ぼす影響については、より詳細な検討が必要であろう。

ADの中核病理所見であるタウ異常リン酸化をインスリンシグナル伝達障害から理解することにより、ADに対する新たな治療アプローチが考えられる。本研究において筆者は、インスリン抵抗性改善作用を有するチアゾリジン系薬剤rosiglitazoneが $A\beta$ 依存性に誘導されるタウ異常リン酸化を抑制することを見出した。Rosiglitazoneは核内受容体型の転写因子であるPPAR γ 作動薬であり³⁵⁾、末梢臓器では脂肪細胞の分化、アディポカインの分泌促進などを介してインスリン感受性を高めることが知られている³⁴⁾。Rosiglitazoneの標的分子であるPPAR γ は脳内にも存在している点³⁶⁾、rosiglitazoneが脳血液関門を通過する薬剤である点³⁷⁾などから、rosiglitazoneが脳内インスリンシグナルの改善を介してタウ異常リン酸化の抑制効果を示す可能性は十分に考えられる。チ

アゾリジン系薬剤rosiglitazone, pioglitazoneともにT2DM患者の治療薬として国内外で臨床応用されており、臨床研究段階ではAD患者を対象としたチアゾリジン系薬剤の治験が行われている。WatsonらはAD患者における二重盲検試験を行い、rosiglitazone内服群で認知機能の有意な改善を報告している³⁸⁾。一方、Goldらが行ったrosiglitazoneを用いた多施設共同二重盲検試験では、プラセボ群との比較でrosiglitazone内服による認知機能に対する有意な効果は認めなかったと報告されている³⁹⁾。またSatoらは、DMを合併したAD患者を対象としたpioglitazoneの臨床治験において、pioglitazone内服群で認知機能の改善と脳血流量の有意な増加を認めたと報告した⁴⁰⁾。さらに、脳内に選択的にインスリン投与(経鼻的投与)することでアルツハイマー病の前段階である軽度認知障害とAD患者の認知機能を改善したとの報告⁴¹⁾もあり、脳内の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して注目されつつある。今後AD病態における脳内のインスリンシグナル伝達障害の関与について検討することが、ADの分子病態機序の解明、治療法開発に重要と思われる。

結 論

生理的な濃度の細胞外 $A\beta$ がタウの異常リン酸化を誘導する共培養システムを構築した。この共培養システムを用い、 $A\beta$ 量の増加、家族性ADに関連する $A\beta$ 42産生亢進やオリゴマー型 $A\beta$ によってもタウの異常リン酸化が誘導されることを見出した。細胞外 $A\beta$ の存在がタウ異常リン酸化を誘導する条件下ではインスリンシグナル伝達が障害され、インスリン抵抗性改善薬の添加によりタウの異常リン酸化が抑制された。すなわち $A\beta$ によりインスリンシグナル伝達障害が誘導され、インスリンシグナル関連分子GSK3 β の不活化の抑制を介して、タウの異常リン酸化をきたす機序が想定された。この結果はインスリン抵抗性がAD病態へ及ぼす分子生物学的機序を示すとともに、 $A\beta$ がタウの異常リン酸化を誘導する病態機序の

一つを説明しうる知見と考えられた。インスリン抵抗性改善剤は、 $A\beta$ 依存性に生じるタウの異常リン酸化を軽減する作用を認めたことから、脳内インスリン抵抗性を標的とした治療がADの新たな治療法に結びつく可能性があると考えられた。

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 西澤正豊教授、春日健作先生、同 超域学術院 池内健准教授に深謝いたします。

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) 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* 20: 885 - 890, 1984.
- 3) 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.
- 4) Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M and Alzheimer's Disease International: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366: 2112 - 2217, 2005.
- 5) 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.
- 6) Morishim - Kawashima M, Oshima N, Ogata H, Yamaguchi H, Yoshimura M Sugihara S and Ihara Y: Effect of apolipoprotein E allele epsilon4 on the initial phase of amyloid beta - protein accumulation in the human brain. *Am J Pathol* 157: 2093 - 2099, 2000.
- 7) Wisniewski Ke, Wisniewski HM and Wen GY: Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 17: 278 - 282, 1985.
- 8) Selkoe DJ: Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes, and treatments. *Science* 275: 630 - 631, 1997.
- 9) Braak H and Braak E: Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239 - 259, 1991.
- 10) Profenno LA, Porsteinsson AP and Faraone SV: Meta - Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders. *Biol Psychiatry* 67: 505 - 512, 2010.
- 11) Barnes DE and Yaffe K: The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol* 10: 819 - 828, 2011.
- 12) Schrijvers EM, Wittman JC, Sijbrands EJ, Hofman A, Koudstaal PJ and Breteler MM: Insulin metabolism and the risk of Alzheimer disease: The Rotterdam Study. *Neurology* 75: 1982 - 1987, 2010.
- 13) Ohara T, Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Hata J, Iwaki T, Kanba S and Kiyohara Y: Glucose tolerance status and risk of dementia in the community: the Hisayama study. *Neurology* 77: 1126 - 1134, 2011.
- 14) Biessels GJ, Staekenborg S, Bmner E, Brayne C and Scheltens P: Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet Neurol* 5: 64 - 74, 2006.
- 15) Lee HK, Kumar P, Fu Q, Rosen KM and Querfurth HW: The insulin/Akt signaling pathway is targeted by intracellular beta - amyloid. *Mol Biol Cell* 20: 1533 - 1544, 2009.
- 16) Liu Y, Liu F, Grundke - Iqbal I, Iqbal K and Gong CX: Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol* 225: 54 - 62, 2011.
- 17) Moloney AM, Griffin RJ, Timmons S, O'Connor R, Ravid R and O'Neill C: Defects in IGF - 1 receptor, insulin receptor and IRS - 1/2 in Alzheimer's disease indicate possible resistance to IGF - 1 and insulin signalling. *Neurobiol Aging* 31: 224 - 243,

- 2010.
- 18) Bevan P: Insulin signalling. *Journal of Cell Science* 114: 1429 - 1430, 2001.
 - 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) Moehlmann T, Winkler E, Xia X, Edbauer D, Murrell J, Capell A, Kaether C, Zheng H, Ghetti B, Haass C and Steiner H: Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8025 - 8030, 2002.
 - 21) Kaneko H, Kakita A, Kasuga K, Nozaki H, Ishikawa A, Miyashita A, Kuwano R, Ito G, Iwatsubo T, Takahashi H, Nishizawa M, Onodera O, Sisodia SS and Ikeuchi T: Enhanced accumulation of phosphorylated alpha-synuclein and elevated beta-amyloid 42/40 ratio caused by expression of the presenilin-1 deltaT440 mutant associated with familial Lewy body disease and variant Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27: 13092 - 13097, 2007.
 - 22) Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT and Selkoe DJ: Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398: 513 - 517, 1999.
 - 23) 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.
 - 24) Xia W, Yang T, Shankar G, Smith IM, Shen Y, Walsh DM and Selkoe DJ: A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 66: 190 - 199, 2009.
 - 25) Kasuga K, Tokutake T, Ishikawa A, Uchiyama T, Tokuda T, Onodera O, Nishizawa M and Ikeuchi T: Differential levels of alpha-synuclein, beta-amyloid42 and tau in CSF between patients with dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81: 608 - 610, 2010.
 - 26) Kumar-Singh S, Theuns J, Van Broeck B, Pirici D, Vennekens K, Corsmit E, Cruts M, Dermaut B, Wang R and Van Broeckhoven C: Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat* 27: 686 - 695, 2006.
 - 27) Tomiyama T, Matsuyama S, Iso H, Umeda T, Takuma H, Ohnishi K, Ishibashi K, Teraoka R, Sakama N, Yamashita T, Nishitsuji K, Ito K, Shimada H, Lambert MP, Klein WL and Mori H: A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo. *J Neurosci* 30: 4845 - 4856, 2010.
 - 28) Iversen LL, Mortishire-Smith RJ, Pollack SJ and Shearman MS: The toxicity in vitro of beta-amyloid protein. *Biochem J* 311: 1 - 16, 1995.
 - 29) Zempel H, Thies E, Mandelkow E and Mandelkow EM: Abeta oligomers cause localized Ca²⁺ elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J Neurosci* 30: 11938 - 11950, 2010.
 - 30) Malaplate-Armand C, Florent-Bécharde S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T and Pillot T: Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis* 23: 178 - 189, 2006.
 - 31) Chong YH, Shin YJ, Lee EO, Kayed R, Glabe CG and Tenner AJ: ERK1/2 activation mediates Abeta oligomer-induced neurotoxicity via caspase-3 activation and tau cleavage in rat organotypic hippocampal slice cultures. *J Biol Chem* 281: 20315 - 20325, 2006.
 - 32) Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M and Ikeuchi T:

- Hyperphosphorylation of tau induced by naturally secreted amyloid- β at low nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent AKT-GSK3 β signaling pathway. *J Biol Chem.* in press
- 33) 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.
- 34) 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.
- 35) Smith SA: Central role of the adipocyte in the insulin-sensitising and cardiovascular risk modifying actions of the thiazolidinediones. *Biochimie* 85: 1219-1230, 2003.
- 36) Kummer MP and Heneka MT: PPARs in Alzheimer's Disease. *PPAR Res* 2008 : 403896, 2008.
- 37) Sheu WH, Chuang HC, Cheng SM, Lee MR, Chou CC and Cheng FC: Microdialysis combined blood sampling technique for the determination of rosiglitazone and glucose in brain and blood of gerbils subjected to cerebral ischemia. *J Pharm Biomed Anal* 54: 759-764, 2011.
- 38) Watson GS, Cholerton BA, Reger MA, Baker LD, Plymate SR, Asthana S, Fishel MA, Kulstad JJ, Green PS, Cook DG, 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.
- 39) Gold M, Alderton C, Zvartau-Hind M, Egginton S, Saunders AM, Irizarry M, Craft S, Landreth G, Linnamägi U and Sawchak S: Rosiglitazone monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30: 131-146, 2010.
- 40) Sato T, Hanyu H, Hirao K, Kanetaka H, Sakurai H and Iwamoto T: Efficacy of PPAR- γ agonist pioglitazone in mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 32: 1626-1633, 2011.
- 41) Reger MA, Watson GS, Green PS, Wilkinson CW, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, Plymate SR, Breitner JC, DeGroot W, Mehta P and Craft S: Intranasal insulin improves cognition and modulates beta-amyloid in early AD. *Neurology* 70: 440-448, 2008.

(平成24年1月13日受付)