

栄養代謝調節経路の変容による認知機能低下発症機構の解明に関する研究（21-3）

主任研究者 田口 明子 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（部長）

研究要旨

研究期間（2021年度・2022年度）全体について：

2型糖尿病は、認知症のリスク要因の一つとして知られるようになったことから、脳での糖代謝調節経路インスリンシグナルの認知機能障害発症機序への関与が示唆されている。先行研究から、アルツハイマー病(AD)患者死後脳でインスリンシグナル（調節）分子の特異的な変化が発見されたが、これらの変化が脳のどのような細胞で生じているのか、また、栄養代謝と認知機能の調節における当該分子の役割については不明である。本研究では、2型糖尿病を誘導したADモデルマウス、脳のインスリンシグナル分子変異マウス、およびAD患者死後脳を用いて、糖代謝・脳インスリンシグナル・認知機能の相互関係を明らかにすることを介して、認知症の根本的な発症メカニズムを理解することを目標としている。

2年間の解析から、高脂肪食付加による2型糖尿病の誘導は、正常な認知機能を示すがアミロイドβの蓄積が生じている若齢期の次世代型ADモデルマウスに顕著な耐糖能異常を誘導したが、認知機能障害を発症している中年期以降の当該マウスで抑制され、認知機能障害の悪化も相加的レベルで抑えられることを明らかにした。若齢期、中年期以降に関わらず、栄養代謝異常あるいは認知機能障害に伴い脳インスリンシグナル分子の変容が観察された。一方、神経細胞特異的インスリンシグナル分子の欠損変異マウスでは認知機能の変容は見られなかったが、脳の栄養代謝を担うアストロサイトにおける当該分子の欠損変異は、脳の栄養エネルギー代謝物の減少と調節関連分子の発現を低下させ、体系的な糖代謝異常と海馬と前脳に関連する空間認知機能低下を誘導することを見出した。さらに、これらのマウスモデルの解析で共通に見られる脳インスリンシグナル分子の変化とアストロサイトに発現する栄養代謝調節因子の変動は、AD患者死後脳でも観察された。これらの解析から、糖代謝経路調節因子および栄養代謝関連分子の変容は、認知症の未知な発症機序に関与する可能性が示された。

主任研究者

田口明子 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（部長）

分担研究者

柴山雄大 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（研究員）

（2021年4月～2021年10月）

辻竜平 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（研究員）

（2021年11月～2023年3月）

酒井和哉 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（特任研究員）

（2022年10月～2023年3月）

王蔚 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（外来研究員）

田之頭大輔 国立長寿医療研究センター 統合神経科学研究部（外来研究員）

研究期間 2021年4月1日～2023年3月31日

A. 研究目的

研究期間（2021年度・2022年度）全体について：

中年期の肥満・2型糖尿病は、認知症のリスク要因の一つとして広く知られるようになったが、最近の研究から、高齢期では、肥満は認知症を抑制する一方で、体重減少・低栄養が認知症を誘導する重要な要因であることが明らかとなってきた。先行研究から、栄養エネルギー代謝調節経路インスリンシグナル分子の特異的な変化がアルツハイマー病(AD)患者死後脳で発見されていたが、これらの変化が脳のどのような細胞で生じているのか、また、栄養代謝と認知機能の調節における当該分子の脳での役割については不明である。本研究では、栄養代謝異常と認知機能障害を呈する各種動物モデル{高脂肪食(HFD)付与による2型糖尿病誘導次世代型ADモデルマウス；アストロサイト特異的インスリンシグナル分子欠損マウス}とAD患者死後脳を用いた解析から、脳インスリンシグナル経路と認知機能および体系的栄養エネルギー代謝の相互関係を明らかにし、認知症の根本的な発症機序を理解することを目的とする。

B. 研究方法

研究期間（2021年度・2022年度）全体について：

1. 栄養代謝異常・認知機能障害を呈するマウスモデルの作製：

- 1)-1 2型糖尿病誘導若齢期ADモデルマウスの作製：APPKIマウスに4週齢から16週齢まで高脂肪食（60kcal% 脂肪含有量）を投与し作製。

- 1)-2 2 型糖尿病誘導中年期 AD モデルマウスの作製： APPKI マウスに 4 週齢から 37 週齢まで高脂肪食（60kcal% 脂肪含有量）を投与し作製。
 - 2) グリア特異的インスリンシグナル（調節）分子変異マウス：アストロサイト特異的 hGFAP-Cre マウスと floxed マウスの交配後 6 週齢でタモキシフェンを投与し、成体アストロサイト特異的欠損マウスを作製。
2. ヒト疾患組織：AD 患者死後脳：
神経原線維変化ステージ V, VI の脳検体を使用（新潟大学脳研から供与）。
 3. 糖代謝調節経路および関連シグナルの解析：
各種マウス脳およびヒト死後脳およびインスリン標的末梢組織（肝臓、脂肪組織、骨格筋）を分離後ホモジネートした細胞溶解液を用いて、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA 法および質量分析法により解析を行った。
 4. 組織学的解析：
各種マウス脳およびヒト死後脳およびインスリン標的末梢組織（肝臓、脂肪組織、骨格筋）を分離、固定、脱水後、切片を作製した。脳切片：神経細胞新生、神経炎症等；末梢組織：組織および細胞形態等を査定するため、特異的な各種抗体およびその他標的分子の抗体を用いた免疫組織学的解析を行い、コンフォーカル顕微鏡により評価した。
 5. 行動解析：
自発活動量、空間認知記憶、長期記憶をオープンフィールド試験、Y 字迷路試験、T 字水迷路試験、モリス水迷路試験、受動回避試験により解析した。
 6. 代謝パラメーター解析：
体重、血糖値は週毎に測定し、血中ホルモン値は ELISA 解析により測定した。糖代謝能はグルコース耐性試験およびインスリン耐性試験により評価した。血中脂質については生化学検査によって評価した。深部体温は直腸温度により評価した。

（倫理面への配慮）

研究期間（2021 年度・2022 年度）全体について：

本研究は、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験管理規程及び国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験管理細則に準ずる。動物実験での使用個体数は綿密に実験計画を立てた後、必要最小限に留め、実験終了後はすみやかに麻酔により安楽死させる。動物実験は、国立長寿医療研究センターの動物実験委員会での審査を受けて実施する。また、その愛護に留意し、痛みを防止するため適切な麻酔薬などを用いて実験を行う。実験動物数は最小限に留め、屠殺は法令で決められた方法に準拠する。

C. 研究結果

研究期間（2021年度・2022年度）全体について：

1. 2型糖尿病がAD病態へ与える影響についての検討

高脂肪食付加による2型糖尿病を誘導した次世代型ADモデル (APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウスの解析から、認知機能は正常であるがすでにアミロイドβ (Aβ) の蓄積が始まっている若齢 APPKI (YgHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウスは、対照群 (YgHFD-WT マウス) と同様に有意な体重増加を示し、同程度の高インスリン血症を示したが、対照群より重篤な耐糖能異常を呈することから、2型糖尿病の誘導に対して脆弱であることが示された。しかしこの時、観察されたこれらの栄養代謝異常は、APPKI^{NL-GF/NL-GF} マウスのAβ値へ影響を与えず記憶学習能にも障害を誘導しなかった (Wang et al. BioRxiv 2022; Neuropsychopharmacol Rep 2022)。

対照的に、2型糖尿病付与中年期 APPKI^{NL-GF/NL-GF} (Middle-agedHFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF}) マウスでは、対照群であるHFD付与野生型 (Middle-agedHFD-WT) マウスで見られる栄養代謝異常が抑制されていた。インスリン標的末梢臓器について解析を行ったところ、顕著な糖代謝異常値を示す Middle-aged HFD-WT マウスに対して、Middle-aged HFD- APPKI^{NL-GF/NL-GF} マウス肝臓の中性脂肪の蓄積は低下しており、精巣上体脂肪細胞形態は同齢普通食野生型 (Middle-agedND-WT) マウスと類似レベルであることが判明した。一方、Middle-aged HFD-APPKI^{NL-GF/NL-GF} マウスではアミロイドβとは独立に相加的レベルでの認知機能低下亢進が見られ、この際、脳インスリンシグナル分子の変化亢進とミトコンドリア関連因子の発現変化が観察されたが、神経炎症と海馬の神経細胞新生に有意な変化は見られなかった。

興味深いこととして、若齢期・中年期に関わらず、代謝の変容あるいは認知機能変化に伴い脳インスリンシグナル分子の変化が連動することを見出した。また、元より、APPKI^{NL-GF/NL-GF} マウスでは、脳のインスリンシグナル分子の有意な低下とアストロサイトに発現するモノカルボン酸トランスポーターの発現低下が生じていることが分かった。

2. 認知機能・栄養エネルギー代謝の調節におけるアストロサイトにおけるインスリンシグナル分子の役割についての検討

脳のエネルギー栄養代謝調節を担うアストロサイトでインスリンシグナル分子を欠損させたマウスでは、体重、随時血糖値に変化は見られ無いが、若齢期で耐糖能異常を示すと共に海馬および前脳に係る空間認知機能の低下とアストロサイトの老化様形態異常が観察され、さらに、ミトコンドリア関連因子と海馬の乳酸値の顕著な変化が惹起されていた。この時、海馬関連認知機能と正の相関が見られる神経細胞神経の低下が観察され、さらに、アストロサイトに発現するモノカルボン酸トランスポーターおよびグルコーストランスポーターの有意な発現変動が観察された。一方、インスリン標的臓器である肝臓のインスリンおよび関連シグナル分子に変化は無く、骨格筋ではグルコーストランスポーターに変化は見られなかったが、インスリン刺激後の関連シグナル分子の異常な活性化変動が生じていることが分かった。また、認知症発症前からも観察される体温調節異常が本マウスでも観察された。

3. AD 患者死後脳を用いた解析

AD患者死後脳を用いた先行研究においてインスリンシグナル分子の特異的変化の亢進が発見されたことから、当該分子の認知症への関与が示唆されているが、我々は、AD患者死後脳（新潟大学脳研より分与）を用いた解析から、高度な神経細胞脱落と神経原線維変化（NFT）の進行段階に準じて当該分子群の発現レベルの低下が起こっていることを明らかにした。この時、インスリンシグナル分子群下流の主要なキナーゼ分子の殆どに変化は見られなかったが、ストレスシグナルのキナーゼのリン酸化レベルには変化が観察された。当該分子の低下は、ADモデルマウスおよびアストロサイト特異的インスリンシグナル分子欠損マウスにも共通して観察されるが、これらの動物モデルと共通に、AD死後脳でも、アストロサイトに発現するモノカルボン酸トランスポーターおよびグルコーストランスポーターのステージの進行に伴う発現変動が観察され、ミトコンドリア関連因子についても変化が見られることを明らかにした。

D. 考察と結論

研究期間（2021年度・2022年度）全体について：

1. 2型糖尿病がAD病態へ与える影響についての検討

若齢期 APPKI マウスは、2型糖尿病の誘導に対して脆弱であることから、 $A\beta$ の蓄積は、糖代謝異常の要因となる可能性が示された。これは、糖尿病が認知症の危険因子であると共に、認知症が糖尿病の発症に関与することを示した先行研究を支持する知見となったが、主訴が糖尿病である場合、脳に $A\beta$ の蓄積があるかどうかの検査は一般的に実施されないため、本可能性を検討することは現実的には困難である。また、認知症患者の物忘れによる食行動異常に起因する肥満や糖尿病の発症があった場合も、原因を明らかにすることは難しいが、食行動への介入の上で、精査する方法はあると考える。また、 $A\beta$ の蓄積が食行動や代謝調節に関与する視床下部で見られる場合が明らかとなった場合は、 A 蓄積の摂食調節神経細胞への直接的な影響も考慮すべき将来が来る可能性も考えられる。

一方、栄養代謝異常の亢進が惹起されても $A\beta$ 値、認知機能、脳インスリンシグナル分子の特異的 Ser リン酸化に変化が無かったことから、少なくとも、APPKI マウスにおける認知機能障害誘導には、栄養代謝異常に加え、“加齢”という要因が重要であることが示唆される。他方、中年期以降の APPKI マウスは、若齢期と異なり 2 型糖尿病の誘導に対して抵抗性を示したことから、中年期以降における $A\beta$ の蓄積は、過栄養による栄養代謝異常を抑制することが示唆される。また、高脂肪食付加 2 型糖尿病誘導野生型マウスで見られる顕著な認知機能障害は、APPKI マウスでは認知機能低下の相加的レベルの悪化に留まったことから、高脂肪食は当該マウスの認知機能低下を積極的に増悪化はできなかった。脂肪割合の低い高脂肪食は、北極型変異を持たない APPKI^{NL-F/NL-F} マウスの認知機能の軽度の悪化を誘導したことから (Mazzei et al. 2020)、高脂肪食の脂肪割合の違いが、

神経変性への影響の差異を齎す可能性も考えられる。AD の脳ではエネルギーの枯渇が見られることから、高脂肪食は、AD の低エネルギー病態を改善する可能性も考えられる。 $A\beta$ の蓄積がエネルギー代謝を亢進させることで過栄養による影響を抑えている可能性については、呼吸商、ベージュ細胞・褐色脂肪組織量等についての検討が必要である。

2. 認知機能・栄養エネルギー代謝の調節におけるアストロサイトにおけるインスリンシグナル分子の役割についての検討

アストロサイトにおけるインスリンシグナル分子の欠損は、アストロサイト自身の形態変化、脳特異的なエネルギー代謝物と代謝調節関連因子群、ミトコンドリア関連分子の発現変動を誘導し、海馬の神経細胞新生低下を伴う海馬関連空間認知機能障害と耐糖能異常を誘導することから、アストロサイトのインスリンシグナル分子を介した経路は、脳の栄養代謝および代謝調節因子とミトコンドリア関連分子の発現調節に関与し、体系的な糖代謝と海馬に関連する認知機能調節に重要な役割を果たすことが示唆された。先行研究から、アストロサイトの IGF1 受容体 (IGF1R) 欠損マウスが、類似の表現系を示し、一方、アストロサイトのインスリン受容体 (IR) 欠損マウスでは、類似の代謝変化が見られることから、アストロサイトのインスリンシグナル分子の上流は、代謝制御については IR、認知機能調節については IGF1R 等と、脳の場所および細胞特異的機能によって上流受容体の優勢度が異なっている可能性が考えられる。アストロサイトのインスリンシグナルの脳場所あるいは細胞特異的な詳細な役割や作用機序の理解のためには、網羅的な関連分子探索による検討が必要であると考えられる。

3. AD 患者死後脳を用いた解析

インスリンシグナル分子群の発現が NFT ステージの進行に伴い減少し、上流としては IGF1R の低下が見られることから、海馬、前脳では、IR より IGF1R が優勢であり、IGF1R およびインスリンシグナル分子群の低下によるインスリンシグナル活性化低下が示唆される。同様の結果は、栄養代謝異常と認知機能障害を呈する HFD- APPKI^{NL-GF/NL-GF} マウスとアストロサイト特異的インスリンシグナル分子欠損マウスの脳でも見られているが、一方、下流については、主要なキナーゼ分子の殆どに変化は見られなかった。その中で、ストレスシグナルのキナーゼのリン酸化レベルに変化が観察されたが、未知の下流経路の存在も示唆される。さらに、両者マウスモデルで共通に見られたアストロサイトに発現する栄養エネルギー代謝調節因子とミトコンドリア関連分子の変動は AD 患者死後脳検体でも観察されたことから、脳インスリンシグナル分子とアストロサイトを介した脳の栄養エネルギー代謝関連因子の変化は、アミロイド β に関わらず、認知機能障害および認知症の発症に共通の変容である可能性が考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2021 年度

- 1) Tanokashira D, Wang W, Maruyama M, Kuroiwa C, White MF, Taguchi A*. Irs2 deficiency alters hippocampus-associated behaviors during young adulthood. *Biochem Biophys Res Commun.* 559:148-154 2021
doi:10.1016/j.bbrc.2021.04.101
- 2) Wang W, Tanokashira D, Maruyama M, Kuroiwa C, Saito T, Saido TC, Taguchi A*. Young APPKI^{NL-G-F/NL-G-F} mice display high-fat diet-induced metabolic disturbances and specific disorders associated with brain energy homeostasis. *BioRxiv* 2021 doi:10.1101/2021.12.21.473697
- 3) 田口明子*, 石塚公子. 全身性の代謝・炎症から腸内細菌、プロテオスタシスの影響まで-精神神経疾患と栄養エネルギー代謝障害-
実験医学 39(9):1331-1336, 2021

2022 年度

- 1) Wang W, Tanokashira D, Shibayama Y, Tsuji R, Maruyama M, Kuroiwa C, Saito T, Saido C T, Taguchi A*. Effects of high-fat diet on nutrient metabolism and cognitive functions in young APPKI^{NL-G-F/NL-G-F} mice. *Neuropsychopharmacology Reports* 42(3):272-280, 2022
- 2) Taguchi A*. The Association between Insulin Signaling, Type2 Diabetes, And Cognitive Dysfunction
Int J Endocrinol Diabetes 6(1):148, 2023 doi.org/10.36266/IJED/148

2. 学会発表

2021 年度

- 1) 田口明子. 神経疾患と栄養エネルギー代謝障害 Neurological disorders and impaired nutritional energy metabolism
第 75 回日本栄養・食糧学会大会 2021 年 7 月 4 日 (Web 開催:招待講演)
- 2) 王蔚、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、Morris F White, 田口明子
グリア細胞インスリンシグナルを介した代謝異常・認知機能障害発症機序の解明
第 63 回日本老年医学会学術集会 2021 年 6 月 11~7 月 4 日 (Web 開催)
- 3) 王蔚、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、Morris F White, 田口明子
栄養代謝および認知機能の調節におけるグリアインスリンシグナルの役割についての

検討 第 36 回日本糖尿病合併症学会 2021 年 10 月 8～11 月 8 日 滋賀県大津市 (Web 発表)

- 4) 田口明子、王蔚、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、Morris F White
グリアインスリンシグナルを介した認知機能障害発症機序の解明
第 40 回日本認知症学会学術集会 2021 年 11 月 27 日 東京 (Web 発表)
- 5) 田之頭大輔、王蔚、丸山めぐみ、黒岩智恵美、齊藤貴志、西道隆臣、田口明子
認知症の発症・進行における脳インスリンシグナルの役割
第 47 回日本神経内分泌学会学術集会 2021 年 10 月 30 日 奈良市 (Web 発表)
- 6) Daisuke Tanokashira, Wei Wang, Megumi Maruyama, Chiemi Kuroiwa, Morris White, Akiko Taguchi. IRS2 deficiency accompanied by type 2 diabetes exerts a negative impact on hippocampal-dependent cognitive function
Society for Neuroscience 2021, November 11～12, 2021 (Web presentation)
- 7) 田之頭大輔、王蔚、丸山めぐみ、黒岩智恵美、齊藤貴志、西道隆臣、田口明子. 脳 IRS1 修飾変化を介する認知機能障害の発症・進行機構の解明
Elucidation of the mechanism of onset and progression of cognitive dysfunction mediated by alterations in neural IRS1 modification
第 44 回日本分子生物学会年会 2021 年 12 月 2 日 横浜市 (Web 発表)
- 8) Akiko Taguchi, Ryuhei Tsuji, Wei Wang, Daisuke Tanokashira, Megumi Maruyama, Chiemi Kuroiwa. Effects of glial insulin signaling deletion on cognitive functions
第 99 回日本生理学会大会 2022 年 3 月 17 日 仙台市 (Web 発表)
- 9) 辻竜平、田之頭大輔、王蔚、丸山めぐみ、黒岩智恵美、齊藤貴志、西道隆臣、田口明子. 2 型糖尿病が脳インスリンシグナルとアルツハイマー病態に与える影響
2022 年日本農芸化学会 2022 年 3 月 18 日 (Web 開催)
2022 年度
- 1) 田口明子. 代謝障害から見た認知機能障害発症・進展の分子機構
第 22 回日本抗加齢医学会総会 シンポジウム
2022 年 6 月 17 日 大阪国際会議場, 大阪市、日本
- 2) 田口明子. 糖代謝異常に関連する認知症の発症に関わる分子メカニズム
第 41 回日本認知症学会学術集会・第 37 回日本老年精神医学会 [合同開催]
シンポジウム
2022 年 11 月 25 日 東京国際フォーラム、東京、日本
- 3) 王蔚、辻竜平、田之頭大輔、丸山めぐみ、黒岩智恵美、田口明子.
グリアインスリンシグナルの欠損による栄養代謝と認知機能の変化
第 64 回日本老年医学会学術集会 優秀演題賞候補セッション
2022 年 6 月 2 日 大阪国際会議場, 大阪市、日本

- 4) 田之頭大輔、王蔚、小川敦子、中村美沙希、Morris White、田口明子.
IRS2 の機能欠損が成体の海馬依存的認知機能に与える影響
第 37 回日本糖尿病合併症学会・第 28 回日本糖尿病眼学会総会
2022 年 10 月 22 日 国立京都国際会館ならびに LIVE 配信、京都、日本
- 5) 酒井和哉、王蔚、田之頭大輔、山口真広、小川敦子、中村美沙希、Morris White、田口明子.
認知機能および栄養エネルギー代謝調節におけるグリアインスリンシグナルの機能
第 36 回日本糖尿病・肥満動物学会
2023 年 2 月 18 日 一橋大学一橋講堂、東京、日本

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2021 年度

なし

2022 年度

なし

2. 実用新案登録

2021 年度

なし

2022 年度

なし

3. その他

2021 年度

なし

2022 年度

なし