

長寿医療研究開発費 2023年度 総括研究報告

課題名 認知機能調節における栄養エネルギー代謝とその調節経路の
作用についての解明 (23-2)

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

中年期の2型糖尿病 (Type2 diabetes mellitus:T2DM) や高齢期の低栄養に伴う体重減少は、認知症の危険要因であることが明らかになっている。両者は栄養エネルギー代謝障害であるため、主要な栄養エネルギー代謝調節経路であるインスリンシグナルの関与が示唆される。申請者らの疾患モデルを用いたこれまでの研究から、中年期の T2DM に伴う空間認知機能の低下、アルツハイマー (AD) における認知機能障害、2型糖尿病を誘導した AD で見られる認知機能低下の相加的な悪化、空間認知機能障害を示すグリア細胞のインスリンシグナルの低下において、これらに見られる共通の変容として、1)アミロイドβ (Aβ) 値の無変化、2)耐糖能変化、3) 脳インスリンシグナル活性変動、4)ミトコンドリア関連分子発現の変容、5)脳エネルギー代謝関連因子の変化が観察されていた。興味深いことに、AD 患者死後脳でも前脳、海馬で脳インスリンシグナル活性変動、ミトコンドリア関連分子発現の変容、脳エネルギー代謝関連因子の変化が生じていることが分かった。一方、高齢期の低栄養・体重減少モデルとして新規作製した低タンパク質食 (LPD)付加加齢モデルでは、サルコペニア様の病態、有意な筋力低下、肝臓の糖新生変容、視床下部の摂食およびエネルギー代謝調節関連神経ペプチドの発現変化が見られ、海馬におけるインスリンシグナル活性変動と神経活動マーカー変化を伴う認知機能低下が惹起されていることが明らかとなった。本研究から、Aβ変化の有無あるいは耐糖能変化の有無に関わらず疾患モデル・AD 患者死後脳で共通に観察されたこれらの変容は、認知機能障害を誘導する根本的な分子機構の一端であることが示唆された。

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

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)

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)

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)

A. 研究目的

栄養エネルギー代謝障害である中年期の2型糖尿病や高齢期の低栄養に伴う体重減少は、認知症の危険要因であると考えられる。そのため、栄養エネルギー代謝調節経路インスリンシグナルの認知機能調節機序への関与が示唆される。これまでに申請者らは、インスリンシグナルの主要調節分子であるインスリン受容体基質1 (IRS1) のアストロサイトでの欠損により誘導されるアミロイド β ($A\beta$) 非関与で耐糖能異常を伴う認知機能障害と、高脂肪食により2型糖尿病を誘導した次世代型アルツハイマー (AD) モデルで見られる $A\beta$ に関連した認知機能障害には、共通の変容として、①脳インスリンシグナル活性化低下、②ミトコンドリア関連分子発現の変化、③脳エネルギー代謝関連因子の変化が生じていることを明らかにしている。さらに、類似の変化は、AD患者死後脳でも観察されることが予備解析から明らかとなっており、また、新規に作製した高齢期の低栄養・体重減少モデルを用いた予備解析からは、筋力の低下と多動性を呈することに加え、①脳インスリンシグナル活性化の低下が観察された。本研究では、神経原繊維変化の異なる段階のAD患者死後脳と高齢期の低栄養・体重減少モデル脳を用いた解析から、 $A\beta$ の有無に関わらず誘導される認知機能障害モデルで共通に観察される3項目の変化について検討し、これらの変容が、認知機能障害の根本的な発症機構の一端である可能性について明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1. AD患者死後脳を用いた解析

1) 異なるNFT段階の検体を用いた解析：

これまで解析を行った異なるNFT段階では、高度な変性のため、検体の状態に問題がある場合もあり、特に、海馬の検体量が複数の解析を行うには十分では無かった。追加の解析を行うために依頼した海馬の検体を用い、ミトコンドリアおよび脳エネルギー代謝関連因子について詳細な解析を行った。

2) 脳IRS1/2関連分子の探索：

脳IRS1/2の低下に関連する未知の経路を探索するため、研究費と検体量に余裕がある場合は、AD死後脳海馬を用いたRNA-seq解析を行い、変化のある分子については動物モデルで詳細に検討した。

3) 検体の選定、検体の抽出、切り出しおよび組織切片の作成、検体の送付：

AD患者死後脳において、NFTの異なる段階、糖尿病や高血圧などの合併症の有無、その他臨床情報を含め、本研究課題の解析に使用する検体の選定、検体の抽出、切り出しおよび組織切片の作成、検体の送付は、新潟大学脳研で行われた。

2. 低タンパク質食付加高齢野生型 (LPD-agedWT) マウスの解析

1) LPD食付加マウスの追加作製および栄養エネルギー代謝の解析：

3%LPD食を1.5年前後の加齢野生型マウスへ付加し、LPD-agedWTマウスを追加作製し、代謝パラメーター（体重、血糖値、摂食量、血中インスリン値等）を測定した。LPD-aged WTマウスの体重は25gを基準で解析に使用した（1.5年前後の普通食WTマウスの平均体重は35g前後）。

2) 行動解析：

当該マウスの認知機能変化を引き続き解析するため、多種の行動テストバッテリーによる解析（オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、T字水迷路試験、受動回避試験等）を行った。

3) インスリンシグナル関連分子、ミトコンドリア関連分子、脳のエネルギー代謝関連分子の変化についての解析：

中枢神経および末梢組織（インスリン標的組織：筋肉、肝臓等）のインスリンシグナル関連分子変化、脳におけるミトコンドリアおよびエネルギー代謝関連分子について分子生物学・生化学的および組織学的手法を用いて解析を行った。

4) 神経炎症と既知の認知症マーカーについての解析：

神経炎症と既知の認知症関連因子（ $A\beta$, Tau等）について、各種特異的マーカーを用いた分子生物学・生化学的および組織学的手法を用いて解析した。

（倫理面への配慮）

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、遺伝子組換え実験管理細則、および倫理・利益相反規定に準ずる。国立長寿医療研究センター遺伝子組換え実験計画書、国立長寿医療研究センター動物実験計画書、および国立長寿医療研究センター倫理・利益相反研究計画書は承認済みである（遺伝子組換え実験安全管理委員会、承認 ID：遺 2-32-R5；動物実験倫理委員会、承認 ID：動 4-8-R3；倫理・利益相反委員会、承認 ID：#940-5）。動物実験は、同センター内の動物実験倫理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い、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。動物実験での使用個体数は綿密に実験計画を立てた後、必要最小限にとどめ、実験終了後はすみやかに麻酔により安楽死させる。

C. 研究結果

1. AD患者死後脳を用いた解析

インスリンシグナルの主要調節因子であるインスリン受容体基質1（Insulin Receptor Substrate1:IRS1）のセリンリン酸化は、本シグナル活性化低下の指標の1つとして考えられている。AD患者死後脳で、IRS1のセリンリン酸化の亢進が発見されたことから、AD脳の

病態ではインスリンシグナルの細胞内シグナルの活性低下が生じている可能性が考えられる。病態進行段階の異なる AD 患者死後脳検体(新潟大学脳研より分与)を用いた解析から、前脳においては、IRS1 とファミリー分子には異なった発現変動が見られるが、これらの下流で働く神経原線維変化を示すタウ、ストレス関連キナーゼである Jun amino terminal kinase (JNK)、アポトーシス促進性タンパク質である BCL2 associated agonist of cell death (BAD)、および糖代謝関連分子でもある Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β)のそれぞれの定常状態におけるリン酸化レベルに変化が観察された他、温度依存的なイオンチャネルで認知機能低下との関与が示されている TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2)、ミトコンドリア関連分子 Transcription Factor A (TFAM)、および糖輸送タンパク質に有意な発現変動が生じていることが判った。一方で、今回新たに検定され送付されてきた海馬の IRS1 とファミリー分子は前脳同様の発現変化が見られたが、IRS1 および TFAM は、前脳や海馬 IRS2 とは異なる発現変化が生じており、糖輸送タンパク質については、前脳とは反対の発現変動が観察された。

2. 低タンパク質食付加老齢野生型 (LPD-agedWT) マウスの解析

タンパク質摂取不足モデルとして、3%あるいは 5%低タンパク質食 (Low Protein Diet:LPD) を 8 週齢以降および 1.5 年齢前後の野生型 (B6J) マウスに 1 年以上あるいは 3 ヶ月前後投与して、LPD-aged (wild type: WT) マウスを作製したが、主な解析は、表現型が鮮明に見られた 3%LPD を 1 年以上投与した LPD-agedWT マウスを用いて行った。LPD-agedWT マウスでは、顕著な体重減少と血糖値低下と共に、随時および絶食時における有意な深部体温低下が見られた。この時、肝臓の糖新生マーカーである G6pase, Pepck の発現減少と Glukokainase の有意な発現変化が観察された。さらに、視床下部弓状核で発現する摂食促進神経ペプチドであるニューロペプチド Y (NPY)・アグーチ関連ペプチド (AgRP) の有意な発現増加と摂食抑制神経ペプチドであるプロオピオメラノコルチン (POMC) の発現低下が見られた。認知機能変化について検討するため 64 週齢以降の LPD-agedWT マウスの行動解析を行った。Passive avoidance test による短期記憶および Elevated plus maze test による不安様行動に変化は見られなかったが、Open field test による自発活動性では顕著な活動性低下が認められた。さらに、海馬におけるインスリンシグナルの活性変化と神経活動マーカー (c-fos, ARC) の有意な低下を伴い Y maze test による空間作業記憶の低下が観察された。また、Grip test による解析から、当該モデルの筋力は有意に低下していることが判った。これまでの解析から、LPD-aged WT マウスは、サルコペニア様の変化を示すと共に認知的フレイルを呈することが明らかとなった。

D. 考察と結論

1. AD患者死後脳を用いた解析

AD 患者死後脳の異なる脳領域（前脳・海馬）における解析から、インスリンシグナル構成分子の一部および脳の栄養エネルギー代謝関連分子群は、領域によって異なる変化が生じていることが明らかとなったが、一方で、TFAM と IRS2 が領域共通の発現変動を示したことから、これらの分子は普遍的に AD 病態に関与する可能性が示された。これら同様の変化は、AD 動物モデルでも共通して観察されることから、インスリンシグナル分子、糖およびモノカルボン酸トランスポータ輸送タンパク質を介した脳の栄養エネルギー代謝経路は、認知症発症に関連する重要な分子機序の一端である可能性が考えられる (Tanokashira D et al. 論文投稿準備中)。

2. 低タンパク質食付加高齢野生型 (LPD-agedWT) マウスの解析

今回の解析から、低タンパク質の割合は表現型へ与える重要な要因となることが分かった。特に、行動解析の結果については、3%LPD の長期投与で有意な変化が観察されたことから、タンパク質の摂取不足による影響はある程度までは、他の栄養代謝によって補償されている可能性が考えられる。実際に、LPD の短期投与マウスでは脂質・糖代謝異常が誘導されることが報告されている。追加実験データを加えた結果を最終版として論文投稿準備を行なっている (Tsuji R et al.)。一方、3%LPD が AD の病態に与える影響について検討を行ったが、3ヶ月の投与は、AD モデルの表現型に影響を与えないことが分かった。当施設の飼育環境下において、使用している次世代型 AD モデルの認知機能変化が観察されるまで7ヶ月以上を必要とする事を考慮すると、LPD 投与3ヶ月では不十分だった可能性も考えられる。しかしながら、高脂肪食を付加した AD モデルでは、若齢期と中年期以降で見られる変化が異なる事もさらに考慮すると (Wang et al. Neuropsychopharmacol. 2022; Tanokashira et al. 論文投稿準備中)、LPD の投与時期と期間についても検討の余地があるとも見られるが、LPD の投与については体重減少が問題となる事から、LPD の割合、投与時期、投与期間などの最適な条件設定には予想以上に労力と時間が必要となると考えられる。そのため、別方向からの観察として、培養系を用いた解析についても検討したい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Taguchi A. Brain insulin signaling and metabolic disorder and cognitive dysfunction

2. 学会発表

- 1) 酒井和哉、王蔚、田之頭大輔、辻竜平、山口真広、小川敦子、中村美沙希、Morris F White、田口明子. グリア細胞のインスリンシグナルを標的とした認知機能障害およびエネルギー代謝異常発症機構の解明
第31回日本医学会総会 6NC リトリートポスターセッション、2023年4月22日、東京、日本
- 2) Taguchi A, Sakai K, Tsuji R, Wang W, Nakamura M, Ogawa A, White MF. Involvement of astrocytic insulin signaling in the regulation of memory functions. IAGG Asia/Oceania Regional Congress 2023, June 12, 2023, Yokohama, Japan.
- 3) 酒井和哉、王蔚、辻竜平、田之頭大輔、中村美沙希、小川敦子、Morris White、田口明子. アストロサイト IRS1 による脳内乳酸経路を介した認知機能および体系的糖代謝調節機構. 第65回日本老年医学会学術集会、2023年6月16日、横浜市
- 4) 辻竜平、田之頭大輔、王蔚、酒井和哉、中村美沙希、小川敦子、斎藤貴志、西道隆臣、田口明子. 2型糖尿病はアミロイド β とは独立に海馬の糖代謝経路変化を伴い認知機能を悪化させる. 第65回日本老年医学会学術集会、2023年6月16日、横浜市
- 5) 酒井和哉、王蔚、辻竜平、田之頭大輔、中村美沙希、小川敦子、Morris White、田口明子. 認知機能および糖代謝調節におけるアストロサイトインスリンシグナルの役割. 第29回海馬と高次脳機能学会、2023年9月30日、東京大学薬学部、東京、日本
- 6) 酒井和哉、王蔚、辻竜平、田之頭大輔、中村美沙希、小川敦子、Morris White、田口明子. 認知機能および体系的糖代謝調節機構における成体脳グリアインスリンシグナルの役割. 第17回神経発生討論会・第20回成体脳のニューロン新生懇談会 合同大会 2024年3月8日、名古屋市立大学 桜山キャンパス、名古屋、日本
- 7) 酒井和哉、王蔚、辻竜平、田之頭大輔、中村美沙希、小川敦子、Morris White、田口明子. 脳内乳酸経路を介した認知機能および糖代謝調節機構へのグリアインスリンシグナルの関与. 第37回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会 2024年3月15日、弘前大学創立50周年記念会館、弘前、日本
- 8) 田口明子. 栄養代謝とその調節シグナルの変化と認知機能障害. 第101回日本生理学会大会 2024年3月30日、北九州国際会議場 及び西日本総合展示場、北九州、日本

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

講演：

1) 田口明子. 栄養と脳

東京農業大学大学院応用生物科学研究科 2023年12月21日、東京、日本

2) 田口明子. 認知症未病マーカー探索に資する食バランスと脳機能評価システムの重要性

日本学術振興会 R021 食と未病マーカー産学協力委員会 第17回定例研究会
2024年2月8日、東京大学 中島董一郎記念ホール、東京、日本