



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1938号
学位記番号	第1368号
氏名	周 春雨
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Insulin Deficiency Increases Sirt2 Level in Streptozotocin-Treated Alzheimer's Disease-Like Mouse Model: Increased Sirt2 Induces Tau Phosphorylation Through ERK Activation (ストレプトゾトシン投与によるインスリン欠乏はアルツハイマー病モデルマウス脳内の Sirt2 発現を増加させる。Sirt2 の増加は ERK の活性化を介してタウのリン酸化を誘導する)</p> <p>Molecular Neurobiology, 59 (9):5408-5425, 2022</p>
論文審査担当者	<p>主査： 松川 則之 副査： 斎藤 貴志, 澤本 和延</p>

論文内容の要旨

[目的]

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease ; AD) は認知機能が障害される神経変性疾患である。AD の病理学的特徴として、アミロイド β ($A\beta$) からなる老人斑、過剰リン酸化タウタンパク質からなる神経原繊維変化、脳内炎症や神経細胞脱落がある。糖尿病は AD の危険因子であり、AD 患者の脳内におけるインスリン量の低下及びインスリンシグナル障害が報告されている。インスリンシグナル障害は AD の病態を増悪させるが、その分子機構は完全に解明されていない。本研究はインスリン欠乏による AD 病態促進の制御分子を同定し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

[方法]

In vivo 実験 : 3 ヶ月齢の AD モデルマウス (Tg2576) を用いて、膵臓の β 細胞を破壊する試薬であるストレプトゾトシン (STZ) を 5 日間腹腔内投与し、インスリン欠乏型 AD モデルマウスを作製した。STZ 投与後、4 週間毎にマウスの体重と血清グルコース濃度を、16 週間後に血清インスリン濃度を測定した。マウス脳内のインスリン受容体 (IR) などのタンパク質発現をウェスタンブロット (W.B.) で、 $A\beta$ 沈着量を免疫組織染色で、可溶性・不溶性 $A\beta$ 量を ELISA 法によって評価した。炎症性サイトカインであるインターロイキン-6 (IL-6) と腫瘍壊死因子- α (TNF- α) の mRNA レベルを定量的 RT-PCR によって評価した。STZ 投与によるマウス脳内で変動する分子を二次元電気泳動-質量分析法によって解析した。免疫組織染色を用いて Sirtuin 2 (Sirt2) の局在を評価した。

In vitro 実験 : タウタンパク質の P301L 変異がある Neuro2a-P301L 細胞及び Neuro2a 細胞を用いて、インスリン欠乏または IL-6 処理による Sirt2 のタンパク質発現を W.B.によって評価した。また、これらの細胞に Sirt2 を過剰発現またはノックダウンさせ、タウタンパク質のリン酸化レベル、リン酸化酵素及び脱リン酸化酵素のタンパク質レベルを W.B.によって評価した。

[結果]

In vivo 実験 : 対照群に比べ STZ 投与群では、1) 体重の減少、血清グルコース濃度の上昇、血清インスリン濃度及び脳内 IR 活性の低下、2) 大脳皮質及び海馬における $A\beta$ 沈着量、可溶性・不溶性 $A\beta$ 量の有意な増加、3) $A\beta$ の産生に関与するタンパク質 (APP, ADAM10, BACE1, PS1) 及び $A\beta$ の分解・除去に関与するタンパク質 (ApoE, Nephrilysin) の発現量には差が見られなかったが、 $A\beta$ の分解酵素であるインスリン分解酵素 (IDE) の発現量の有意な低下、4) タウタンパク質のリン酸化レベル及びリン酸化酵素である細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) 活性化の有意な増加、5) アストロサイト及びミクログリアの活性化、IL-6 と TNF- α の mRNA レベルの上昇が見られた。さらに、インスリン欠乏によって変動する分子を二次元電気泳動-質量分析法で解析した結果、STZ 投与群の脳内においてヒストン脱アセチル化酵素である Sirt2 の発現量が増加していることを見出した。また、Sirt2 は NeuN 陽性細胞と共局在化したが、GFAP 陽性細胞とは共局在化しなかった。

In vitro 実験 : Neuro2a-P301L 細胞及び Neuro2a 細胞におけるインスリン欠乏処理は Sirt2 のタンパク質レベルを増加させ、IL-6 処理は Sirt2 のタンパク質レベル、タウタンパク質のリン酸化及び ERK の活性化レベルを増加させた。Sirt2 を過剰発現させた細胞では、タウタンパク質のリン酸化

及び ERK の活性化レベルが増加した一方、Sirt2 をノックダウンさせた細胞では、タウタンパク質のリン酸化及び ERK の活性化レベルが低下した。さらに、ERK 阻害剤処理は Sirt2 過剰発現によって引き起こされたタウタンパク質のリン酸化を抑制した。

[考察]

本研究では、STZ 投与によるインスリン欠乏型 AD マウスを解析したところ、インスリン欠乏は A β レベルの増加、タウタンパク質のリン酸化の亢進及び神経炎症の増加など AD 病態を悪化させることを見出した。A β レベルが増加するメカニズムとして、A β 分解酵素である IDE の発現量の低下が関与すると考えられる。IDE の発現はインスリンによって制御されるため、STZ 投与によるインスリン量の減少が IDE 発現を低下させた可能性があると考えられる。タウタンパク質のリン酸化レベルはリン酸化酵素と脱リン酸化酵素のバランスによって制御されるため、STZ 投与はリン酸化酵素 ERK を活性化させることでタウタンパク質のリン酸化を増加させたと考えられる。Sirt2 は AD やパーキンソン病患者脳内に高く発現しており、神経変性疾患の発症に関与する。*In vitro* 実験で、インスリン欠乏または IL-6 処理が Sirt2 の発現を増加させたことから、マウス脳におけるインスリン欠乏と神経炎症が Sirt2 の発現を促進する可能性が示唆された。Sirt2 の発現量が ERK の活性化及びタウタンパク質のリン酸化に影響を与えたこと、ERK 阻害剤が Sirt2 過剰発現によるタウタンパク質のリン酸化を抑制したことから、Sirt2 は ERK の活性化を介してタウタンパク質のリン酸化を制御すると示唆された。本研究では、インスリン欠乏による AD 病態の増悪機構に新たな分子 Sirt2 が関与していることを見出した。したがって、Sirt2 が AD の有望な治療ターゲットであることが示唆された。

論文審査結果

【背景と目的】：記憶障害を主体としたアルツハイマー病（Alzheimer's disease ; AD）の病理的特徴は、アミロイドβ（Aβ）からなる老人斑と過剰リン酸化タウ蛋白質からなる神経原繊維変化である。AD 病態増悪因子には糖尿病に関連する脳内インスリン量の低下及びインスリンシグナル障害が報告されている。しかし、インスリンシグナル障害を介した糖尿病病態による Aβ からタウの異常リン酸化促進分子メカニズムの詳細は不明な点が多い。本研究では、アミロイドβ 遺伝子モデル Tg2576 マウスによるストレプトゾトシン（STZ）糖尿病モデルマウスを用いて、Aβ 産生、インスリン分解、および炎症性サイトカイン活性の観点から Aβ蓄積への影響、また AD 病態促進の制御分子の同定とタウ蛋白質リン酸化制御における分子機構を検討した。

【方法】：3ヶ月齢 Tg2576 に STZ の 5 日間腹腔内投与により膵臓β細胞破壊を行い、インスリン欠乏型 AD モデルマウスを作製した。Aβ沈着について免疫組織染色および ELISA 法にて評価した。定量的 RT-PCR によりインターロイキン-6（IL-6）と腫瘍壊死因子-α（TNF-α）発現を評価した。次に、二次元電気泳動—質量分析法（LC-MS/MS）により脳内変動した病態関連候補因子のうち、Sirtuin 2（Sirt2）の神経細胞局在を確認した。次に P301L 変異型タウタンパク質導入 Neuro2a-P301L 細胞及び Neuro2a 細胞を用いて、インスリン欠乏または IL-6 処理による Sirt2 のタンパク質量発現を評価した。また、Neuro2a-P301L 細胞の Sirt2 を過剰発現またはノックダウンさせ、タウタンパク質のリン酸化パターン、リン酸化酵素及び脱リン酸化酵素量変化を評価した。

【結果】対照群に比較し STZ 投与群では、1）体重の減少、血清グルコース濃度の上昇、血清インスリン濃度及び脳内 IR 量の低下、2）大脳皮質及び海馬における Aβ沈着量、可溶性・不溶性 Aβ量の有意な増加が確認されたが、3）Aβの産生に関与するタンパク質（APP、ADAM10、BACE1、PS1）及び Aβの分解・除去に関与するタンパク質（ApoE、Neprilysin）量には有意な変化はなかった。また、4）Aβ分解酵素であるインスリン分解酵素（IDE）量の有意な低下、5）タウタンパク質のリン酸化レベル及びリン酸化酵素である ERK のリン酸化の有意な増加、6）アストロサイト及びミクログリアの活性化、IL-6 と TNF-α の mRNA レベル上昇が認められた。さらに、LC-MS/MS 検討では、STZ 投与群脳内ではヒストン脱アセチル化酵素 Sirt2 量が増加していた。また、Sirt2 は NeuN 陽性細胞と共局在化し、GFAP 陽性細胞とは共局在化しなかった。病態細胞実験では、Sirt2 量はインスリン欠乏処理により増加し、IL-6 処理により Sirt2 量の増加と共に ERK リン酸化とタウタンパク質のリン酸化を増加した。最後に Neuro2a-P301L 細胞内 Sirt2 を過剰発現は、タウタンパク質のリン酸化及び ERK リン酸化を増加させた一方、Sirt2 ノックダウンは、その両者を低下させた。さらに、ERK 阻害剤処理は Sirt2 過剰発現によって引き起こされたタウタンパク質のリン酸化を抑制した。

【考察】STZ を用いたインスリン欠乏型 Tg2576 マウス脳内では、Aβレベルの増加、タウタンパク質のリン酸化の亢進、及び神経炎症の増加など AD 病態の悪化が確認された。また、本病態モデルマウスにおける新たな病態関連因子の一つとして Sirt2 が候補因子となった。In vivo および In vitro 実験の結果から、インスリン欠乏または IL-6 を介した炎症により脳内 Sirt2 発現が惹起され、その結果 Sirt2 が ERK の活性化を介してタウタンパク質のリン酸化を制御・促進する可能性が示唆された。したがって、これらの結果は、Sirt2 が AD の新たな治療標的である可能性を示唆した。

【学位審査】申請者による約 20 分のプレゼンテーション後に、主査松川からアルツハイマー病の臨床症状の特徴と創薬の現状、Tg2576 マウスの特徴など合計 6 つの質問、第一副査齋藤教授からは、NEP 評価は蛋白量ではなく酵素活性評価が必要ではないか、二次元電気泳動の結果から Sirt2 に着目した理由など合計 7 つの質問、第二副査澤本教授からは、STZ が膵臓β細胞に毒性を与えるメカニズムは何か、STZ 濃度により 1 型もしくは 2 型糖尿病マウスモデルを作成できる原理など合計 7 つの質問がなされた。これらの質問に対して申請者は、概ね適切に回答し、研究内容ならびにその背景等を十分に理解していると判断した。

本研究は病態モデルマウスを用いて、臨床的に明らかにされてきた糖尿病病態とアルツハイマー病病態との関係性を分子メカニズムの視点から明らかにし、新たな治療標的を創出しようとする今後の展開が期待できるものである。よって、申請者は博士（医学）を授与されるにふさわしい知識と研究能力を有すると審査委員会は結論した。