

コレステロール低下に伴う 神経細胞内インスリンシグナルの低下

福井 健司

大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科、総合地域医療学寄附講座

要 旨

糖尿病モデルマウスの中樞神経ではコレステロールの合成が低下し、神経細胞機能が障害される(1)。この時の神経細胞機能変化を検討するため、マウス視床下部系培養細胞からコレステロールを減少させた際の細胞機能の変化を、インスリンシグナルの変化を中心に検討した。コレステロールの減少した神経細胞内ではインスリンをはじめとする成長因子のシグナル伝達が低下していた。またアミロイド β によるアポトーシスの亢進や、オートファジー機能の障害が見られた(2)。

内 容

(背景と目的)

糖尿病患者においては認知機能障害、アルツハイマー病の発症リスクが高いことが知られているが、そのメカニズムは明らかでない(3,4,5)。糖尿病モデルマウスの中樞神経ではコレステロール合成が低下し、シナプトソームのコレステロール含量が減少することが報告されている。このような神経細胞内のコレステロールの減少が神経細胞機能に与える影響について、インスリンシグナル伝達の変化を中心に検討を行い、さらに細胞内コレステロールの減少がアルツハイマー病発症に影響を与える可能性についても、あわせて検討を行った。

(方法)

細胞内コレステロールの削減は、コレステロールキレート作用のあるmethyl-beta-cyclodextrin(MBCD)、もしくはコレステロール合成経路を抑制するHMGCoA還元酵素(HMGR)阻害剤(simvastatinを使用)の細胞培養培地中への添加、またコレステロール合成経路活性化の上流にあるSREBP2遺伝子のshRNAベクターによるノックダウン、以上の3つの方法をもちいた。

インスリンシグナルの検討は、コレステロールの減少した細胞にインスリン添加バッファーを負荷し10分～30分後に細胞を回収。蛋白抽出をウェスタンブロッティングすることによりインスリンシグナル因子の活性化を検討した。インスリン、及びIGF-1についてはIRS-1、AKT、ERK1/2のリン酸化抗体を、またNGF、BDNFについてはAKT、ERK1/2のリン酸化抗体を用いた。

コレステロール減少に伴うインスリンシグナル伝達の変化における MAPK 経路活性化の詳細な検討のため、その構成要素である Ras については疎水性を付加される prenyl 化、raf と結合する活性化 Ras について検討し、また MEK についてはそのリン酸化抗体を用いたウェスタンブロットングを用いて活性化を評価した。さらに細胞機能評価のため、アポトーシスについては AnnexinV を用いた検討を、またオートファジーについては LC3-II、p62、ULK-1 などの関連因子の発現の検討を行った。

(結果と考察)

コレステロールの減少に伴いインスリンシグナル伝達は低下する。

MBCD、HMGR 阻害剤、SREBP2 ノックダウン、いずれの方法においても、細胞内コレステロール量は 20~30% の低下を認め、これは糖尿病モデルマウス中枢神経のシナプトソームにおけるコレステロール減少と同程度であった。

このときインスリン刺激後の IRS-1 活性化、AKT 活性化は低下した。ERK1/2 活性化は、MBCD および HMGR 阻害剤処理においては、IRS-1 や AKT と同様低下していたが、SREBP2 ノックダウンにおいてのみ上昇を認めた。

コレステロール減少は IGF-1、NGF、BDNF シグナル伝達も抑制する。

インスリンレセプターに対する交差活性を有し、インスリンシグナル活性化をもたらす IGF-1 を用いて、上記の 3 方法でコレステロールを低減した細胞を刺激したところ、インスリン刺激と同様に IRS-1、AKT、ERK1/2 活性化は全体に減弱を認めたが、SREBP2 ノックダウンにおける ERK1/2 活性化のみ増強を認めた。神経成長作用を持つ NGF、BDNF はそれぞれシグナル伝達経路ののちに AKT、ERK を活性化するが、これらによる刺激においても同様に、SREBP2 ノックダウンにおける ERK1/2 活性化を除き、細胞内コレステロールの減少によりシグナル経路の活性化は減弱を認めた。

SREBP2 ノックダウンは ERK1/2 活性化を増大させる。

上述のように、細胞内コレステロールの削減によりインスリンシグナル経路の活性化は抑制されたが、SREBP2 発現抑制時における ERK1/2 活性化のみ、コレステロール低減時に増加していた。このメカニズム解明のため、ERK1/2 活性化にいたる MAPK 経路についてさらに詳しく検討を行った。

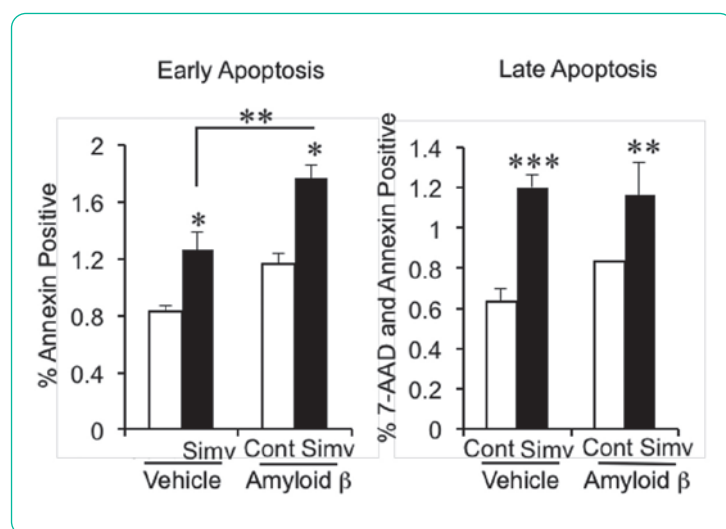
MAPK経路を構成する、Rasは、インスリンにより疎水性をもつprenyl基を付加され、細胞膜に移行しシグナル伝達に寄与する。Rasの発現量はコレステロール減少にともなう変化はなかったが、コレステロール削減方法にかかわらず、prenyl化を受け細胞膜上に局在するRasは低下し、またインスリン刺激後の活性化Ras自体も減少していた。またErk1/2活性化反応を直接媒介する活性化Mekも同様に、コレステロール減少に伴い、その削減方法にかかわらず低下していた。

これらの結果より、細胞内コレステロールの減少にともない、インスリンIGF-1および、NGF、BDNFなどの神経成長因子のシグナル伝達は抑制を受けるが、SREBP2発現低下により、活性型Erk1/2を脱リン酸化する機構が障害されている可能性が考えられた。

コレステロールの減少した神経細胞において Amyloid β による apoptosis は亢進する。

次にコレステロール減少に伴う成長因子シグナルの低下が神経細胞の生存能力に与える影響について、とくに神経変性疾患であるアルツハイマー病における神経細胞死への関与についての検討を行った。

アルツハイマーによる中枢神経細胞障害は、アミロイド β の蓄積やそれにとともなう細胞死が原因と考えられている(6)。そこで培養液中にアミロイド β を添加し、AnnexinVおよび7-Amino-Actinomycin Dをもちいてアポトーシスを評価した。その結果、コレステロールを減少させたGT1-7細胞においては通常培養時のアポトーシスに増加傾向を認め、アミロイド β 添加後のアポトーシスは有意に増加していた。また血清非添加培養における活性型カスパーゼ3発現、すなわちアポトーシス誘導も、コレステロールの減少したGT1-7細胞において上昇していた。これらの結果より、コレステロールの減少に伴い、神経細胞のストレス下での生存能力は低下し、アミロイド β による細胞障害も受けやすいことが示唆された。

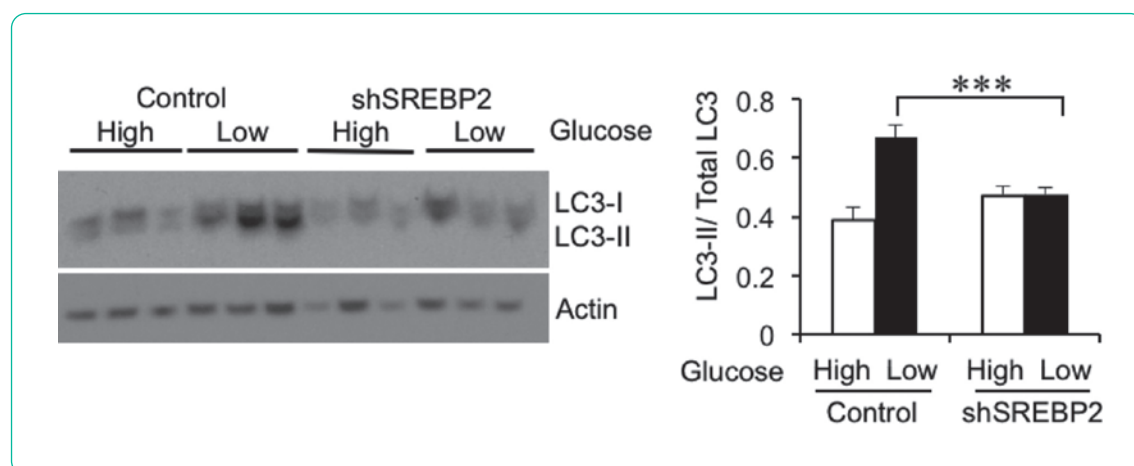


(図1) コレステロールの減少したGT1-7細胞(simv: simvastatin添加)では、アポトーシス状態の亢進(負荷前のAnnexin、7-AADの上昇)を認め、amyloid β 負荷による早期アポトーシス誘導(Annexinの上昇)が上昇していた。

神経細胞のコレステロール減少にともないautophagy機能は障害される。

オートファジーは細胞の飢餓状態におけるエネルギー確保のメカニズムとして発見され、また不要な物質や異常蛋白の分解・代謝をおこなう働きも持つことが報告されている(7)。アルツハイマー病への関与についても、オートファジーはアルツハイマー病発症の原因物質の一つであるアミロイド β のクリアランスに関わり、オートファジー機能の障害によりアミロイド β が蓄積することが報告されている(8)。コレステロール減少にともなうオートファジー機能の変化についても検討をおこなった。

GT1-7細胞を低グルコース濃度で培養すると、オートファゴソームの形成成分であるLC3-II蛋白の増加を認めるが、コレステロールの減少したGT1-7細胞において、LC3-II蛋白は、通常培養状態で増加傾向を示しながらも、低グルコース状態における発現量増加が見られなかった。オートファジー機構の開始を制御するULK-1、ユビキチン化された蛋白をオートファゴソームに誘導するp62蛋白も、通常状態における奇異的な増加、低栄養時の発現増加の抑制などの傾向が見られた。これらの結果、神経細胞内コレステロール低下にともない、オートファジー機能は障害され、低栄養時のエネルギー確保および不要物質のクリアランスが障害されている可能性が示された。



(図2) コレステロールの低下したGT1-7細胞細胞(shSREBP2: SREBP2ノックダウン)では、平常時(High: 高グルコース濃度)から低栄養(Low: 低グルコース濃度)にしたときのオートファゴソーム形成(LC3-II: 下のバンドの比率の増加)が障害されている。

まとめ

本研究において、糖尿病モデル動物に見られる中枢神経細胞内コレステロールの低下はインスリンシグナル伝達を障害し、細胞のストレス反応の脆弱化や、細胞内の代謝障害および不要蛋白の蓄積を惹起することが細胞実験において示された。近年アルツハイマー病発症における中枢神経でのインスリン抵抗性の関与が報告されており(9,10)、糖尿病患者の中枢神経細胞にいても本研究の細胞実験結果と同様に、インスリンシグナル伝達の低下によるオートファジー機能障害やアミロイド β などの異常蓄積が、神経細胞障害に寄与している可能性が考えられる。

結果

中枢神経細胞内コレステロールのインスリンシグナル伝達機能における役割について検討した。細胞内コレステロールの減少に伴い、インスリンシグナル伝達は障害され、細胞増殖能、生存能、エネルギー代謝調節などの細胞機能低下を生じた。これらの機能低下は糖尿病患者におけるアルツハイマー病などの中枢神経疾患のリスク増大に関与する可能性が考えられる。

引用文献

1. Suzuki R. et al. (2010) Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab* 12, 567-579
2. Fukui K, et al. (2015) Effect of Cholesterol Reduction on Receptor Signaling in Neurons. *J Biol Chem*. 2015 Sep 14. [Epub ahead of print]
3. Biessels G. J. et al. (2008) Cognition and diabetes: a lifespan perspective. *Lancet Neurol* 7, 184-190
4. Cukierman T. et al. (2005) Cognitive decline and dementia in diabetes--systematic overview of prospective observational studies. *Diabetologia* 48, 2460-2469
5. Craft S., and Watson G. S. (2004) Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol* 3, 169-178
6. Selkoe D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766
7. Mizushima N., and Komatsu M. (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728-741
8. Tung Y. T. et al. (2012) Autophagy: a double-edged sword in Alzheimer's disease. *Journal of biosciences* 37, 157-165
9. Talbot K. et al. (2012) Demonstrated brain insulin resistance in Alzheimer's disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J.Clin.Invest* 122, 1316-1338
10. Bomfim T. R. et al. (2012) An anti-diabetes agent protects the mouse brain from defective insulin signaling caused by Alzheimer's disease- associated Abeta oligomers. *J.Clin.Invest* 122, 1339-1353

発表業績一覧

論文

Effect of Cholesterol Reduction on Receptor Signaling in Neurons.

Fukui K, Ferris HA, Kahn CR.

J Biol Chem. 2015 Sep 14. [Epub ahead of print]

学会発表

72nd scientific session of American Diabetes Association, June8-12, 2012 Philadelphia, Pennsylvania, USA

Kenji Fukui, C. Ronald Kahn

“Role of Cholesterol in Neuronal Cell Function in Diabetes”

第57回日本糖尿病学会 年次学術集会、2014年5月23～25日 大阪

福井健司、今川彰久、Kahn CR、下村伊一郎

「細胞内コレステロール含量低下に伴う神経細胞機能変化」

第5回泉州地域医療フォーラム、2014年10月4日 大阪

福井健司

「糖尿病と中枢神経細胞機能」

Meet The Expert Conference、2014年11月7日 大阪

福井健司

「糖尿病と中枢神経細胞機能」

第58回日本糖尿病学会 年次学術集会、2014年5月21～24日 下関

「細胞内コレステロール低下による神経細胞インスリンシグナルの変化」

福井健司、今川彰久、Kahn CR、下村伊一郎

特許出願 なし