

学 位 論 文 要 旨

氏 名 今井 基貴



論 文 題 目

「Studies on the physiological role of LRRK2 in glucose metabolism using dexamethasone-induced hyperglycemia model
(デキサメタゾン誘発高血糖モデルを用いた LRRK2 の
グルコース代謝における生理的役割に関する研究)」

指 導 教 授 承 認 印

市川 尊文



Studies on the physiological role of LRRK2 in glucose metabolism using dexamethasone-induced hyperglycemia model

(デキサメタゾン誘発高血糖モデルを用いた LRRK2 の
グルコース代謝における生理的役割に関する研究)

氏名 今井 基貴

要旨

【背景】

Leucine rich-repeat kinase 2 (LRRK2)はパーキンソン病 (PD) 原因遺伝子産物として同定されたプロテインキナーゼで、分子内に GTPase ドメインとプロテインキナーゼドメインを併せ持つユニークな構造をとっている。家族性 PD 患者の約 10%に *LRRK2* の変異が認められるだけでなく、孤発性 PD 患者においても *LRRK2* 変異が認められる。これまでに、*LRRK2* 変異の中でもキナーゼドメインにおける G2019S 変異が最も高頻度であり、LRRK2 のキナーゼ活性を亢進させることが知られている。さらに、LRRK2 のキナーゼ活性の亢進がミトコンドリア機能不全や神経細胞死を引き起こすことが明らかにされている。また、LRRK2 の変異のない孤発性 PD 患者においても LRRK2 キナーゼ活性の亢進が認められることから、LRRK2 キナーゼ活性の亢進が PD の発症に重要であるとされている。さらに、*LRRK2* に変異がある PD 患者では前糖尿病症状を呈する割合が高いことや、糖尿病が PD 発症のリスクを高めることが報告されている。

当研究室の先行研究において、インスリン感受性組織である脂肪組織において LRRK2 が高発現していることを見出した。脂肪組織はエネルギーの供給や貯蔵をする主要な組織であるが、過度な脂肪の蓄積や脂肪細胞の肥大化はインスリン抵抗性や 2 型糖尿病の原因になるとされている。最近、細胞内輸送の分子スイッチとして機能する Rab GTPase ファミリー分子が LRRK2 の基質として同定された。その中でも、Rab8a および Rab10 はインスリン依存的グルコース輸送体である GLUT4 の細胞膜移行に関与していることが報告されており、LRRK2 が GLUT4 の膜輸送を介して糖吸収を調節する可能性が示唆される。さらに、LRRK2 キナーゼ活性の亢進によって誘導される糖代謝異常が中枢神経変性疾患を引き起こすのではないかと考えられた。そこで、本研究では、Dexamethasone(DEX)誘導性高血糖モデルマウスを用いて、LRRK2 の糖代謝における生理的役割と糖代謝異常の中枢神経に対する影響について解析した。

【方法】

C57BL/6J 系統の野生型マウス (WT) および LRRK2-KO マウス (KO)を用いて以下の実験を行った。DEX を 7 日間腹腔投与することにより、高血糖を誘導した。DEX による高血糖誘導後、腹腔グルコース負荷試験 (ipGTT)により、耐糖能の評価を行った。

また、脂肪組織における LRRK2 や Rab のリン酸化およびインスリンシグナル系関連分子であるリン酸化 AKT および GLUT4 の発現を Western blot 法を用いて解析した。

培養細胞を用いた検討では、myc-GLUT4-ECFP(細胞外ループ部位に myc エピトープを持ち、

細胞内 C 末端部位に ECFP を持つ GLUT4)を安定発現させた 3T3-L1 細胞(3T3-L1-G4 細胞)を脂肪細胞に分化誘導後、DEX によるインスリン抵抗性を誘導し、LRRK2 キナーゼ阻害剤である CZC25146 および MLi-2 を作用させ、インスリン刺激した後に抗 myc 抗体による蛍光免疫染色と ECFP の蛍光イメージングおよび Western blot 法を用いて DEX 誘導性インスリン抵抗性条件下における GLUT-4 の膜移行に対する LRRK2 キナーゼ活性の影響を解析した。また、2-デオキシグルコースの取り込み量を定量し、グルコース取り込み能への影響を解析した。

また、同様のマウスを用いて大脳皮質における神経変性疾患関連因子の発現を免疫組織化学染色および Western blot 法を用いて解析した。

【結果】

DEX 誘導性高血糖モデルマウスの脂肪組織における LRRK2 の影響

本実験条件下において、WT-Control (WT-Cont) と KO-Control (KO-Cont)、WT-Dexamethasone (WT-DEX)と KO-Dexamethasone (KO-DEX)の間で体重変動、摂餌量、飲水量に差は認められなかった。ipGTT による耐糖能評価では、WT マウスにおいては DEX 投与による、曲線下面積の有意な増加が認められ、耐糖能が悪化していた。一方で、KO マウスでは、DEX 投与による耐糖能の悪化が認められなかった。さらに、KO-DEX では WT-DEX と比較して曲線下面積の値が有意に低下していた。これらの結果から、KO では DEX による耐糖能の悪化が軽減することが明らかとなった。

次に、解剖時に採取した脂肪組織を用いて、インスリンシグナル系関連分子、Rab および LRRK2 のリン酸化および発現量の解析を Western blot 法を用いて行った。インスリンシグナル系関連分子である、AKT のリン酸化 (Ser473)は WT において DEX 投与により、有意に減少していた。一方で、KO マウスでは DEX 投与によるリン酸化 AKT の減少は認められなかった。さらに、GLUT4 の発現量においても、WT マウスでは DEX 投与によって GLUT4 の発現が有意に減少したが、KO マウスでは GLUT4 発現量の減少は認められなかった。また、LRRK2、Rab8a および Rab10 のリン酸化に対する DEX 投与の影響を解析した。WT マウスでは LRRK2、Rab8a および Rab10 のリン酸化においても、WT マウスでは DEX 投与によって増加していた。一方で、KO マウスにおいては Rab8a および Rab10 のリン酸化はほとんど検出されなかった。

さらに、脂肪組織における炎症性サイトカインの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。その結果、TNF- α の mRNA 発現は DEX 投与により WT マウスと KO マウスで増加していたが、IL-6 の mRNA 発現は増加しなかった。TLR4mRNA の発現量が DEX を投与した WT マウスにおいて増加したが、KO マウスでは増加しなかった。

LRRK2 キナーゼ阻害による GLUT4 細胞膜移行および糖取り込みに対する影響

3T3-L1-G4 細胞を用いた検討では、DEX の添加によって GLUT4 の細胞膜移行が抑制されていた。一方で、LRRK2 キナーゼ阻害剤である CZC25146 および MLi-2 の添加によって GLUT4 の細胞膜移行が改善された。同様に、細胞膜に移行した GLUT4 を Western blot 法を用いて定量比較した結果、CZC25146 および MLi-2 の添加によって GLUT4 の細胞膜移行が改善されること

が分かった。また、糖吸収についても CZC25146 および MLi-2 の添加により改善することが明らかとなった。

DEX 誘導性高血糖モデルマウスの中枢神経系における LRRK2 の影響

DEX 誘導性高血糖モデルマウスの中枢神経系における LRRK2 および Rab10 のリン酸化および発現量を Western blot 法を用いて解析した。その結果、大脳皮質における LRRK2 のリン酸化と Rab10 のリン酸化が DEX 投与によって増加することが分かった。また、Caspase-3 の発現が DEX 投与した WT マウスで増加していた。一方で、KO マウスでは DEX 投与による Caspase-3 発現の増加は認められなかった。さらに、神経細胞保護作用を有する AKT や AMPK のリン酸化が DEX 投与した WT マウスで減少していた。しかしながら、KO マウスでは DEX 投与によるそれらの変化は認められなかった。

PD やアルツハイマー病 (AD) の患者脳において、グリア細胞の異常な活性化が炎症反応を介して神経細胞死を誘導することが報告されている。そこで、活性化ミクログリアマーカーである Iba-1 の発現量を解析したところ、WT マウスでは DEX 投与によって大脳皮質における発現量が増加していたが、KO マウスでは Iba-1 の増加は認められなかった。

【考察】

本研究において、KO マウスでは DEX 投与によって誘導される耐糖能異常が抑制されることが明らかとなった。また、WT マウスの脂肪組織においては DEX 投与により LRRK2 キナーゼ活性、Rab8a および Rab10 のリン酸化の増加、AKT のリン酸化および GLUT4 発現量の減少が認められたが、KO マウスでは認められなかった。脂肪組織において、DEX 投与により LRRK2 のキナーゼ活性が増加した機序として、TLR4 シグナル経路の関与が示唆された。一方で、培養細胞を用いた検討では、LRRK2 キナーゼ阻害剤を添加することによって DEX 添加による GLUT4 の細胞膜移行および糖吸収の阻害が改善することが明らかとなった。これまでに、LRRK2 による Rab のリン酸化は GEF との相互作用を阻害することで小胞輸送を抑制することが報告されている。本研究においても、DEX 投与による LRRK2 キナーゼ活性の亢進が認められ、その基質である Rab8a および Rab10 のリン酸化が亢進したことで、GLUT4 の細胞膜移行が抑制され、細胞内糖吸収の低下および耐糖能異常の悪化が誘導されたものと考えられた。

大脳皮質においては、DEX 投与によって LRRK2 のキナーゼ活性の亢進 caspase-3 発現の増加、さらに AKT および AMPK の活性化の抑制が認められた。また、DEX 投与により Iba-1 陽性細胞が増加していることが明らかとなった。LRRK2 キナーゼ活性の亢進はミクログリアを活性化させることや、ミクログリアの活性化が炎症性サイトカインの分泌亢進を介して神経細胞死を誘導することが報告されているため、DEX 投与による大脳皮質での LRRK2 キナーゼ活性の亢進はミクログリアも活性化による炎症性サイトカインの分泌を促進することと、AKT や AMPK による神経細胞保護作用を抑制することで神経細胞死を誘導することが示唆された。

これまでに、*LRRK2* の G2019S 変異がキナーゼ活性を亢進させことや、G2019S 変異を持つ人では前糖尿病症状の保有率および PD の発症率が高いことが報告されている。

以上のことから、本研究により DEX などの化合物や遺伝子変異による LRRK2 キナーゼ活性の亢進が末梢脂肪組織に関連した糖代謝異常を引き起こし、この糖代謝異常と LRRK2 キナーゼ活性の亢進が相乗的に中枢神経変性を誘導することが示唆された。