

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14343

研究課題名(和文) 神経核の脱落がタウ病理形成に与える影響の解明

研究課題名(英文) Effects of a neurotoxin DSP-4 on pathogenesis in a mouse model of tauopathy

研究代表者

吉田 裕孝 (YOSHIDA, Hirotaka)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・共同利用推進室・研究生

研究者番号：70646570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経毒DSP-4投与は、タウオパチーモデルマウス(PS19)の大脳皮質、海馬および嗅内野においてノルアドレナリンの減少、タウオパチー発症早期でのタウ病理の出現ならびに生存率の低下を促進した。本結果はノルアドレナリンがタウ病理形成拡大を修飾することを示唆し、認知症発症機構の解明と治療薬開発の新規の標的を提案するものと考えられた。また、オリゴマー状およびコンフォメーション依存性抗タウ抗体の反応性が細胞内および細胞外タウで異なり、これらの抗体を用いた免疫化学的手法は、タウ病理伝播に重要と考えられる細胞外タウの解析とタウ病理形成伝播機構の解明に応用可能と期待される。

研究成果の概要(英文)：A reduction of level of noradrenalin in cortex, hippocampus and entorhinal cortex by a neurotoxin DSP-4 induced a spread of tau pathology to these regions in an earlier stage in a pathological process and a reduction of survival rate in a transgenic mouse model of tauopathy, expressing P301S mutant tau protein. The results suggested that the reduction of the level of noradrenalin and its effects on neuronal activity in brain enhance the aging and the pathogenesis of tauopathy in the model mouse line. In addition, extracellular tau was labeled by oligomer- and conformation-dependent anti-tau antibodies more than intracellular tau, indicating that immunochemical approach using these antibodies are useful for further study for a molecular mechanism of progression of tau pathology.

研究分野：神経科学

キーワード：タウ タウオパチー 認知症 ノルアドレナリン 神経毒

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病などの認知症を発症する神経変性疾患脳には、微小管結合タンパク質タウを構成成分とする細胞内封入体の蓄積および神経細胞の脱落を特徴とするタウ病理が確認される。多数の連続剖検脳を用いた Braak らの病理学的所見から、アルツハイマー病脳では、嗅内野から海馬そして大脳皮質へとタウ病理が、決まった様式にしたがって拡大することが示され、タウ病理がプリオン様に神経結合を介して細胞から細胞に伝播するというプリオン仮説が提唱された。そして、嗅内野でタウ病理が確認されるより若年期に青斑核ニューロンにタウ病理が確認されることも報告された。

近年、マウスおよび培養細胞を用いて、タウ病理伝播のプリオン仮説を検証する実験が行われ、数百 nm 長の短い線維状タウあるいはオリゴマー状タウのマウス脳内への注入あるいは培養細胞への曝露が、効果的にタウ病理を伝播拡大することが示された。しかしながら、(1)神経細胞内でタウ病理伝播能をもつタウの形成機構およびその性質、(2)タウ病理伝播能をもつタウが細胞外に分泌される機構、(3)タウ病理の形成と伝播拡大が神経細胞死および認知症を誘導する機構については未解明である。

2. 研究の目的

①青斑核はノルアドレナリン作動性ニューロンの中核であり、アルツハイマー病を発症する20年以上も早い若年期にタウ病理が出現すると報告された。本研究では脳内ノルアドレナリン量の変化、そしてこれにともなう脳内環境変化が、タウオパチー動物モデルにおけるタウ病理形成、拡大そして神経細胞死に与える影響について検証する。

②タウ病理伝播のプリオン仮説においては、(1)神経細胞内で伝播能をもつ線維状タウあるいはオリゴマー状タウの形成、(2)伝播能を

もつタウの神経細胞外への分泌、(3)伝播能をもつタウの神経結合をもつ細胞への取り込み、そして(4)取り込まれたタウの細胞内でのタウ病理の増幅(タウの不溶化およびタウの線維化を促進すること)と伝播能をもつタウの再形成という少なくとも4段階のサイクルを繰り返すことが予想される。このうち、細胞外へのタウの分泌機構については未解明であるので、タウ病理伝播機構を解明する目的で細胞外タウの性質の解析を行う。

3. 研究の方法

①P301S 変異タウを発現する遺伝子改変マウス B6;C3-Tg(Prnp-MAPT*P301S)PS19/V1e/J (PS19 マウス)に神経毒 DSP-4 を腹腔内投与し、マウスの生存率(寿命)に与える影響、加齢にともなうタウの不溶化およびタウ病理の出現を脳領域ごとに生化学的、免疫組織化学的に解析する。脳内モノアミンであるノルアドレナリン、ドーパミンおよびセロトニン量は電気化学的に計測する。

②ヒトタウを発現する細胞株を作成し、培養液中に放出されるタウ(細胞外タウ)ならびに細胞抽出液中のタウ(細胞内タウ)をタウの各分子内領域、オリゴマー状態およびコンフォメーション依存性抗タウ抗体を用いて免疫化学的に解析する。

4. 研究成果

PS19 マウスは、タウオパチー発症初期(生後6ヶ月齢以後)には主に脳幹および脊髄に、そして後期(生後9ヶ月齢以後)には大脳皮質、嗅内野および海馬にタウ病理が拡大するモデルである。

①PS19 マウスを用いて、神経毒 DSP-4 投与群と無投与である対照群の生存率を比較した結果、50%生存率となる時間(日数)は、神経毒 DSP-4 投与群(n=22)では258日、対照群(n=23)では327日であり、両群の間で有意差(p=0.0378)が認められた(図1)。この結果は、神経毒 DSP-4 の投与が PS19 マウ

スの老化および生存率（寿命）に影響を与えることを示唆した。

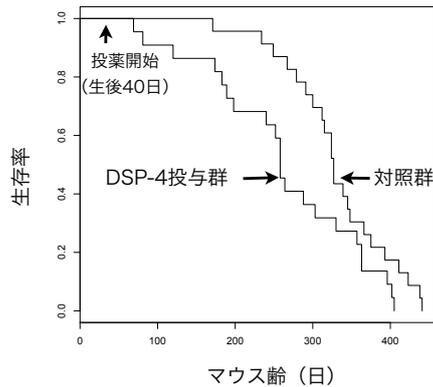


図1 Kaplan-Meier法によるPS19マウスの生存率曲線
DSP-4投与群と対称群の生存率の比較

②神経毒 DSP-4 投与が、PS19 マウスにおいて加齢にともなうタウ病理形成に与える影響を解析した。神経毒 DSP-4 投与 1 ヶ月後には、無投与の対照と比較して、大脳皮質、嗅内野および海馬においてノルアドレナリン量の著しい低下が確認されたが、ドーパミンおよびセロトニン量については有意差がみられなかった。

リン酸化依存性および非依存性タウ抗体等を用いた生化学的および免疫組織化学的解析から、神経毒 DSP-4 投与マウスでは生後 7 ヶ月齢には、脊髄および脳幹に加えて大脳皮質、嗅内野および海馬においても、イムノブロット法で A68 (SDS 電気泳動上で分子量 64-68kDa のバンド)、そして免疫組織化学的に AT8 陽性タウ封入体が確認された。また炎症マーカーの発現にも違いがみられた。これに対し、無投与である対照マウスでは、生後 7 ヶ月齢では脊髄および脳幹にはイムノブロット法で A68、そして免疫組織化学的に AT8 陽性タウ封入体が確認されたが、大脳皮質、嗅内野および海馬には確認されなかった。大脳皮質、嗅内野および海馬における上記の病理変化は、生後 9 ヶ月から確認された。

これらの結果は、大脳皮質、嗅内野および海馬領域におけるノルアドレナリンの減少が、これらの脳領域におけるタウ病理形成を

促進することを示唆した (表 1)。

	7ヶ月齢		9ヶ月齢		11ヶ月齢	
	対照群	DSP-4投与群	対照群	DSP-4投与群	対照群	DSP-4投与群
大脳皮質	-	+	+	++	++	+++
嗅内野	-	+	+	++	++	+++
海馬	-	+	+	++	++	+++
脳幹	++	++	+++	+++	+++	+++

表1 神経毒DSP-4投与がPS19マウスのタウ病理形成に与える影響
リン酸化依存性抗タウ抗体AT8陽性神経細胞数を相対的に表示 (+~+++、-は未検出)。

研究成果①および②は、ノルアドレナリンがタウ病理形成拡大を修飾することを示唆し、認知症発症機構の解明と認知症治療薬開発の新規の標的を提案するものと考えられた。

③抗タウ抗体を用いて細胞培養液中に分泌される細胞外タウ量と細胞抽出液中の細胞内タウ量の比を計測した。リピート部位特異抗体 Rtau で総タウを標識したときの細胞外タウ量と細胞内タウ量の比を 1 とすると、D421 残基から C 末端側を欠損したタウ (aa2-421) を標識する抗体 TauC3 では 2.86 倍となり、タウの N 末端および C 末端を標識する抗体 (Ntau および Ctau) では有意差はみられなかった (図 2)。この結果は、タウの C 末端領域がタウの細胞外分泌に影響を与えることを示唆した。

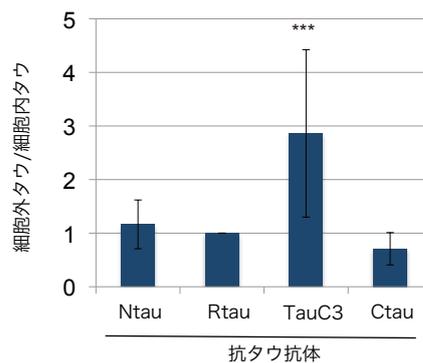


図2 D421残基でC末端切断されたタウはより細胞外に分泌される。Ntau;抗タウN末端 (aa2-16) 特異抗体, Rtau; 抗タウリピート特異抗体, TauC3 (end-specific at D421); 抗タウD421 残基C末端特異抗体, Ctau; 抗タウC末端特異抗体 (aa404-441) (***) $p < 0.05$, $n = 8$ 。

オリゴマー状タウを特異的に認識する抗タウ抗体 TOC-1 およびコンフォメーション依存性抗タウ抗体 MC-1 を用いて細胞外タウ量

と細胞内タウ量の比を計測した。総タウを認識する抗タウ抗体を用いて標識した細胞外タウと細胞内タウ量の比を 1 とした場合、TOC-1 および MC-1 を用いて標識した細胞外タウと細胞内タウ量の比は、それぞれ 1.43 倍および 2.45 倍であった(図 3)。この結果は、タウのオリゴマーの状態およびコンフォメーション変化がタウの細胞外分泌に影響することを示唆した。

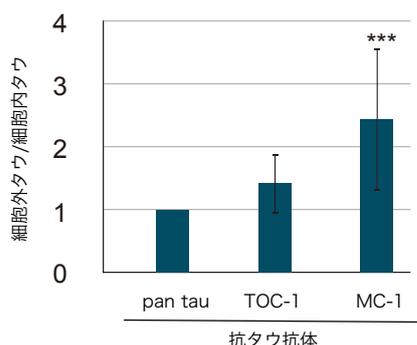


図3 オリゴマー状およびコンフォメーション変化したは、より細胞外に分泌される。pan tau; 全てのタウを認識する抗体、TOC-1; オリゴマータウ特異抗体、MC-1; コンフォメーション依存性抗タウ抗体 (***) $p < 0.05$, $n = 8$)

研究成果③から得られた知見から、タウ分子内領域を認識する抗体、タウオリゴマーおよびタウのコンフォメーション変化を標的とする複数の抗タウ抗体を用いた免疫化学的アプローチは、細胞内および細胞外タウの識別と性質を解析することを可能とし、本研究課題において検討した薬物投与により誘導されるタウ病理拡大を促進する機構の解明のみならず、タウオパチー発症の分子機構の解明に有効な手法であると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Norimichi Shirafuji, Tadanori Hamano, Shu-Hui Yen, Nicholas Kanaan, Hiroataka Yoshida, Kouji Hayashi, Masamichi Ikawa, Osamu Yamamura, Masaru Kuriyama, and Yasunori Nakamoto
Homocysteine increases tau phosphorylation, truncation and oligomerization.
International Journal of Molecular Science. 19 (3): 891, 2018.

Doi: 10.3390/ijms 19030891

査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 吉田 裕孝

Characterization of extracellular tau.
第 3 6 回日本認知症学会学術集会
平成 2 9 年 1 1 月 2 3 日 (石川県金沢市)

② 吉田 裕孝

タウの細胞外放出機構の解析
第 3 5 回日本認知症学会学術集会
平成 2 8 年 1 2 月 2 日 (東京都)

③ 吉田 裕孝

タウの細胞外放出に影響するタウ分子内領域の解析
第 3 4 回日本認知症学会学術集会
平成 2 9 年 1 0 月 2 日 (青森県青森市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 裕孝 (YOSHIDA, Hiroataka)
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・共同利用推進室・研究生
研究者番号: 70646570

(2) 研究分担者

木村 哲也 (KIMURA, Tetsuya)
国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・アルツハイマー病研究室・室長
研究者番号: 00415142