

令和元年6月1日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21328

研究課題名(和文) タウのリン酸化亢進によって惹起される認知機能障害のメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanisms of memory impairment caused by the increase in phosphorylated tau

研究代表者

柳下 聡介 (Yagishita, Sosuke)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第五部・室長

研究者番号：30585592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：微小管結合タンパク質タウは、過剰なリン酸化を受けると凝集し、神経原線維変化を形成する。神経原線維変化は、正常な加齢に伴って嗅内皮質や海馬に出現し、アルツハイマー病では、その出現部位が大脑皮質など広範囲に広がるが、それが出現するメカニズムは不明である。本研究では、まず、リン酸化タウが生理的条件下でどのように調節されているか解析した。その結果、神経活動に伴って増減することが分かり、神経活動依存的な遺伝子発現の程度に比例して変化することを初めて明らかにした。次に、リン酸化タウが持続的な増加した状態を作り出したところ、蓄積の前段階と考えられる界面活性剤不溶性タウが増加する傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸化タウの蓄積は正常な加齢でも見られ、神経細胞を長年使った結果と捉えることもできる。本研究では、リン酸化タウが増減する仕組みを理解し、神経細胞に生来備わった性質の解明を目指したものである。これは脳の加齢の実態を知り、認知症との境界を理解することである。その結果、従来の定説とは異なり、リン酸化タウは神経活動に伴って普段から増減し、神経活動量が変わることでリン酸化タウが増加した状態が持続することが分かった。そしてその状態が持続すると、蓄積の前段階と考えられるタウが増加する可能性を見出した。このような状態が特定の範囲を超えて広範囲で起きているのが認知症という新たな捉え方を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Neurofibrillary tangles are composed of abnormally phosphorylated tau, a microtubule-associated protein. Neurofibrillary tangles are present in entorhinal cortex or hippocampus in normal aging brains, and are present in cerebral cortex in Alzheimer disease brains. However, the mechanism of neurofibrillary tangle formation is still unknown. In this study, I investigated how the level of phosphorylated tau alter in physiological condition. I found that the level of phosphorylated tau alter according to neural activity, and the extent of neural activity-dependent new gene expressions. This result made me to generate a condition in which the level of phosphorylated tau increased. I found that consecutive increase in phosphorylated tau led to increase in detergent-insoluble tau, which is thought to be the pre-accumulated form.

研究分野：神経病理学

キーワード：タウ アルツハイマー病 神経活動

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微小管結合タンパク質タウは、過剰なリン酸化を受けると凝集し、アルツハイマー病等で観察される神経原線維変化を形成する。そもそも、神経原線維変化は、加齢に伴って嗅内皮質や海馬に出現し、アルツハイマー病では、その出現部位が大脳皮質など広範囲に広がる。よって、神経原線維変化の出現するメカニズムを理解することは、加齢に伴って脳がどのように変化するのかを理解することにも繋がる。そのような根本的な「脳の仕組み」、特に、正常な「脳の仕組み」を理解することは、アルツハイマー病などの認知症の発症メカニズムを理解する上でも、避けて通ることはできない。

一般には、神経原線維変化の形成の前段階として、リン酸化タウの増加があると考えられている。しかし、この記述の信憑性については、現在でも議論の対象であり、実際のところ、よく分かっていないことが多い。しかし、神経原線維変化が過剰にリン酸化タウで構成されていることは事実である。そこでまず、実際のところはよく分かっていない、タウのリン酸化制御機構の理解を目指すこととした。

本研究の開始時点で、既に、タウが過剰に存在するような、病的な条件での研究は数多くなされていた。しかし、正常時でのタウのリン酸化制御機構の解析は遅れているのが現状である。もちろん、病的な状態の研究は、疾患研究を行う上で重要である。しかし、それと同等の重要度で、正常な条件下での研究も重要である。正常な条件下での研究、つまり、病的状態の対照となる条件の研究も同じような進捗状況で進まなければ、病的な状態の理解も進まない。何が「病的」なのかは、「正常とは何か」を正しく理解しなければ、明確に定義できないからである。一見すると正常状態を研究対象とすることは、疾患研究に見えないかもしれないが、そうではない。このような研究も、疾患そのものを研究するのと同程度に、社会の要請にも十分応えられるものである。そこで、正常状態でのタウの機能について解析し、正常な状態と病的な状態との間をつなぐような研究を遂行しようと考えた。

仮に、神経原線維変化の形成の前段階として、リン酸化タウの増加があるのだとすれば、リン酸化タウの増加をもたらすような条件があるはずである。そこで、そのような条件を探索してきた。その結果、研究開始当初の時点で、間歇的低酸素負荷に依って、マウス脳内のリン酸化タウが増加することを見出していた。このマウスを解析することで、「生体内で、リン酸化タウが増加するメカニズム」を理解すべく、研究を開始した。

2. 研究の目的

正常な状態でのタウのリン酸化制御機構を明らかにし、特に、リン酸化タウが増加する条件を見出すことを目的とした。また、リン酸化タウの増加した状態の持続が、タウの蓄積を引き起こすかどうか、を明らかにすることを目的とした。

これらを通じて、タウの生理機能を考察し、認知症に関する基礎研究の基盤の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 間歇的低酸素負荷を行ったマウスの脳内で起きている現象を理解するため、網羅的遺伝子発現解析を行い、その解釈を行った。

(2) 前項の結果、神経活動とリン酸化タウの増減との間に、密接な関係があることが示唆されたので、初代培養神経細胞を用いた解析を行った。

(3) 前項の研究の過程で、リン酸化タウを恒常的に増加させる刺激の候補を見出した。そこで、その状態が生体に与える影響を解析した。なお、ヒト型タウノックインマウスを用いた。

4. 研究成果

(1) 以前の科研費の助成期間中では、間歇的低酸素負荷によってリン酸化タウが増加する可能性があるというデータを得たところまでで終了していた。その後、間歇的低酸素負荷の実施期間を延長するとどうなるか、行動試験はどうなるかなどを検討した。この期間の結果については、科研費の助成のない時期の結果であること、すでに論文にて公表していることから、内容は割愛する。

本助成によって行ったのは、網羅的遺伝子発現解析の解釈に基づいた解析である。解析の結果、間歇的低酸素負荷が神経活動に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、細胞内のリン酸化酵素、脱リン酸化酵素の活性のバランスを攪乱していることが示唆された。神経活動に関しては、後に詳細な解析を行うことになるので、そこで述べる。後者に関しては、mTOR シグナリングへの影響が強く示唆された。そこで、mTOR の下流にある因子をいくつか調べた。その結果、特に、p70S6K の活性を亢進させている可能性を明らかにした。このように、網羅的遺伝子発現解析の結果と矛盾しない結果を得ることができた。

これらの結果をまとめて、論文としてまとめ、公表した。科研費の助成を受けていることを考慮し、オープンアクセス誌で公表すること、なるべく早く世に出すことを最優先した。というのも、ここまでで得られた結果は、示唆には富むもの、一方で、他の研究者から様々な批判を受ける必要のある結果だからである。特に、遺伝子発現解析の結果は、その一部を切り取って解析したに過ぎず、むしろ、この分野の第三者による再解析を通じた批判を受けながら、真実にたどり着ける類のものであるし、そうでなくてはならない。加齢という曖昧なファクターを

扱っている以上、同様の研究を行っている研究者にデータを共有してもらったことが最も重要である。そのため、特定の人しかアクセスできない雑誌ではなく、全世界で閲覧可能な雑誌を選ぶことにした。今後、この解析結果を土台にして、加齢に関して新たな理解が進むことが期待される。利用可能なデータについては、論文に記載した上で、NCBIのデータベース上に登録されている。

(2)上記の解析の結果、リン酸化タウの変動と神経活動との間に密接な関係があることが示唆された。そこで、この部分に関して、より詳細な解析を行うことにした。マウスの神経細胞を培養し、様々な薬剤を添加、その上でリン酸化タウの変動を解析した。その結果、脱分極によってリン酸化タウのレベルは劇的に変化し、その後起こる遺伝子発現によって、それとは逆の方向に動くことが分かった。脱分極によるリン酸化タウの変化量を一定と仮定すると、遺伝子発現の程度に比例して変動することが分かり、リン酸化タウの変動を表す数理モデル(仮説)を導くに至った。このモデルが正しいかどうかは、今後の解析していく中で検証し、時に修正を加えながら、より正確な数理モデルの構築を行っていく予定である。現時点では、そのモデルから、刺激が特にならない状態での神経細胞内のリン酸化タウの量は、一定に保たれていることが示唆された。

次に、脱分極がリン酸化タウにもたらす影響が、どの経路を介するのかを調べた。タウを基質とするリン酸化酵素の阻害剤や、脱リン酸化酵素の阻害剤、また、タンパク質分解酵素阻害剤、プロテアソーム阻害剤、オートファジー阻害剤などを添加して、その影響を観察した。その結果、どの経路を阻害しても完全にリン酸化タウの変化が阻害されるということはなかった。現在、さらなる解析を検討している。

さらに、生体内でのリン酸化タウの変動を測定した。その結果、神経活動があると、培養細胞での結果を反映する劇的な変化をすることが分かった。細胞系で得られた数理モデルを適用することで、どれくらいの細胞が、遺伝子発現を伴うのかを推定することができると考えており、現在、解析を進めている。

(3)これまでの結果から、神経活動とリン酸化タウの変動との間に、密接な関係性のあることが、初めて示唆された。この知見を利用して、次は、リン酸化タウが恒常的に増加した状態を作り出すことができるか、その状態が生体で起こるとどのような影響があるのか、という問題を解決すべく、解析を実施した。これまでに得られた遺伝子発現解析結果や文献情報を元に、或る因子の発現低下によって、リン酸化タウが増加する可能性を突き止めた。そこで、その因子の阻害剤、及び、発現抑制ベクターを作成して、初代培養神経細胞に作用させた。その結果、予想通り、リン酸化タウが顕著に増加することがわかった。

次に、これを生体内で起こすとどうなるかを検証することにした。最終的には、このような状態を生体で持続させた時に、タウの蓄積が認められるかどうかを検証したいと考えている。そのため、まずは、ヒト型タウノックインマウスを用いた解析を行うことにした。

或る因子の阻害剤および発現抑制ベクターを、ヒト型タウノックインマウスの海馬にインジェクションし、脳内のタウのリン酸化の増減を評価した。その結果、細胞で見られたのと同様、これらのインジェクションによって、リン酸化タウが増加することが分かった。その効果はインジェクションから数ヶ月が経過しても持続していた。また、インジェクションした側とは反対側でも、同様の傾向が見られた。その理由としては、(1)凝集に至る中間体であるタウオリゴマーが反対側にも伝播して、リン酸化タウを増加させた、(2)タウの凝集物ではなく、インジェクションした側の神経活動の状態が変化し、それが反対側にも伝播した、という2通りが考えられる。今後、どちらが真実なのか、それとも両方が併用されているのかを検証する。

このようにリン酸化タウを増加させた状態を持続させられるようになったので、凝集したタウが存在するか、少なくともその前段階のものが存在するかの検証を行った。海馬以外にも解析対象を広げ、特に、嗅内皮質を含む部分に着目して解析を行った。染色レベルでは、明瞭な凝集物は見られていないが、界面活性剤に対する溶解性による分画を行うと、多少、リン酸化タウが増加している個体の方が、界面活性剤不溶性のタウが増加している傾向は見られた。今後、この現象が、アミロイドβタンパク質の存在下で増強されるのかどうか、などを検証し、アルツハイマー病で見られる病理像の形成過程を明らかにする。

なお、新たに見出した因子の解析と並行して、ヒト型タウノックインマウスに対する間歇的低酸素負荷実験も行った。自身の先行研究で明らかにした通り、このモデルでも確かにリン酸化タウが増加することを確認した。また、興味深いことに、そのあと、しばらくの期間、通常環境で飼育しても、その影響が残ることがわかった。そこで、この実験系を用いて、リン酸化タウの増加の持続がもたらす影響を調べた。その結果、上記と同様、間歇的低酸素負荷を行った方で、界面活性剤不溶性のタウが増加している傾向が見られた。今後、この現象が、アミロイドβタンパク質の存在下で増強されるのかどうかを検証予定である。

(まとめ)神経活動に着目し、その変動がリン酸化タウの量を増減させることを初めて明らかにした。またその知見を利用して、リン酸化タウが増加した状態を持続させることができるようになった。この検証を進めることで、アルツハイマー病で見られる病理像の形成過程を明らかにでき、認知症発症の根本を理解できるようになると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

[1] Shinji Yamamoto, Kota Yamashina, Masaki Ishikawa, Mari Gotoh, [Sosuke Yagishita](#), Kensuke Iwasa, Kei Maruyama, Kimiko Murakami-Murofushi, Keisuke Yoshikawa, Protective and therapeutic role of 2-carba-cyclic phosphatidic acid in demyelinating disease, *J Neuroinflammation*. 2017 Jul 21;14(1):142. doi: 10.1186/s12974-017-0923-5.

[2] Kensuke Iwasa, Shinji Yamamoto, [Sosuke Yagishita](#), Kei Maruyama, Keisuke Yoshikawa, Excitotoxicity-induced immediate prostaglandin D2 production induces sustained microglial activation and delayed neuronal death in the hippocampus, *J Lipid Res*. 2017 Apr;58(4):649-655. doi: 10.1194/jlr.M070532

[3] [Sosuke Yagishita](#) and Akira Hirasawa, Intermittent hypoxia produces Alzheimer disease ?, *Oncotarget* 8(26), 41786-41787, 2017

[4] [Sosuke Yagishita](#), Seiya Suzuki, Keisuke Yoshikawa, Keiko Iida, Ayako Hirata, Masahiko Suzuki, Akihiko Takashima, Kei Maruyama, Akira Hirasawa, Takeo Awaji, Treatment of intermittent hypoxia increases phosphorylated tau in the hippocampus via biological processes common to aging, *Mol. Brain*, 2017, 10:2

[5] Masashi Asai, Aimi Kinjo, Shoko Kimura, Ryotaro Mori, Takashi Kawakubo, Keiro Shirovani, [Sosuke Yagishita](#), Kei Maruyama, Nobuhisa Iwata, Perturbed Calcineurin-NFAT Signaling Is Associated with the Development of Alzheimer's Disease, *Biol. Pharm. Bull.* 2016;39(10):1646-1652.

[6] Yoji Yonemura, Eugene Futai, [Sosuke Yagishita](#), Christoph Kaether, Shoichi Ishiura, Specific combinations of presenilins and Aph1s affect the substrate specificity and activity of γ -secretase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016 Sep 30;478(4):1751-7

[学会発表] (計 7 件)

[1] [Sosuke Yagishita](#), Miyuki Murayama, Tomoe Ebihara, Kei Maruyama, Akihiko Takashima, GSK-3 β -mediated phosphorylation of PICK1 regulates the GluA2-PICK1 interaction, Society for Neuroscience, San Diego, CA, U. S. A., November 12-16, 2016 Poster, 412.02/018 (November 14)

[2] [Sosuke Yagishita](#), INTERMITTENT HYPOXIA INCREASES TAU PHOSPHORYLATION VIA BIOLOGICAL PROCESSES COMMON TO AGING: POTENTIAL LINK BETWEEN SLEEP-DISORDERED BREATHING AND ALZHEIMER DISEASE, 6th Mediterranean Neuroscience Society Conference 2017, Radisson BLU, St Julian's, Malta, June 12 - 15, 2017 Poster P.13.8 (June 13)

[3] [柳下聡介](#), 淡路健雄, 鈴木星也, 飯田桂子, 平田理子, 鈴木正彦, 丸山敬, 平澤明, 「内在性タウのリン酸化亢進モデルマウスのマイクロアレイ解析」, 第 89 回日本薬理学会年会, 横浜, 2016 年 3 月 10 日, ポスター, 2-P-28

[4] [柳下聡介](#), 村山美由紀, 海老原朋江, 丸山敬, 高島明彦, 「GSK-3 β が関与する PICK1 のリン酸化は, GluA2 との結合を制御する」, 第 39 回日本神経科学大会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2016 年 7 月 20 日, ポスター, P1-319

[5] [柳下聡介](#), 鈴木星也, 吉川圭介, 飯田桂子, 平田理子, 鈴木正彦, 高島明彦, 丸山敬, 平澤明, 淡路健雄, 「内在性リン酸化タウ増加モデルのマイクロアレイ解析」, 第 35 回日本認知症学会, 東京国際フォーラム (東京), 2016 年 12 月 1 日~3 日, ポスター, 258, 発表日 12 月 2 日

[6] [柳下聡介](#), 鈴木星也, 淡路健雄, 平澤明, 丸山敬, 「間欠的低酸素負荷は, 加齢とアルツハイマー病との関連を研究するための新たなモデルである」, 第 40 回日本神経科学大会, 幕張メッセ (千葉), 2017 年 7 月 20 日~23 日, ポスター, 2P-316, 発表日 2017 年 7 月 21 日

[7] [柳下-姜楠](#), 原田美海, 上北朋子, 丸山敬, 伊海結貴, 越本知大, [柳下聡介](#), 社会性に関わるシナプス接着分子に対する性ホルモンの影響, 第 92 回日本薬理学会年会, 大阪, 2019 年 3 月 15 日

〔図書〕（計 2 件）

[1] Sosuke Yagishita, “Co-immunoprecipitation Assay to Investigate the Interaction Strength Between Synaptic Proteins Using COS-7 Cells”, Co-Immunoprecipitation Methods for Brain Tissue, p89-96, Humana Press, 2018

[2] 柳下聡介, カラー図解 人体の細胞生物学 日本医事新報社 p254-255, 2018 年
ISBN978-4-7849-3232-0

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：タウタンパク質のリン酸化が亢進された非ヒトモデル動物の製造方法

発明者：柳下聡介, 鈴木正彦, 淡路健雄, 吉川圭介, 丸山敬, 鈴木星也

権利者：学校法人埼玉医科大学

種類：特許

番号：特許第 6210752 号

取得年：2017 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/yakuri/posts/activity.html>

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。