

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04193

研究課題名(和文)アルツハイマー病A の脳内エコノミー破綻によるタウ依存的神経障害の分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms of Abeta economy in the brain of Alzheimer's disease

研究代表者

岩坪 威 (Iwatsubo, Takeshi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授

研究者番号：50223409

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)において、アミロイド タンパク質(A_β)が異常な性質を獲得し、下流で神経細胞死を誘発する分子基盤の解明を目的として研究を遂行した。ADモデル動物であるAPPトランスジェニックマウス脳可溶性画分より、脳注入時にA_β蓄積を誘発する能力を有する200-300 kDaのA_βオリゴマー画分(peak 1)を同定し、peak 1 A_βによるA_β蓄積誘発へのapoEの関与を明らかにした。AD患者脳からもA_β蓄積誘発能を持つpeak 1 A_βを見出し、peak 1 A_βはAD脳におけるA_β蓄積の時空間的な拡大に関与する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症の原因疾患として増加するアルツハイマー病の病因として、脳内でアミロイド(A_β)が凝集蓄積し、神経細胞の変性脱落を招く過程が重要と考えられているが、その詳細な分子機構は明らかでない。本研究ではアミロイド蓄積を有する脳内で、A_βは200-300 kDaのオリゴマー(peak 1 A_β)を形成して存在すること、peak 1 A_βは脳内に注入するとA_β蓄積を誘発する能力を有することを明らかにした。peak 1 A_βはアミロイド蓄積を介してアルツハイマー病の発症に関わる可能性があるため、その形成・作用機序を明らかにできれば、新たなアルツハイマー病予防・治療薬の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Massive deposition of amyloid peptide (A_β) as senile plaques is a pathological hallmark of Alzheimer's disease (AD). In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms of accumulation of A_β and neurodegeneration in vivo in brains. We identified three A_β-positive peaks by size-exclusion separation of soluble fractions of brains of APP transgenic mice. Among these peaks, we found that the ~200-300 kDa peak (peak 1 A_β) is comprised of A_β oligomers and had a potency to induce amyloid deposition upon injection into the brain parenchyma. We also found that targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the human apolipoprotein E3 suppressed the A_β deposition induced by injection of peak 1 A_β. Peak 1 A_β was detected also in human AD brains. These findings should provide a clue to the mechanism of spatiotemporal spreading of A_β in AD brains.

研究分野：神経病理学

キーワード：アルツハイマー病 A_β タウ

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD)は高齢者の認知症の中で最も頻度の高い疾患であり、高齢化社会において患者数は増加の一途を辿っているが、未だ根本治療法は実用化されていない。AD 患者脳では、広汎な神経細胞死に加えて、細胞外腔に老人斑、神経細胞内に神経原線維変化の2種類の線維性病変が蓄積する。老人斑を構成するアミロイド線維は A β (amyloid β peptide)、神経原線維変化を構成する paired helical filament (PHF)は高度にリン酸化されたタウを主成分とする。これまで A β が凝集・蓄積する過程が神経細胞死を誘発し、AD の病因となると考える「アミロイド仮説」が広く支持されている。しかし脳内で A β が凝集を開始し、神経細胞死を招来するその詳細な分子機構は明らかではなかった。

神経細胞から分泌された A β は、正常には分解や排出により速やかに脳内から消失する。しかし加齢などの環境要因や遺伝的要因などにより脳内での代謝を免れ、凝集性を獲得した A β は、脳内で蓄積を開始し、神経細胞の変性を招くと予測される。そこで本研究ではこの脳内 A β の存在を規定する、産生・代謝・凝集過程を包括的に『A β エコノミー』という概念で捉え、不可逆的な A β エコノミー破綻が AD 病態発症の最初のトリガーと考えた。しかし AD エコノミーの分子基盤の全容は不明であり、AD の効果的な予防・治療法開発のために、その解明は急務であった。

一方、AD 脳の病理学的解析により、老人斑ではなく、神経原線維変化と神経細胞死に正の相関関係が見出されること、さらに AD と同様にタウ蓄積と神経変性を生じる「17 番染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症」(FTDP-17)においてタウ遺伝子変異が同定されたことから、タウ蓄積過程は神経変性・細胞死の直接の原因であることが証明された。さらに、AD 脳と同様に加齢依存的に A β 蓄積を生じる APP (A β precursor protein) tg マウスにおいて、タウ遺伝子を欠損させると A β 蓄積量は不変であるが認知機能低下が抑制されること、タウ tg マウスと交配すると、A β 蓄積量は不変であるがリン酸化タウ蓄積が増大することなどの実験的知見から、**A β エコノミー破綻を上流とし、タウ介在性の神経細胞死を下流とする「A β -タウカスケード」の存在が予想されたが、両者を繋ぐ分子メカニズムは不明であった。**

2. 研究の目的

本研究では、「A β -タウカスケード」を AD 発症の中心軸であると考え、脳内の A β エコノミー破綻により何らかの異常性を獲得した A β 分子種が出現する上流と、A β がタウ介在性の神経細胞死を招来する下流に区別し、両者の分子基盤を解明することで、**脳内 A β エコノミーの破綻がタウ依存的な神経障害を引き起こす分子基盤の全容解明**を目的とした。この目的を達成するため、特に、以下の2点について焦点を当て研究を遂行した。

- (1) 脳内の A β エコノミーの分子基盤の解明
- (2) 脳内で A β -タウカスケードのトリガーとなる毒性 A β 分子種を同定し、毒性 A β 分子種がタウの病原性獲得を惹起する分子機構の解明

3. 研究の方法

- (1) 本研究に使用したマウス

本研究において APP tg マウスとして A7 系統及び APP/PS1 系統を使用した。A7 系統はマウス Thy1.2 プロモーター下で *Swedish* 型及び *Austrian* 型変異を持つヒト APP695 (K670N/M671L/T714I) を過剰発現する tg マウス (Yamada, *et al*, *J Neurosci*, 2009)であり、APP/PS1 系統はマウスプリオンプロモーター下で *Swedish* 型変異を持つヒト/マウスキメラ APP695 と exon 9 を欠損させた変異型 presenilin 1 を過剰発現する tg マウスである (Jankowsky, *et al*, *Hum Mol Genet*, 2004)。ヒト apoE3 KI マウスはマウス *APOE* 遺伝子 exon 2 の 19bp 以降をヒト *APOE3* 遺伝子に置換したマウスを使用した (Hamanaka, *et al*, *Hum Mol Genet*, 2000)。CLAC-P tg マウスはマウス Thy1.2 プロモーター下でヒト CLAC-P を過剰発現する tg マウスを使用した。

- (2) 脳組織からの生化学的抽出実験

APP tg マウス脳、あるいは AD 患者脳 TBS 可溶画分は、脳組織をプロテアーゼ阻害剤を添加した 10 倍容の TBS 中でホモジェナイズし、100,000 xg で超遠心した上清を用いた。ゲル濾過カラム分離には Superdex75、あるいは Superdex75 increase カラムを利用した (Hashimoto, *et al*, *J Neurosci*, 2012)。

- (3) *in vivo* seeding 実験

In vivo seeding 実験は、3 ヶ月齢、あるいは 8-9 ヶ月齢の APP tg マウスを十分な麻酔下で脳定位固定装置に固定し、海馬 (AP-2.5 mm, LM +/-2.0 mm, DV -1.8 mm from Bregma)にサンプルを注入した (Hori, *et al*, *J Biol Chem*, 2015)。処置したマウスは断りがない限り 4 ヶ月後に脳を取り出し、免疫組織化学的に検討した。

- (4) *in vivo* microdialysis 実験

In vivo seeding 実験において、十分な麻酔下でマウスを脳定位固定装置に固定し、AP-2.8 mm, LM -0.5 mm, DV -1.3 mm from Bregma の位置に 37.5° の角度でダイアリスカニューレを埋め込んだ。2 日後 1,000 kDa カットオフ値の微小透析膜を挿入し、artificial CSF を灌流液として経時的に脳間質液を回収し、サンプル中の A β 濃度を ELISA 法で測定した。さらに reverse dialysis 法を用いて γ -secretase 阻害剤 compound E を灌流して脳間質液を回収し、サンプル中の A β 濃度を ELISA 法で測定し、A β 濃度の減少曲線から脳間質液中 A β の半減期を算出した (Yamamoto *et al*, *Cell Rep*, 2015)。

4. 研究成果

(1) APP_{tg} マウス脳において Aβ蓄積誘発能を持つ高分子量 Aβオリゴマー (peak 1 Aβ) の同定

これまで APP_{tg} マウス脳では、時空間的に Aβ蓄積が拡大することが知られていた。しかし、Aβ蓄積の誘発に関わる特定の Aβ分子種の実態は明らかではなかった。近年 AD 患者脳、あるいは APP_{tg} マウス脳のライセートを APP_{tg} マウスに接種すると、Aβ蓄積が誘発されることが明らかとなり、APP_{tg} マウス脳ライセート中に Aβ蓄積の”seed”となる Aβ分子種が存在する可能性が示唆された。そこで本研究ではまず豊富な Aβ蓄積を有する高齢の APP_{tg} マウス(A7 系統)脳の TBS 可溶画分をゲル濾過カラム (Superdex75) で分離し、Aβ特異 ELISA を用いて Aβの溶出パターンを検討した。その結果、約 200-300 kDa (peak 1 Aβ)、約 50-70 kDa (peak 2 Aβ)、約 10-20 kDa (peak 3 Aβ) の 3 つの異なる分子量のピークに Aβが溶出されることが分かった (図 1)。そこで、これらのピークに Aβ蓄積誘発能が存在するかを明らかにするため、APP_{tg} マウス脳海馬にサンプルを注入して、Aβ蓄積を評価する *in vivo* seeding 実験を行い検討した。その結果、peak 1 Aβを注入した APP_{tg} マウス脳海馬では、歯状回分子層に沿って特徴的な帯状の Aβ蓄積が出現することが分かった (図 2)。一方 peak 2 Aβを注入した APP_{tg} マウス脳海馬にはそのような Aβ蓄積は認められなかった。これらの結果から、peak 1 Aβ画分に Aβ蓄積誘発能が存在することが確かめられた。

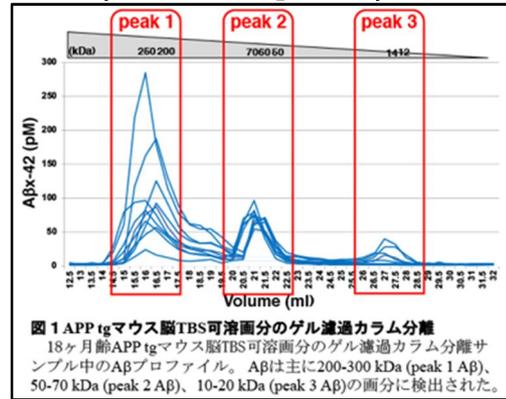


図 1 APP_{tg} マウス脳TBS可溶画分のゲル濾過カラム分離
18ヶ月齢APP_{tg}マウス脳TBS可溶画分のゲル濾過カラム分離サンプル中のAβプロファイル。Aβは主に200-300 kDa (peak 1 Aβ)、50-70 kDa (peak 2 Aβ)、10-20 kDa (peak 3 Aβ)の画分に検出された。

そこで peak 1 Aβ中に含まれる Aβが、Aβ蓄積の誘発に必要であるかを検討した。まず抗 Aβ抗体を用いた免疫除去実験を行った。peak 1 Aβ画分を抗 Aβ抗体 BAN50 と 4G8 で免疫除去後 *in vivo* seeding 実験を行ったところ、海馬に特徴的な Aβ蓄積は消失し、Aβ蓄積誘発能が減弱したことが分かった。さらに、高齢の野生型マウス脳から peak 1 Aβ画分と同様に 200-300 kDa の画分を調製し、*in vivo* seeding 実験を行った。しかし、海馬に特徴的な Aβ蓄積は認められなかった。これらの結果から、peak 1 Aβ画分中の Aβに Aβ蓄積誘発能があることが確かめられた。

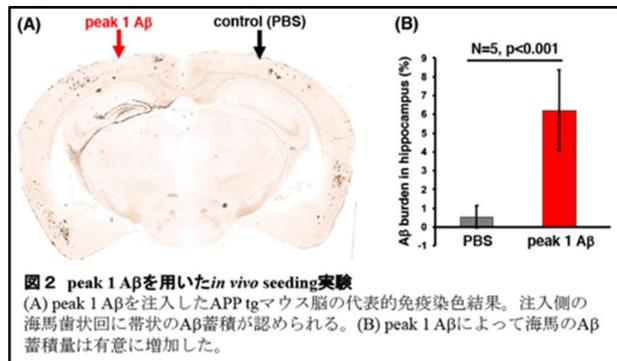


図 2 peak 1 Aβを用いた *in vivo* seeding 実験
(A) peak 1 Aβを注入した APP_{tg} マウス脳の大規模免疫染色結果。注入側の海馬歯状回分子層に帯状の Aβ蓄積が認められる。(B) peak 1 Aβによって海馬の Aβ蓄積量は有意に増加した。

次に、peak 1 Aβ画分中どのような Aβ分子種が存在するか検討を行った。単量体 Aβの分子量は約 4.5 kDa であることから、何らかのオリゴマー状態をとる Aβ分子種が存在することが予想された。そこで高齢 APP_{tg} マウス脳 TBS 可溶画分をゲル濾過カラム分離後、single-site sandwich ELISA 法による Aβオリゴマー特異 ELISA を用いて検討を行った。その結果 200-300 kDa の peak 1 Aβ画分に Aβオリゴマーが存在することが確かめられた。さらに、抗 Aβオリゴマー特異抗体を用いたドットプロット法により検討を行ったところ、peak 1 Aβ画分中に A11、及び OC 抗体陽性の Aβオリゴマーが存在することが分かった。これらの結果から peak 1 Aβ画分は Aβオリゴマーを含むことが確かめられた。

さらに、peak 1 Aβが脳内でどのような存在様式をとるのかにつき検討を行った。まず高齢 APP_{tg} マウス脳より peak 1 Aβ画分中の Aβ量を測定し、それぞれの海馬における Aβ蓄積面積と比較した。その結果、peak 1 Aβ画分中の Aβ量と海馬 Aβ蓄積面積には正の相関が認められた。さらに、1,000 kDa カットオフ値を持つ微小透析膜を用いた *in vivo* microdialysis 法を用いて、脳間質液中に peak 1 Aβが存在するかを検討すると、高齢 APP_{tg} マウス脳海馬の脳間質液中に peak 1 Aβは検出されなかった。これらの結果から peak 1 Aβ画分中の Aβは、脳内で Aβ斑上に存在する可能性が示唆された。

最後に、peak 1 Aβが Aβ蓄積を誘発する機序の検討を行った。まず peak 1 Aβを野生型マウス脳海馬に注入する *in vivo* seeding 実験を行ったところ、Aβ蓄積の誘発は認められなかった。このことから、Aβ蓄積の誘発には、ホストマウスにヒト型 Aβが発現していることが必要であると考えられた。さらに、peak 1 Aβを若齢の APP_{tg} マウス脳に注入し、2、4、6ヶ月後に脳内の Aβ量を生化学的に、不溶化した Aβの蓄積を免疫組織化学的に検討した。その結果、注入 2ヶ月後に海馬に Aβ蓄積が生じていることが確認され、SDS 不溶性 Aβ量も上昇し、これらは 6ヶ月後まで経時的に増大した (図 3)。一方海馬中の peak 1 Aβ画分中の Aβ量に有意な

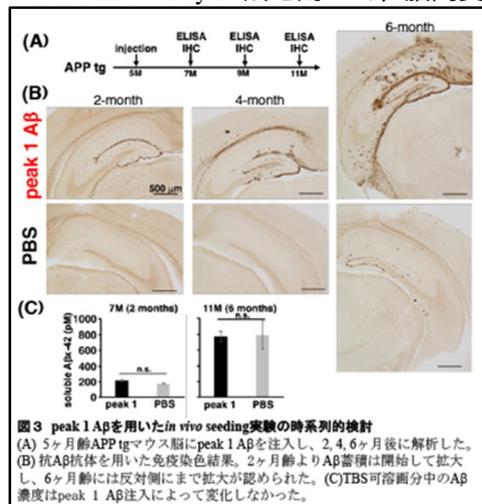


図 3 peak 1 Aβを用いた *in vivo* seeding 実験の時系列的検討
(A) 5ヶ月齢 APP_{tg} マウス脳に peak 1 Aβを注入し、2、4、6ヶ月後に解析した。(B) 抗 Aβ抗体を用いた免疫染色結果。2ヶ月齢より Aβ蓄積は開始して増大し、6ヶ月齢には反対側にまで拡大が認められた。(C) TBS 可溶画分中の Aβ濃度は peak 1 Aβ注入によって変化しなかった。

上昇は認められなかった。これらの結果から、peak 1 A β はプリオンのようにそれ自身が自己複製して増大するのではなく、APP tg マウス脳内の可溶性ヒト型 A β を不溶性に転換しつつ蓄積を増大させる可能性が考えられた。

以上の結果、本研究において APPtg マウス脳可溶画分中に存在し、A β 蓄積誘発能を有する peak 1 A β を同定した。今後 peak 1 A β の形成機序、存在様式、さらに病的意義を詳細に検討することにより、peak 1 A β を標的とした新規 AD 治療薬の開発に手掛かりが与えられると期待される。

(2) AD 患者脳における peak 1 A β の同定

(1)の検討により APPtg マウス脳内で A β 蓄積誘発能を有する peak 1 A β を同定した。そこで peak 1 A β が AD 患者脳内における老人斑蓄積に関与するかを明らかにするため、AD 患者脳中に peak 1 A β が存在するか否かを検討を行った。AD 患者脳 6 例及び高齢コントロール脳 6 例を用い、豊富に A β 蓄積を呈するブロードマン 8/9 野から TBS 可溶画分を抽出し、ゲル濾過カラムで分離後 A β ELISA を用いて A β の溶出パターンを検討した。その結果、AD 患者脳 6 例中 6 例で 200-300 kDa (peak 1 A β)、6 例中 3 例で約 10-20 kDa (peak 3 A β)、コントロール脳 6 例中 1 例で 200-300 kDa (peak 1 A β)、に A β が溶出されることが分かった (図 4)。そこで 3 例の AD 患者脳由来 peak 1 A β を用いて *in vivo* seeding 実験を行ったところ、3 例中 2 例で A β 蓄積誘発能が認められたが、1 例では認められなかった。これらの結果から、APPtg マウス脳と同様に AD 患者脳可溶画分にも 200-300 kDa の peak 1 A β が存在することが分かった。しかし、その A β 蓄積誘発能には差違が存在する可能性があり、今後さらに症例を増やし、A β 40、A β 42 などの A β 分子種の存在様式の差違に注目して検討を進める。

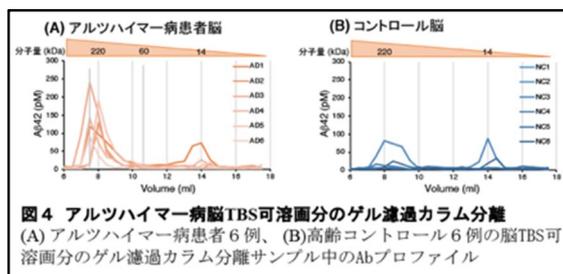


図 4 アルツハイマー病脳TBS可溶画分のゲル濾過カラム分離 (A) アルツハイマー病患者 6 例、(B)高齢コントロール 6 例の脳TBS可溶画分のゲル濾過カラム分離サンプル中のA β プロファイル

(3) ヒト apoE3 は A β の凝集・蓄積過程を抑制する

Apolipoprotein E (apoE)は脳内の脂質輸送を担うタンパク質であり、これまでに A β と相互作用し、AD 患者脳では老人斑に蓄積していることが知られている。さらに、ヒト APOE 遺伝子には ϵ 2, ϵ 3, ϵ 4 の 3 つのアミノ酸置換を伴う genetic variant が存在し、中でも ϵ 4 アレルは AD 発症の最も強い遺伝的危険因子であることが示されている。本研究では apoE が A β と相互作用して脳内の A β エコノミーを制御することにより、AD 発症に関与するとの仮説のもとに、ヒト apoE3 をノックインした apoE3 KI マウスを用い、APPtg マウス (APP/PS1 系統)と交配して検討を行った。9 ヶ月齢の APP tg 或いは apoE3 KI; APP tg マウス脳を免疫組織化学的に検討したところ、apoE3 KI; APP tg マウスでは著しく A β 蓄積量が減少することがわかった (図 5)。そこで、ヒト apoE3 が脳内の A β クリアランスに影響を与えた可能性を考え、*in vivo* microdialysis 法を用いて、脳海馬間質液中の A β 濃度及び半減期について検討を行った。しかし、APP tg 或いは apoE3 KI; APP tg マウスのいずれにおいても脳海馬間質液中の A β 濃度及び半減期は同程度であり、ヒト apoE3 とマウス apoE の A β クリアランスへの影響に差違はないものと考えられた。

次に、apoE3 が A β の凝集・蓄積過程に影響を与える可能性について、*in vitro* A β 凝集実験によって検討した。その結果、A β 単独に比べ、マウス apoE、ヒト apoE3 を添加すると、凝集は有意に抑制され、特にヒト apoE3 は、マウス apoE に比べより強く抑制することが分かった。さらに、apoE3 が seed 依存的な A β 蓄積過程に影響を与える可能性を考え、*in vivo* seeding 実験を用いて検討を行った。その結果、apoE3 KI; APP tg マウス脳海馬に peak 1 A β を含む高齢 APP tg マウス脳 TBS 画分を注入したところ、APP tg マウスに注入した場合と比べ、著しく A β 蓄積の誘発量が低下することが分かった。これらの結果から、ヒト apoE3 は A β の凝集・蓄積過程を抑制することによって、脳内の A β エコノミーに関与するものと考えた。今後 apoE2、apoE4 の作用についても同様に検討することによって、apoE が AD 発症に与える影響の全容が解明されるものと期待される。

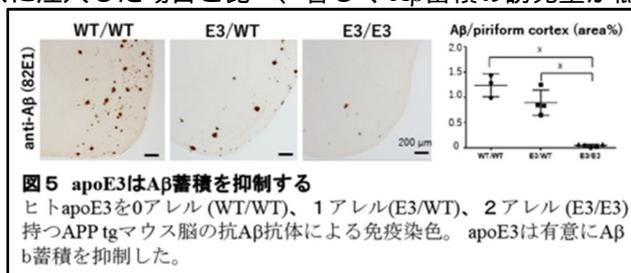


図 5 apoE3はA β 蓄積を抑制する
ヒト apoE3を0アレル (WT/WT)、1アレル (E3/WT)、2アレル (E3/E3) 持つ APPtg マウス脳抗 A β 抗体による免疫染色。apoE3は有意に A β 蓄積を抑制した。

(4) CLAC は A β 蓄積の成熟化因子である

CLAC (collagenous Alzheimer amyloid plaque component)は AD 脳老人斑アミロイド画分より同定されたタンパク質であり、これまでに老人斑に蓄積するが、 β -sheet 構造の乏しいびまん性老人斑や、アミロイドアンギオパチーには蓄積しないユニークな性質を示すことが知られていた (Hashimoto, *et al*, *EMBO J*, 2002)。本研究では CLAC が A β エコノミーに与える影響を明らかにするため、神経細胞に CLAC-P (CLAC precursor protein)を過剰発現する tg マウスを APP tg マウス

(A7 系統)と交配して検討した。18 ヶ月齢の APP tg 或いは APPxCLAC-P 二重 tg (dtg) マウス脳を免疫組織化学的に検討すると、APPxCLAC-P dtg マウス脳では、境界が不明瞭なびまん性 Aβ斑が消失し、境界が明瞭で中・小型サイズの Aβ斑が増加した(図 6)。そこで、β-sheet 構造と特異的に結合する thioflavin S 染色を行ったところ、APPxCLAC-P dtg マウス脳では、thioflavin S に陽性を呈する Aβ斑数が有意に増加することが分かった。これらの結果から、CLAC は Aβ斑をβ-sheet 構造の豊富な、より成熟した Aβ斑に変換させる成熟化因子である可能性が考えられた。

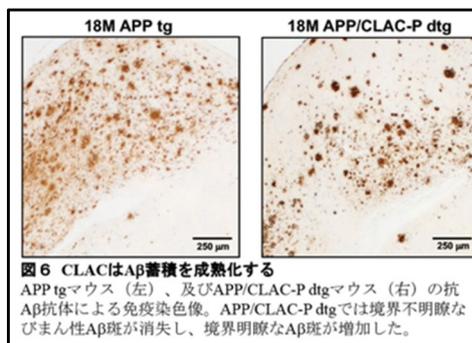


図 6 CLACはAβ蓄積を成熟化する
APP tgマウス(左)、及びAPP/CLAC-P dtgマウス(右)の抗Aβ抗体による免疫染色像。APP/CLAC-P dtgでは境界不明瞭なびまん性Aβ斑が消失し、境界明瞭なAβ斑が増加した。

次に、Aβ斑が脳内の可溶性 Aβに与える影響を明らかにするため、*in vivo* microdialysis 法を用いて APP tg マウス脳海馬間質液を回収して Aβ濃度を測定し、海馬 Aβ蓄積面積と比較した。その結果、間質液中の Aβ濃度と Aβ蓄積面積間に負の相関が示され、Aβ斑は脳間質液中から可溶性 Aβを引き抜くことが考えられた。さらに、APPxCLAC-P dtg マウス脳海馬間質液中の Aβ濃度は APP tg マウスに比べ有意に低く、成熟した Aβ斑は、より強く脳間質液中から可溶性 Aβを引き抜く可能性が示された。本研究において(1)の結果から peak 1 Aβが Aβ斑上に存在する可能性が示され、これらの結果から、Aβ線維の集合体である老人斑は、可溶性 Aβ分子種の貯留池としても働き、脳内の Aβエコノミーに影響を与える可能性が示唆された。

(5) 異常性獲得したタウを可視化・測定する新規実験系の作出

本研究項目では何らかの異常を獲得した Aβ分子種がタウの病原性獲得を惹起する分子機構の解明を目指した。そのために、神経細胞内で異常化したタウを検出する系として、次の 3 つの新たな実験系を作出し、タウが病原性を獲得する機序の解明を行った。

アデノ随伴ウイルスを用いたタウ RD 発現実験系

これまでに PHF のコア部分に相当するタウ反復ドメイン(tauRD)は *in vivo* でタウ蓄積の”seed”として働くことが分かっている。そこで、アデノ随伴ウイルスを利用し tauRD を神経細胞に過剰発現することが可能な AAV-tauRD を作出して検討を行った。AAV-tauRD を野生型マウスに発現させ免疫組織化学的に検討したところ、リン酸化タウ特異抗体 PHF1 陽性神経細胞の出現が認められた。今後 APP tg マウス脳に AAV-tauRD を発現させるなどの実験系を構築し、Aβ特異的なタウ異常性獲得機序の解明を行う。

ヒト神経芽細胞 ReN 細胞を用いた 3 次元培養実験系

ReN 細胞は、神経細胞へ分化可能なヒト神経芽細胞である。そこで、BRI タンパク質と融合させた Arctic 変異型 Aβを過剰発現する ReN 細胞を構築し、マトリゲル中で神経細胞へ分化させたところ、リン酸化タウ抗体陽性の神経突起を持つ神経細胞が出現することが分かった。さらに、神経細胞へ分化させた野生型 ReN 細胞へ APP tg マウス脳由来 peak 1 Aβを投与した際にも、リン酸化タウ抗体陽性の神経突起が観察された。今後 Aβが ReN 細胞の内因性タウのリン酸化を亢進させるメカニズムを検討する。

bi-molecular luciferase complementation assay を利用したタウ重合測定実験系

タウの凝集性獲得を評価するため、bi-molecular luciferase complementation assay を利用し、*Gaussia* luciferase のアミノ末端、又はカルボキシ末端断片と融合した tauRD を発現する HEK293 細胞を構築し、タウ重合が生じると発光を呈する実験系を作出した。本実験系にタウ seed を添加すると発光を呈することが確かめられ、タウの凝集性獲得機序解明への活用が期待される。

< 引用文献 >

- Yamada K, Yabuki Y, Seubert P, *et al*, Aβ immunotherapy: Intracerebral Sequestration of Aβ by an anti-Aβ monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble Aβ. *J Neurosci*, 2009, 29, 11393-11398
- Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, *et al*, Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β-amyloid peptide *in vivo*: evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet*, 2004, 13, 159-170
- Hamanaka H, Katoh-Fukui Y, Suzuki K, *et al*, Altered cholesterol metabolism in human apolipoprotein E4 knock-in mice. *Hum Mol Genet*, 2000, 9, 353-361
- Hashimoto T, Serrano-Pozo A, Hori Y, *et al*, Apolipoprotein E, especially apolipoprotein E4, increases the oligomerization of amyloid β peptide. *J Neurosci*, 2012, 32, 15181-15192
- Hori Y, Tadafumi H, Nomoto H, *et al*, Role of apolipoprotein E in β-amyloidoogenesis: Isoform-specific effects on protofibril to fibril conversion of Aβ *in vitro* and brain Aβ deposition *in vivo*. *J Biol Chem*, 2015, 290, 15163-15174
- Yamamoto K, Tanei ZI, Hashimoto T, *et al*, Chronic optogenetic activation augments Aβ pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Cell Rep*, 2015, 11, 859-865
- Hashimoto T, Wakabayashi T, Watanabe A, *et al*, CLAC: a novel Alzheimer amyloid component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J*, 2002, 21, 1524-1534

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Mann David M. A., Davidson Yvonne S., Robinson Andrew C., Allen Nancy, Hashimoto Tadafumi, Richardson Anna, Jones Matthew, Snowden Julie S., Pendleton Neil, Potier Marie-Claude, Laquerri?re Annie, Prasher Vee, Iwatsubo Takeshi, Strydom Andre | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 Patterns and severity of vascular amyloid in Alzheimer ' s disease associated with duplications and missense mutations in APP gene, Down syndrome and sporadic Alzheimer ' s disease | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Acta Neuropathologica | 6. 最初と最後の頁 569 ~ 587 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00401-018-1866-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Bannai Taro, Mano Tatsuo, Chen Xigui, Ohtomo Gaku, Ohtomo Ryo, Tsuchida Takeyuki, Koshi-Mano Kagari, Hashimoto Tadafumi, Okazawa Hitoshi, Iwatsubo Takeshi, Tsuji Shoji, Toda Tatsushi, Iwata Atsushi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Chronic cerebral hypoperfusion shifts the equilibrium of amyloid oligomers to aggregation-prone species with higher molecular weight | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 2827 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39494-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Tomoko Wakabayashi, Kazuki Yamaguchi, Kentaro Matsui, Toshiharu Sano, Tetsuya Kubota, Tadafumi Hashimoto, Ayako Mano, Kaoru Yamada, Yuko Matsuo, Naoto Kubota, Takashi Kadowaki, Takeshi Iwatsubo | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Differential effects of diet- and genetically-induced brain insulin resistance on amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer ' s disease. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Neurodegeneration | 6. 最初と最後の頁 15 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13024-019-0315-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Miki Eto, Tadafumi Hashimoto, Takao Shimizu, Takeshi Iwatsubo | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Characterization of the unique in vitro effects of unsaturated fatty acids on the formation of amyloid fibrils | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 PLoS ONE, | 6. 最初と最後の頁 e0219465 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0219465 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Tanaka Y, Yamada K, Satake K, Nishida I, Heuberger M, Kuwahara T, Iwatsubo T | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Seeding activity-based detection uncovers the different release mechanisms of seed-competent tau versus inert tau via lysosomal exocytosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 1258 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2019.01258 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Haruka Munezane, Hiroaki Oizumi, Tomoko Wakabayashi, Shu Nishio, Tomoko Hirasawa, Takashi Sato, Akihiro Harada, Tomoyuki Yoshida, Takahiro Eguchi, Yuji Yamanashi, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Roles of collagen XXV and its putative receptors PTP / in intramuscular motor innervation and congenital cranial dysinnervation disorder | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 4362-4376 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.11.112 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 5件/うち国際学会 7件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Mayu Hakozaki-Kashiwagi, Yasushi Naka, Tomohiko Tajiri, Masashi Fukayama, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo |
| 2. 発表標題 Characterization of the seed Abeta oligomers in the brains of APP transgenic mice |
| 3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 粉川明日香、大野裕太郎、橋本唯史、岩坪威 |
| 2. 発表標題 ヒト型とマウス型apolipoprotein EがAbeta脳内dynamicsに与える影響の相違 |
| 3. 学会等名 第37回日本認知症学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 箱崎眞結、仲泰史、田尻智也、深山正久、橋本唯史、岩坪威 |
| 2. 発表標題 アミロイド斑蓄積のseedとして働く可溶性Abetaオリゴマーの同定 |
| 3. 学会等名 第37回日本認知症学会（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takeshi Iwatsubo |
| 2. 発表標題 Alzheimer's disease:from molecular pathology to prevention |
| 3. 学会等名 4th Federation of Asian-Oceanian neuroscience societies syposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩坪 威 |
| 2. 発表標題 アルツハイマー病：超早期の治療に向けて |
| 3. 学会等名 第52回日本成人病（生活習慣病）学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tadafumi Hashimoto, Yasushi Naka, Tomoya Tajiri, Mayu Hakozaiki-Kashiwagi, Takeshi Iwatsubo |
| 2. 発表標題 Characterization of the high molecular weight Abeta oligomers derived from the brains of APP transgenic mice |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Asuka Kokawa, Yutaro Ohno, Tadafumi Hashimoto, Takeshi Iwatsubo |
| 2. 発表標題 Differential effects of human and mouse apolipoprotein E on the metabolism and aggregation of amyloid-beta peptides |
| 3. 学会等名 Neuroscience2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 岩坪威 |
| 2. 発表標題 アルツハイマー病の超早期治療と予防 |
| 3. 学会等名 第30回日本医学会総会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 岩坪威 |
| 2. 発表標題 アルツハイマー病基礎研究の進歩 |
| 3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岩坪威 |
| 2. 発表標題 アルツハイマー病の予防・治療薬開発に向けて：研究の現況と社会・学術連携 |
| 3. 学会等名 日本学術会議 学術フォーラム「認知症 予防と共生に向けて学術の取り組み（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tadafumi Hashimoto, Yasushi Naka, Kashiwagi-Hakozaki Mayu, Tomoya Tajiri, Takeshi Iwatsubo |
| 2. 発表標題 Soluble high-molecular weight oligomers of amyloid-beta peptide derived from the brains of APP transgenic mice induce cerebral amyloid-beta deposits |
| 3. 学会等名 Neuroscience2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 山田 薫 (Yamada Kaoru) (00735152) | 東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教 (12601) | |
| 研究分担者 | 若林 朋子 (Wakabayashi Tomoko) (20530330) | 東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任助教 (12601) | |
| 研究分担者 | 橋本 唯史 (Hashimoto Tadafumi) (30334337) | 東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・特任准教授 (12601) | |