

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10297

研究課題名(和文) タウオリゴマーの伝搬と神経毒性メカニズムの解明

研究課題名(英文) The propagation of tau oligomers and the neurotoxicity

研究代表者

今村 恵子(keiko, Imamura)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点講師

研究者番号：90379652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病や前頭側頭型認知症の一部の患者脳では、大脳萎縮と共に異常なタウタンパク質の凝集がみられる。本研究では、タウタンパク質が凝集して形成されるタウオリゴマーの神経毒性とその伝播に注目した。前頭側頭葉変性症iPS細胞由来神経細胞において、細胞外タウオリゴマーが神経毒性を来すことを示し、神経活動依存的にその毒性が伝播している可能性が示された。さらに、タウオリゴマー蓄積と神経細胞死を抑制する化合物を同定した。また、タウの点鼻ワクチンが、前頭側頭葉変性症モデルマウスに有効であることを報告した。本研究では、タウオリゴマーの伝搬と神経毒性メカニズムに基づく治療アプローチの可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウタンパク質の折り畳み異常が、タウタンパク質凝集の早期段階であると考えられ、特に複数個のタウタンパク質が凝集して形成されるタウオリゴマーが強い神経毒性を有していると考えられている。本研究では、タウオリゴマーが、どのように神経毒性を発揮し、細胞から細胞への毒性伝搬に関連しているかを明らかにした。また、候補化合物やワクチンの有効性を見出し、タウオリゴマーの伝搬と神経毒性メカニズムに基づく治療アプローチの可能性を示した。本研究は超少子高齢社会における高齢者の認知症予防に貢献し、医学的・社会経済的にも高度の意義を有すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Abnormal tau protein aggregation along with cerebral atrophy is important pathological characteristics in the brains of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. In this study, we focused on the neurotoxicity of tau oligomers and their propagation. Extracellular tau oligomers caused neurotoxicity in neurons derived from FTLD-patient iPS cells, and the results indicated that the toxicity was propagated in a neural activity-dependent manner. Furthermore, we identified compounds that inhibited tau oligomer accumulation and neuronal cell death. We also reported that an intranasal tau vaccine was effective in FTLD mouse model. We explored potential therapeutic approaches based on the neurotoxic mechanisms of tau oligomers and their propagation.

研究分野：神経科学

キーワード：タウ タウオリゴマー 前頭側頭葉変性症 iPS細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病や前頭側頭型認知症の一部の患者脳では、大脳萎縮と共に異常なタウタンパク質の凝集がみられる。タウタンパク質の異常リン酸化や折り畳み異常が、タウタンパク質凝集の早期段階であると考えられ、特に複数個のタウタンパク質が凝集して形成されるタウオリゴマーが強い神経毒性を有していると考えられている 1)。また、異常タウタンパク質が蓄積するモデルマウスでは、電気生理学的に神経興奮性の亢進が示されている 2)。近年、神経変性疾患における細胞間の異常タンパク質伝搬が注目されており、異常タウタンパク質が細胞から細胞へ伝搬すると考えられている。前頭側頭型認知症モデルマウスを用いた実験で、タウタンパク質は神経活動依存的に細胞外へ放出され、神経活動が異常タウタンパク質の伝搬に関与していることが示されている 3)。これらの知見から、神経変性と神経活動は密接に関係していると考えられる。

我々は、これまで、疾患特異的 iPS 細胞を用いて、異常タウタンパク質の蓄積を伴う前頭側頭型認知症の研究を行ってきた 4)。前頭側頭型認知症患者由来 iPS 細胞から作製した神経細胞では、異常タウタンパク質、特にタウオリゴマーが細胞内および細胞外に蓄積し、細胞死を来しやすいことを証明した。また、前頭側頭葉変性症神経細胞は、カルシウム調節異常を示し、神経活動を模した電気刺激によって細胞内カルシウム量の異常増加を呈し、神経細胞興奮性の亢進が示唆された。また、神経活動の抑制により、細胞内および細胞外タウオリゴマーの蓄積が減少し、細胞死が抑制されることを示し、神経細胞の変性に神経活動が密接に関連していることを示した。本研究では、異常タウタンパク質、特に神経毒性が強いと考えられるタウオリゴマーが、どのように神経毒性を発揮し、細胞から細胞への毒性伝搬に関連しているかに注目した。

2. 研究の目的

近年、神経変性疾患における細胞間の異常タンパク質伝搬が注目されており、異常タウタンパク質が細胞から細胞へ伝搬すると考えられている。前頭側頭型認知症モデルマウスを用いた実験で、タウタンパク質は神経活動依存的に細胞外へ放出され、神経活動が異常タウタンパク質の伝搬に関与していることが示されている。また、細胞外のタウオリゴマーが、LTP を抑制し、認知機能悪化に関与することが示されている 5)。我々は、細胞外のタウオリゴマーに注目し、細胞外タウオリゴマーがどのように神経毒性を発揮するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 大脳皮質神経細胞の作製

コントロール iPS 細胞および MAPT 変異を有する前頭側頭葉変性症 iPS 細胞から大脳皮質神経細胞を作製した。具体的には、iPS 細胞に PiggyBac ベクターを用いて、テトラサイクリン誘導下に転写因子 Neurogenin2 を発現するコンストラクトを導入した。薬剤耐性遺伝子を用いて、ベクターが導入された iPS 細胞を株化した。ドキシサイクリンを添加して神経細胞培地用いて培養することによって大脳皮質神経細胞を作製した。

(2) タウオリゴマーの検出と測定

iPS 細胞由来神経細胞の培養上清および細胞 lysate 中のタウオリゴマー量について、抗タウオリゴマー抗体(TOC1 抗体)を用いて、dot blot、Western blot、ELISA により検出し、測定した。

(3) 神経細胞死評価

免疫染色を行い、InCell 6000 を用いて染色画像を取得し、神経細胞数を定量化することによ

って神経細胞死評価を行った。

(4) 神経活動評価

微小電極アレイ (MEA) を用いて、電気生理学的に iPS 細胞由来神経細胞の神経活動を測定した。

4. 研究成果

コントロール iPS 細胞および前頭側頭葉変性症 iPS 細胞から大脳皮質神経細胞を作製し、細胞 lysate および培養上清のタウオリゴマーを測定したところ、前頭側頭葉変性症 iPS 細胞由来神経細胞内およびその培養上清中にタウオリゴマーの蓄積を認めた。また、前頭側頭葉変性症 iPS 細胞由来神経細胞では神経活動の亢進が認められた。そこで、リコンビナントタウ蛋白からタウオリゴマーを作製し、コントロール iPS 細胞由来神経細胞に添加したところ、神経活動性の更新と神経細胞死を認めた。一方、神経活動を抑制すると神経細胞死が抑制された。以上から、細胞外のタウオリゴマーが神経活動亢進を来すこと、神経細胞毒性を呈することが示された。さらに、これらの結果を踏まえて、神経細胞障害性を抑制する治療薬を探索するため、化合物スクリーニングを実施した。前頭側頭葉変性症患者 iPS 細胞由来神経細胞を用いて、タウオリゴマー形成抑制を標的とするスクリーニング、異常神経興奮抑制を標的とするスクリーニング、神経細胞死抑制を標的とするスクリーニングを実施した。結果として、神経細胞死を抑制する化合物を治療薬候補として同定することに成功した。さらに、この化合物が前頭側頭葉変性症患者 iPS 細胞由来神経細胞に蓄積しているタウオリゴマーを減少させることを見出した。

また、細胞外タウを治療標的とする治療法を探索した。変異型タウ蛋白を細胞外に分泌するように設計したセンダイウイルスベクターを作製した。このベクターを 293T 細胞に導入したところ、細胞内および細胞上清中のタウオリゴマーが増加することを確認した。そこで、このベクターをタウオパチーモデルマウスに投与し、ワクチンの効果を検討した。点鼻投与によるワクチンにより、タウオパチーモデルマウスの脳において、抗タウ抗体価の上昇、タウ蛋白蓄積の減少、グリア炎症の改善が示された。また、脳 MRI で観察される脳萎縮と PET で観察される脳内炎症の改善を認め、さらに行動試験における認知機能障害の改善を認めた。これらの結果から、細胞外タウを主に標的とするタウワクチンは、タウオパチーモデルマウスの病態抑制に有効であることが示された。

<引用文献>

- 1) Castillo-Carranza, et al. Passive immunization with Tau oligomer monoclonal antibody reverses tauopathy phenotypes without affecting hyperphosphorylated neurofibrillary tangles. *J Neurosci* 34, 4260-4272 (2014)
- 2) Crimins, J. L., et al. Electrophysiological changes precede morphological changes to frontal cortical pyramidal neurons in the rTg4510 mouse model of progressive tauopathy. *Acta Neuropathol* 124, 777-795, (2012)
- 3) Wu, J. W. et al. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci*, 19, 1085-92 (2016)
- 4) Imamura, K., et al. Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLΔ patient iPSC-derived neurons. *Sci Rep* 6, 34904 (2016)
- 5) Fa, M., et al. Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Sci Rep* 6, 19393 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hiroki Takeuchi, Keiko Imamura, Bin Ji, Kayoko Tsukita, Takako Enami, Keizo Takao, Tsuyoshi Miyakawa, Masato Hasegawa, Naruhiko Sahara, Nobuhisa Iwata, Makoto Inoue, Hideo Hara, Takeshi Tabira, Maiko Ono, John Q Trojanowski, Virginia M-Y Lee, Ryosuke Takahashi, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi, Haruhisa Inoue	4. 巻 5
2. 論文標題 Nasal Vaccine Delivery Attenuates Brain Pathology and Cognitive Impairment in Tauopathy Model Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NPJ Vaccines	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1038/s41541-020-0172-y.	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 該当する

1. 著者名 Taro Yasumoto, Yusaku Takamura, Mayumi Tsuji, Takahiro Watanabe-Nakayama, Keiko Imamura, Haruhisa Inoue, Shiro Nakamura, Tomio Inoue, Atsushi Kimura, Satoshi Yano, Hisao Nishijo, Yuji Kiuchi, David B Teplow, Kenjiro Ono	4. 巻 33
2. 論文標題 High molecular weight amyloid 1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 9220-9234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1096/fj.201900604R.	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiko Imamura, Naruhiko Sahara, Haruhisa Inoue
2. 発表標題 Oligomeric tau contributes to neurodegeneration in FTLT patient iPSC-derived neurons
3. 学会等名 第40回神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Keiko Imamura, Naruhiko Sahara, Haruhisa Inoue
2. 発表標題 Neuronal activity modulates oligomeric tau-mediated neurodegeneration in FTLT-Tau neurons
3. 学会等名 XXIII World Congress of Neurology（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 タウオパチーの予防又は治療剤	発明者 井上治久、今村恵子	権利者 京都大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-194758	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----