

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07598

研究課題名(和文) 認知症の神経変性機序における異常蛋白質重合と炎症反応の関与

研究課題名(英文) Involvement of abnormal protein aggregation and inflammation in neurodegenerative processes of dementia

研究代表者

田中 稔久(Tanaka, Toshihisa)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：10294068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：内因性アポトーシス抑制因子IAPs (inhibitor to apoptosis proteins)と認知症脳内に蓄積する重合性蛋白との相互作用を検討し、単体において両者が結合すること、さらに重合化した蛋白にも前者は結合することを確認した。さらに、*in vitro*においてこの結合体にCaspase-1を添加したところ、Caspase-1はこれと結合し、自己切断(活性化)することが確認された。さらに、Caspase-1を活性化したことで炎症性反応が誘導される可能性が示唆された。以上より、細胞内凝集体が脳内炎症を誘導する機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症性疾患はその神経変性の過程に慢性の炎症反応があるという報告が多いが、どのような機序で炎症が惹起されるかに関しては、不明な点が多い。そして、認知症脳に認められる細胞内蛋白凝集体形成は、凝集性蛋白のオリゴマー状態での毒性を抑制するために集積されるという生体の防衛反応的意味で理解されることが多い。本研究は、細胞内蛋白凝集体がIAPsやCaspaseとの結合を介して、炎症性反応を誘導する可能性を示唆したものである。

研究成果の概要(英文)：Interaction between intrinsic inhibitor to apoptosis proteins (IAPs) and aggregative proteins usually accumulated in demented brain, was investigated. Both proteins were shown to be bound, and the complex was also shown to bind with caspase-1, *in vitro*. In addition, caspase-1 was activated by the binding, therefore, intracellular inflammatory processes might be induced by the whole aggregative protein products through activation of caspase-1.

研究分野：認知症

キーワード：タウ 認知症 炎症

1. 研究開始当初の背景

我々は今まで臨床上多くのアルツハイマー病(Alzheimer disease : AD)および前頭側頭型認知症(Frontotemporal dementia :FTD)患者に対して診断と治療をおこなってきており、またか家族性を疑われる AD、FTD 患者に対しては、APP、PS-1、タウなどの遺伝子解析を行ってきた。また、我々はタウ蛋白の分解や重合過程、アポトーシスとの関係を中心に基礎医学的検討を行ってきた。我々は、AD および FTD のような緩徐進行性の神経変性疾患は、アポトーシス促進因子と抑性因子との拮抗状態から説明できるのではないかと考えて、アポトーシス抑性因子 XIAP(X-linked inhibitor to apoptosisprotein) に注目して検討を行ってきた(Kato K et al. Psychogeriatrics. 11:90-97,2011)。また、神経細胞内に豊富に存在する 14-3-3 蛋白にも注目し、14-3-3 蛋白が比較的低濃度のタウ蛋白を自己重合させることが可能であること、タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性は Ser214 リン酸化によって著しく亢進すること、しかしタウ蛋白の自己重合はタウ蛋白の Ser214 リン酸化によって阻害されることなどを報告してきた (Sadik G, et al. J Neurochem. 108 :33-43,2009)。また、我々は AD 脳における慢性炎症性変化が自然免疫の機序を介する可能性を想定して、主に Toll-Like receptor 3 (TLR3)を中心に検討し、アミロイド蛋白が TLR3 を誘導すること、TLR3 リガンドである pIpC によってタウ蛋白リン酸化が亢進すること、アミロイド Tg マウスにおいて TLR3 発現が亢進していることなどを報告してきた (Nessa BN,et al. Psychiatry Clin Neurosci. 60 Suppl 1:S27-33,2006.)。以上のような流れの中で、以前より慢性炎症機序が疾患の背景として推定されている認知症において、どのような機序で炎症が起きるのかに関していくつかの病態仮説を持っていたが、今回重合性蛋白と炎症の関係に関するメカニズムの解明に関して着手することにした。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎えた現在、認知症の病態メカニズムの解明とそれにもとづく早期診断・治療法の開発は緊急の課題である。神経変性性認知症の中では AD に次いで FTD も数は多く、その対応への重要性は増大している。家族性 FTD では、1998 年に 17 番染色体に存在するタウ遺伝子変異により引き起こされることが報告され、さらに 2006 年には FTD および筋萎縮性側索硬化症患者脳内に蓄積するユビキチン化蛋白質の主成分が TDP-43 であることが報告され、家族性 ALS/FTD 原因遺伝子としてもこの TDP-43 遺伝子変異も報告された。

今まで我々は内因性アポトーシス抑性因子 XIAP とタウ蛋白との相互作用を検討しており、それを契機に内因性アポトーシス抑性蛋白群 IAPs (inhibitor to apoptosis proteins)とタウ蛋白、TDP-43 との相互作用を検討してきた。そして我々は、予備的実験からタウ蛋白および TDP-43 の切断された断片が内因性抗アポトーシス蛋白 XIAP の有する BIR (Bacurivirus inter-repeat) ドメインと結合することを見出した。最近の免疫学の発展の中でインフラマソームが注目されているが、これは細胞内における複合体形成を機序に Caspase-1 が活性化し、それによって NF- κ B などの放出が誘導されるというものである。今回我々が注目した IAPs の中の cIAP1 はカスパーゼとの結合に重要な BIR 領域および CARD 領域、ユビキチンリガーゼとして機能する RING 領域を有している。そこで、細胞内凝集体形成が疑似的なインフラマソームを形成して炎症反応を惹起するという仮説を検討することにした。

3. 研究の方法

I cIAP1 と重合蛋白の結合特異性の検討と重合体の *in vitro* モデルの構築

まず、部分欠失型タウ (Met (2-441)) および部分欠失型 TDP-43 (90-414) が IAPs と結合することを検討した。それぞれ全長型と部分欠失型タウ (Met (2-441))、全長型 TDP-43 と部分欠失型 TDP-43 (90-414) のリコンビナント蛋白 (それぞれ C 末端に His タグ付き) を作成し、それと cIAP1 との結合親和性に関してニッケルレジンを用いて pull-down assay にて検討した。全長型と部分欠失型の cIAP1 に対する結合親和性の被殻においては、どちらも部分欠失型の蛋白が cIAP1 と結合した。

次に、全長型および部分欠失型タウ蛋白をヘパリン存在下で凝集させ、その凝集体と XIAP と cIAP1 との結合親和性を pull-down assay にて検討した。さらに、各凝集体に cIAP1 と Caspase-1 を添加し、Caspase-1 の活性化 (自己切断) に関して検討を行った。対照実験としては、cIAP1 を添加しないもの、cIAP1 の代わりに XIAP (CARD 領域を有しないため Caspase-1 をリクルートできない) を添加したもの等を用いた。

II 細胞内炎症プロセスを誘導する凝集体形成細胞モデルの検討

HEK293T 細胞にタウ遺伝子を導入しタウ高発現培養細胞株とした HEK293T (Tau) に、さらに GST-Tag 付き cIAP1 を一過性発現させ、細胞を溶解してこれをグルタチオンレジンを混和して

遠心し、結合する蛋白にタウがあるかどうかを検討した。また、タウ高発現培養細胞株とした HEK293T (Tau) に、試験管内で重合されたリコンビナントタウ蛋白を重合シードとして Lipofectamin にて細胞内に導入し、細胞内で重合を加速させ、細胞内の凝集体に cIAP1 および Caspase-1 が凝集体に取り込まれるかどうかについて検討した。そして、この状態で、Caspase-1 が活性化 (自己切断) しているかどうかに関して検討を行った。

4. 研究成果

I cIAP1 と重合蛋白の結合特異性の検討と重合体の in vitro モデルの構築

まず、部分欠失型タウ (Met (2-441)) および部分欠失型 TDP-43 (90-414) が IAPs と結合することを検討したところ、全長型と部分欠失型のタウおよび TDP-43 の XIAP および cIAP1 に対する結合親和性の比較においては、どちらも部分欠失型の蛋白が XIAP および cIAP1 と結合した。

次にタウ蛋白 (全長型および部分欠失型) をヘパリンによって凝集させ、その凝集体と XIAP と cIAP1 との結合親和性を pull-down assay にて比較検討したところ、部分欠失型の方に多く XIAP と cIAP1 は一緒に沈降した。また、タウ蛋白 (全長型および部分欠失型) の各凝集体に cIAP1 と Caspase-1 の両方を添加し、その結合親和性を pull-down assay にて検討したところ、部分欠失型の方に cIAP1 と Caspase-1 は一緒に沈降した。よって部分欠失型タウ蛋白の凝集体は cIAP1 および Caspase-1 と複合体を形成することが示唆された。

最後に Caspase-1 の活性化 (自己切断) に関して検討を行った。対照実験としては、cIAP1 を添加しないもの、cIAP1 の代わりに XIAP (CARD 領域を有しないため Caspase-1 をリクルートできない) を添加したもの等を用いた。組み合わせの中で、部分欠失型タウ蛋白の凝集体に cIAP1 の存在下で Caspase-1 を添加した場合の方が、Caspase-1 の自己切断が多く認められた。

II 細胞内炎症プロセスを誘導する凝集体形成細胞モデルの検討

HEK293T 細胞にタウ遺伝子を導入しタウ高発現培養細胞株とした HEK293T (Tau) に、さらに GST-Tag 付き cIAP1 を一過性発現させ、細胞を溶解してこれをグルタチオンレジンと混和して遠心し、結合する蛋白にタウがあるかどうかを検討したところ、沈降するレジン側にタウは認められた。また、タウ蛋白を重合シードとして Lipofectamin にて HEK293T (Tau) 細胞内に導入し、3日間経過させたところ細胞内で重合したタウが認められた。細胞を溶解し、その、細胞内の凝集体を超遠心にて回収し cIAP1 および Caspase-1 が凝集体に取り込まれるかどうかについて検討したところ、沈降する側に cIAP1 と Caspase-1 が存在し、またその Caspase-1 は活性化 (自己切断) していた。以上より、細胞内におけるタウの凝集体が炎症反応を起動させる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda K, Katayama S, Arai T, Furuta N, Ikebe S, Ishida Y, Kanaya K, Ouma S, Sakurai H, Sugitani M, Takahashi M, Tanaka T, Tsuno N, Wakutani Y, Shekhawat A, Das Gupta A, Kiyose K, Toriyama K, Nakamura Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Efficacy, Safety, and Tolerability of Switching from Oral Cholinesterase Inhibitors to Rivastigmine Transdermal Patch with 1-Step Titration in Patients with Mild to Moderate Alzheimer's Disease: A 24-Week, Open-Label, Multicenter Study in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dement Geriatr Cogn Dis Extra.	6. 最初と最後の頁 302-318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000501364.	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 Azuma S, Kazui H, Kanemoto H, Suzuki Y, Sato S, Suehiro T, Matsumoto T, Yoshiyama K, Kishima H, Shimosegawa E, Tanaka T, Ikeda M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Cerebral blood flow and Alzheimer's disease-related biomarkers in cerebrospinal fluid in idiopathic normal pressure hydrocephalus.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychogeriatrics.	6. 最初と最後の頁 527-538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/psyg.12435.	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 田中稔久	4. 巻 30
2. 論文標題 アルツハイマー病以外の認知症疾患に対する治療薬開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 老年精神医学雑誌	6. 最初と最後の頁 624-632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kanemoto H, Kazui H, Suehiro T, Kishima H, Suzuki Y, Sato S, Azuma S, Matsumoto T, Yoshiyama K, Shimosegawa E, Tanaka T, Ikeda M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Apathy and right caudate perfusion in idiopathic normal pressure hydrocephalus: a case-control study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Geriatr Psychiatry.	6. 最初と最後の頁 453-462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/gps.5038.	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 田中稔久	4. 巻 21
2. 論文標題 現在考えられているアルツハイマー型認知症のメカニズムと薬物療法の可能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床精神薬理 21(1):3-18,2018.	6. 最初と最後の頁 3-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中稔久
2. 発表標題 アルツハイマー病に対する新規治療薬の開発の流れ
3. 学会等名 日本老年精神医学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中稔久
2. 発表標題 -認知症診断のトレンドとこつ- バイオマーカーの最近の動向
3. 学会等名 アルツハイマー病研究会第19回学術シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018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	森 康治 (Mori Kojiiji) (40775318)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------