

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591024
 研究課題名（和文） 認知症脳におけるタウ蛋白リン酸化・脱リン酸化酵素複合体に関する病態解析
 研究課題名（英文） Pathological study for a protein anchoring tau kinases and tau phosphatases in Alzheimer brain tissues
 研究代表者 川又 敏男（KAWAMATA TOSHIO）
 神戸大学・大学院保健学研究科・教授
 研究者番号：70214690

研究成果の概要（和文）：本研究は、アルツハイマー型あるいは前頭側頭型認知症患者脳に蓄積する細胞内封入体である神経原線維変化（タングル）の主成分であるタウ蛋白の代謝異常と細胞内信号伝達機構との関連解明を目的としている。研究の対象は、神経疾患を持たない正常高齢対照者群12例および孤発性アルツハイマー型認知症患者群13例、合計25症例の死後剖検ヒト脳組織であり、それらを形態学的、生化学的に解析した。正常脳でFKBP12分子やPTEN分子は神経細胞体、核内や樹状突起、軸索に顆粒状に多く分布することが明らかとなった。一方、AD脳組織でFKBP12やPTENは全体的に減少していたものの、角回・嗅内野・海馬体で多発するタングル、あるいは老人斑内外に出現する変性神経突起やスレッドと呼ばれる異常構造、一部の反応性アストログリアに多量に蓄積していることが判明した。以上の結果から、FKBP12あるいはPTENが神経細胞やアストログリアの細胞骨格構築に関与し、AD変性ニューロン内部では神経細胞核から細胞質あるいはタングルへの再分布・蓄積が明らかになると共に、それに続くPI3K信号伝達経路の異常、核の機能障害への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）： We investigated possible roles of abnormal intracellular signaling in the tau pathology in Alzheimer's disease (AD) for FKBP12 and the phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN), a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase known to be important in protein assembly, folding and transportation and a tumor-suppressor respectively by using Western blotting and microscopic analyses in postmortem brain tissues from elderly controls and the patients with AD. FKBP12-positive or PTEN-positive granules were located in the nucleus, the cytoplasm of cell bodies and the proximal portion of dendrites and axons in control brains. Reduced expression of FKBP12 or PTEN was seen in the remaining neurons, especially in the tangle-bearing neurons in AD. In addition, these molecules were redistributed in damaged neurons from the nucleus to the cytoplasm or to the neuritic pathology such as neuropil threads, degenerative neurites and intracellular tangles. Labeling of some reactive astrocytes around senile plaques was seen for FKBP12 or PTEN. Double labeling of tangles was observed either for PTEN and GSK3 β or for PTEN and MEK. Thus, our results suggest that FKBP12 or PTEN delocalized from the nucleus to the cytoplasm and to the tangles may cause a deregulation of PI3K pathway in the cytoplasm and may induce the nuclear dysfunction in AD neurons.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：痴呆、シグナル伝達、神経科学、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

日本社会の急激な高齢化とともに患者数が増加し、治療薬・治療法の開発が急務となっているアルツハイマー型認知症 (AD) のほぼ全ての患者あるいは前頭側頭型認知症 (FTD) など非アルツハイマー型認知症の一部患者の脳組織には、異常なタウ蛋白分子が重合し線維状に凝集したタングルが細胞内に形成され蓄積する。多数の病理解析報告から、タウ蛋白の代謝異常に引き続いて広く大脳皮質に神経細胞変性-神経細胞死が惹起され、認知症に到ると推定されている。AD 脳でタングル出現量は、患者の症状 (認知機能障害) や神経細胞死の脳内分布と良く相関する (Gomez-Isla, et al. *Ann Neurol* 1997)。しかし、タングルを形成せずに死滅する神経細胞が多いことや、タングル形成が神経細胞変性と直接関連しない可能性 (SantaCruz K, et al. *Science* 2005) も報告されている。また、最近一部の FTD 患者脳では TAR DNA-binding protein of 43kDa (TDP-43) が細胞質・核内に封入体を形成し神経細胞変性-神経細胞死に到る可能性が指摘されている (Neumann M, et al. *Science* 2006)。つまり、封入体形成の有無にかかわらず背景にある蛋白代謝異常から神経細胞変性-神経細胞死へと進行する病態メカニズムを解明することが、認知症治療戦略を考える上で重要な目標の一つである。

タウ分子の、チューブリン分子の重合調節および微小官の安定性調節という重要機能は、タウ分子内に豊富なセリン・スレオニン残基のリン酸化状態により制御されている。この重要機能ドメイン (微小官結合部位) のリン酸化状態を直接調節する複数の蛋白リン酸化酵素 PKN1 (Kawamata T, et al. *J Neurosci* 1998)、PKC、PKA、Casein Kinase-1 delta、および蛋白脱リン酸化酵素 PP1、PP2A、PP2B 等と細胞内で会合し scaffold 分子として機能する巨大な活性複合体 Centrosomal and Golgi PKN anchoring protein (CG-NAP) を我々は発見し (Takahashi M, et al. *J Biol Chem* 1999)、微小管の形成・伸長を介した細胞内物質輸送や細胞周期の制御機能との関連を明らかにしてきた (Fabbro M, et al. *Dev Cell* 2005; Takahashi M, et al. *Genes Cells* 2007)。そこで、タウ蛋白代謝に関連する活性複合体を介した細胞内情報伝達機構の破綻が神経細胞を変性・死滅へと導いている可能性があるという仮説の下、活性複合体の正常脳・認知症脳ニューロン内局在等の形態学的・生化学的解析を継続した。

2. 研究の目的

急増する変性型認知症患者の治療法・治療

薬剤開発に資するため、患者脳組織に生じる種々の病理変化のうち機能的に最も重要な病変である神経細胞変性-神経細胞死の病態メカニズムを解明することが研究の最終目標であり、この神経細胞変性に深く関連していると考えられる細胞内封入体形成の背景にある細胞内分子病理を明らかにすることが研究の全体構想である。その中で本研究は、アルツハイマー型あるいは前頭側頭型認知症患者脳に蓄積する細胞内封入体である神経原線維変化 (タングル) の主成分であるタウ蛋白の代謝異常と細胞内信号伝達機構との関連解明を目的とした。

3. 研究の方法

神経疾患を持たない正常高齢対照者群 12 例 (平均年齢 74.5±11.8 才) および弧発性アルツハイマー型認知症患者群 13 例 (平均年齢 76.8±9.1 才) の、合計 25 症例の死後剖検ヒト脳組織を用いて形態学的、生化学的に解析した。両群とも大脳の角回皮質を対象にウェスタンブロット解析を行って使用した抗体の特異性を検定し、イムノフィリン 12kD FK-binding protein (FKBP12) や腫瘍抑制因子 Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) など目的分子の蛋白量を評価した。また、同脳組織から複数の重要部位ブロック (角回、中心前・後回、上・中前頭回、上・中・下側頭回、扁桃核、嗅内野、海馬、基底核、視床、中脳、橋、延髄、小脳等) を切り出し 4℃ 下で可及的速やかにパラホルムアルデヒド固定を行った後、30μm 厚の凍結切片を作製して浮遊切片法により高感度免疫組織化学染色を実施した。1 次抗体には上記目的分子に対する特異抗体以外にも、リン酸化あるいは非リン酸化ニューロフィラメント、グリア線維性酸性蛋白、α あるいは β チューブリン、総タウ蛋白、部位特異的リン酸化タウ蛋白、リン酸化あるいは非リン酸化 MAPK キナーゼ (MEK)、リン酸化あるいは非リン酸化 Glycogen synthase キナーゼ (GSK3β)、補体蛋白 C4d 等に対する特異抗体を使用して、単染色あるいは共焦点レーザー顕微鏡による蛍光二重免疫染色を行い組織内・細胞内の局在および分子間の相互関係を検討した。

4. 研究成果

活性複合体に結合するタウ蛋白脱リン酸化酵素の一つとして推定されるカルシニューリンに相互作用する重要分子として、peptidyl-prolyl isomerase (PPIase) の一つ、FKBP12 が既に報告されている。FKBP12 は、近年 AD 進行に伴い増加するリン酸化タウ (pThr231) と結合し、その脱リン酸化を進めることが判明した PPIase、Pin1 のホモログでもあるため、正常対照高齢者あるいは

AD 患者の脳組織における病態を検討した。その結果、正常脳で FKBP12 は神経細胞体や樹状突起、軸索に多く分布し、とくに錐体細胞のような大型ニューロンの神経突起近位部、細胞体および核内に顆粒状に豊富に存在することが明らかとなった。一方、AD 脳組織で FKBP12 は全体的に減少していたものの、角回・嗅内野・海馬体で多発するタングル、あるいは老人斑内外に出現する変性神経突起やスレッドと呼ばれる異常構造、一部の反応性アストログリアに多量に蓄積していることが判明した (図 1)。これらのことから、FKBP12 はヒト脳において神経細胞やアストログリアの細胞骨格構築に関与し、AD 脳組織では変性ニューロン内部に生じる異常なタウ蛋白代謝に関連していることを明らかにした。

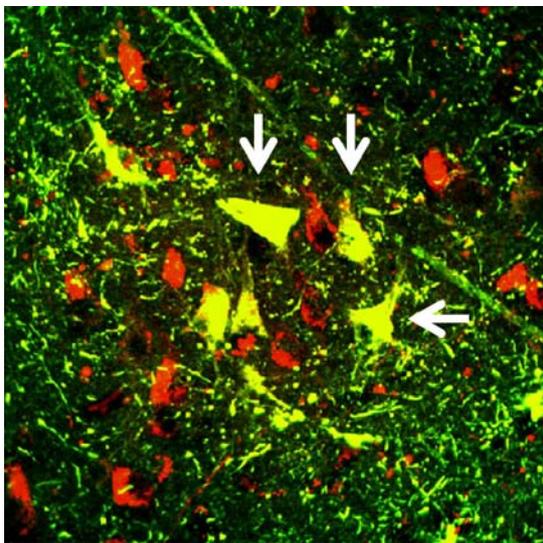


図 1. 共焦点レーザー顕微鏡による 2 重免疫蛍光染色 (AD 海馬) 結果。タウ陽性 (緑) の細胞内タングルには FKBP12 (赤) も蓄積しており、2 重標識 (黄、矢印) された。

また、ニューロンを含む脳組織の細胞生存に関与し、その信号伝達経路下流に多数のタウ蛋白リン酸化酵素が存在する Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 信号伝達経路について、機能的に PI3K と拮抗する上流因子、PTEN の脳内局在を検討した。PTEN は、重要な腫瘍抑制因子であると共に細胞の遊走・成長・生存・アポトーシスの調節因子でもあり、脳内 PTEN 欠損は海馬においてシナプスの構造・伝達・可塑性を障害することや、AD 脳組織での PTEN 減少や分布異常が示唆されていたが、微細なヒト脳内局在は不明だった。本研究の結果 PTEN は、正常脳で特に錐体細胞のような大型ニューロンの核、細胞質、頂上樹状突起近位部に多く分布し、AD 脳では全体に減少すると共にタングルを含む変性ニューロンでは核内から細胞質

内へ変位、再分布し、神経細胞内タングルや老人斑内部の変性突起、スレッドなどの異常構造に蓄積していた (図 2)。また、老人斑周囲にある一部の反応性アストロサイト内部のグリア線維にも蓄積していた。以上の結果から、AD 変性ニューロン内部では、PTEN の核から細胞質あるいはタングルへの再分布・蓄積が明らかになると共に、それに続く PI3K 信号伝達経路の異常、核の機能障害への PTEN の関与が示唆された。

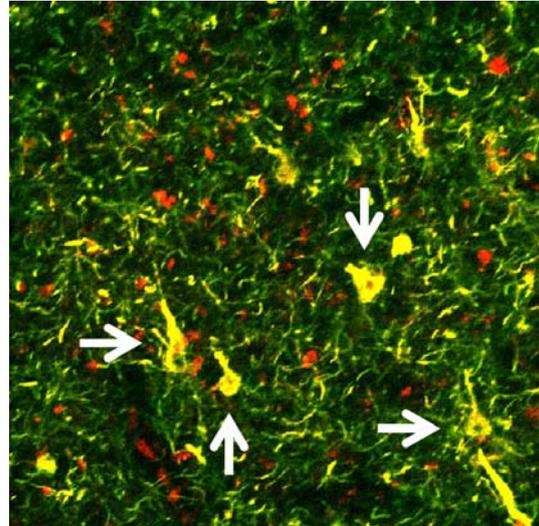


図 2. AD 患者の 2 重免疫蛍光染色結果。タウ陽性 (緑) の細胞内タングルや一部のニューロピル・スレッドには PTEN (赤) が蓄積し、2 重標識 (黄、矢印) されている。

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 6 件)

- ① Sonoda Y, Mukai H, Matsuo K, Takahashi M, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Accumulation of tumor-suppressor PTEN in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neuroscience Letters*, 471: 20-24, 2010.
- ② Ishii M, Kawamata T, Akiguchi I, Yagi H, Watanabe Y, Watanabe T, Mashimo H. Parkinsonian symptomatology may correlate with CT findings before and after shunting in idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Parkinson's Disease*, 2010: 1-7, article ID 201089, 2010.
- ③ Yamada M, Kawachi T, Kawamitsu H, Yamada T, Konisi J, Fujii M, Sugimura K, Maeda K, Kawamata T. Effect of perceptual learning on motor skills of

hands: A functional magnetic resonance imaging study. *Kobe Journal of Medical Sciences*, 56 (1): E29-E37, 2010.

- ④ Sugata H, Matsuo K, Nakagawa T, Takahashi M, Mukai H, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. A peptidyl-prolyl isomerase, FKBP12, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles. *Neuroscience Letters*, 459: 96-99, 2009.
- ⑤ Akamatsu T, Fukuyama H, Kawamata T. The effect of visual, auditory, and mixed cues on choice reaction in Parkinson's disease. *Journal of Neurological Sciences*, 269: 118-125, 2008.
- ⑥ Yanagi M, Hashimoto T, Kitamura N, Fukutake M, Komure O, Nishiguchi N, Kawamata T, Maeda K, Shirakawa O. Expression of Kruppel-like factor 5 gene in human brain and association of the gene with the susceptibility to schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 100: 291-301, 2008.

[学会発表] (計16件)

- ① Sonoda Y, Matsuo K, Takahashi M, Mukai H, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Association of protein kinase C delta with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain tissues. 40th Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, Nov. 14, 2010.
- ② Nojima I, Mima T, Fukuyama H, Kawamata T. Changes in corticomotor excitability following mirror therapy. 29th International Congress of Clinical Neurophysiology, Kobe, Dec. 29, 2010.
- ③ Wang Y, Tian Y, Kawamata T, Oda H, Maeda K. Assessment of memory impairment with Japanese version of everyday memory checklist in patients with early dementia and mild cognitive impairment. WPA International Congress Regular Symposium (RS-20) Diagnosis, treatment and management of dementia in Asian countries, Beijing, Sept. 1, 2010
- ④ Sonoda Y, Matsuo K, Takahashi M, Mukai H, Ono Y, Maeda K, Akiyama H, Kawamata T. Tumor suppressor PTEN is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain tissues. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, Dec. 18, 2009.
- ⑤ Akamatsu T, Fukuyama H, Kawamata T. The effects of single and mixed cues on choice reaction in Parkinson's disease. International Neuropsychological Society 2009 Mid-Year Meeting, Helsinki, July 31, 2009
- ⑥ Sugata H, Matsuo K, Takahashi M, Mukai H, Ono Y, Maeda K, Kawamata T. FKBP12 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain tissues. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington DC, Nov. 16, 2008.
- ⑦ 野 鷲一平、美馬達哉、小金丸聡子、Hamdoon MN、川又敏男 : Mirror therapyによる運動学習機序の検討、第45回日本理学療法学会、岐阜、2010年
- ⑧ 野 鷲一平、美馬達哉、大賀辰秀、川又敏男 : Mirror therapyにおける脳梁經由半球間連絡線維の役割 - Disconnection syndromeを呈する脳梁梗塞患者での検討 -、第50回近畿理学療法学会、和歌山、2010年
- ⑨ 野 鷲一平、美馬達哉、小金丸聡子、Hamdoon MN、福山秀直、川又敏男 : Mirror therapyによる皮質運動興奮変化、第4回Motor Control研究会、岡崎、2010年
- ⑩ 赤尾暢子、山崎郁子、川又敏男 : 能動的音楽活動が認知症高齢者の活動性に及ぼす影響、第41回日本芸術療法学会、仙台、10月4日、2009年
- ⑪ 野 鷲一平、永井圭介、奥野史也、大久保藍、川又敏男 : 脳卒中片麻痺患者一症例に対する行動観察アプローチ、第22回兵庫県理学療法士学会、加古川、7月12日、2009年
- ⑫ 石井光昭、得丸敬三、藤川孝満、田里博、秋口一郎、川又敏男 : 三軸加速度センサーによるパーキンソン病のすくみ足の解析、第44回日本理学療法学会、東京、5月、2009年
- ⑬ 坂元眞由美、塩谷英之、安藤啓司、山崎郁子、中村美優、川又敏男、小野成夫、傳秋光 : 重度認知症高齢者の愛唱歌による音楽療法の効果、第13回日本老年看護学会、金沢、11月8日、2008年
- ⑭ 中川泰介、菅田陽怜、松尾和彦、高橋美樹子、向井秀幸、小野功貴、前田潔、秋山治

彦、川又敏男：アルツハイマー病における PDK1 活性化の検討、第 27 回日本認知症学会、前橋、10 月 11 日、2008 年

- ⑮ 山田実、河内崇、川又敏男：注意機能トレーニングによって転倒を予防することが可能となるか？：地域在住高齢者における二重盲検比較対照試験（ランダム化比較試験（RCT））による理学療法介入のエビデンス、第 43 回日本理学療法学会、福岡、5 月、2008 年
- ⑯ 野島一平、奥野史也、前川匡、川又敏男：**mirror**を用いた運動学習の効果、第 43 回日本理学療法学会、福岡、5 月、2008 年

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川又 敏男 (KAWAMATA TOSHIO)
神戸大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70214690

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小野 功貴 (ONO YOSHITAKA)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・教授
研究者番号：10243297

向井 秀幸 (MUKAI HIDEYUKI)
神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授
研究者番号：80252758

高橋 美樹子 (TAKAHASHI MIKIKO)
帝京平成大学・薬学部・教授
研究者番号：90324938

前田 潔 (MAEDA KIYOSHI)
神戸学院大学・総合リハビリテーション学部・教授
研究者番号：80116251