

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591407

研究課題名 (和文) 認知症性疾患の神経変性メカニズムにおける RNA・蛋白相互作用の関与

研究課題名 (英文) Involvement of interaction between RNA and protein in neurodegenerative mechanisms in dementia

研究代表者

田中 稔久 (TANAKA TOSHIHISA)

大阪大学大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10294068

研究成果の概要 (和文)：神経変性過程における蛋白と RNA の相互作用の関与を明らかにする目的で、培養細胞の rRNA を酸化させてリボトキシックストレス負荷をかけ、タウ蛋白のリン酸化亢進と JNK および p38 MAPK の関与を明らかにした。また、RNA と結合する自然免疫受容体 TLR-3 の病態脳における動態を解析し、アルツハイマー病脳およびアミロイド高発現トランスジェニックマウス Tg2576 において TLR-3 発現が亢進していることを明らかにした。神経変性における酸化ストレスおよびアミロイド負荷によって神経病像が形成される過程に、何らかの形で RNA が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：To elucidate involvement of interaction between RNA and protein in neurodegenerative processes, ribotoxic stress was added by oxidative stress, and phosphorylation of tau and activation of JNK and p38 MAPK were revealed. And, TLR-3, an innate immune receptor that can bind to double stranded RNA, was also investigated in disease brain, including Alzheimer disease and amyloid-transgenic mice Tg2576. Expression of TLR-3 was significantly increased in Alzheimer disease and Tg2576, and TLR-3 positive cells were distributed in and around amyloid plaques. In these neurodegenerative processes, oxidation of rRNA or release of RNA from dead cells, might be involved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：老年精神医学

1. 研究開始当初の背景

神経変性性認知症の中で、アルツハイマー病 (Alzheimer Disease: AD) は最も頻度が高く、前頭側頭型認知症 (Frontotemporal dementia: FTD) も頻度は少なくない。AD の

神経病理学的変化としては神経原線維変化、老人斑、炎症性変化、神経細胞およびシナプスの喪失が知られている。神経原線維変化はリン酸化されたタウ蛋白から構成されているが、glycosaminoglycan や RNA、14-3-3

蛋白などの物質はタウ蛋白と結合し、タウ蛋白の自己重合を促進させるはたらきがある。このタウ蛋白をコードする遺伝子変異による家族性認知症 FTDP-17 が報告され、これをきっかけとしてタウ蛋白の重要性が再確認された。さらに、タウ蛋白以外のユビキチン化蛋白が神経細胞内に蓄積する FTD の存在も明らかとなり、蓄積成分は TDP-43 であることが報告された。この TDP-43 は核酸に結合し、hnRNP の一種として機能し、RNA の安定化や選択的スプライシングを調節することなどが知られている。このように RNA に結合する蛋白が神経変性に関与している証拠が集まりつつある。

我々は以前の検討から anisomycin や trichostecene micotoxin 等の蛋白合成阻害剤で神経系細胞を処理するとタウ蛋白のリン酸化が誘導されると同時にアポトーシス非依存性細胞死を起こすことを見出し、これら薬剤はリボトキシックスストレス（蛋白合成の場であるリボソームが翻訳阻害を受けると生じるストレス）を誘導して MAP キナーゼのメンバーである JNK や p38 を活性化してタウ蛋白をリン酸化することを示し、さらに AD 脳ではこのリボソームを構成する rRNA も異常に酸化されていることを見出した。そこで、培養細胞内の核酸を酸化させてリボトキシックスストレス負荷をかけることにより、タウ蛋白のリン酸化亢進をとまなう神経細胞死モデルを構成する可能性が考えられていた。

また、他方 AD 脳内ではミクログリアの活性化および補体やサイトカインの分泌などの炎症性変化が以前より指摘されているが、近年免疫学においては自然免疫システムのメカニズムが明らかにされ、Toll-like receptors (TLRs) が注目を浴びている。中枢神経系においても TLRs は広範囲に発現し、

自然免疫を活性化すると神経変性を惹起することや、ミクログリアでの TLR-2 の活性化によりアミロイドβが貪食されることなども報告されている。この TLRs のシグナルの下流には炎症のメディエーターである NF-κB や MAP キナーゼのメンバーである JNK や p38MAPK が存在する。我々は、AD の炎症性変化とタウ蛋白のリン酸化がこのメカニズムを通して関連しているのではないかと想定して検討をおこない、人工的 2 本鎖 RNA である polyinosinic-polycytidylic acid (pIpC) をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に添加すると、これをリガンドとする TLR-3 を介してタウ蛋白のリン酸化が亢進することを見いだした(Nessa BN., Psychiatry Clin Neurosci. 60 Suppl 1:S27-33,2006.)。さらに、アミロイドβを培地に添加すると TLR-3 の発現が亢進するという結果も得ている。脳内での細胞外の TLR-3 のリガンドとしては、ネクローシスになった細胞などから放出された mRNA などが考えられ、RNA の変化は TLR-3 を通しても AD の炎症性変化、アミロイドβ、タウ蛋白リン酸化が結びつけられる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的としてタウ蛋白を中心とした神経変性過程における RNA の関与を明らかにすることとし、核酸の酸化を誘導する細胞モデルによってタウ蛋白のリン酸化への影響を検討することとした。

さらに、RNA 結合能を有する TLR-3 を中心とした自然免疫の神経変性過程における関与を明らかにすることとし、AD 脳における TLR-3 の発現レベルを検討し、AD 脳内でのその発現分布と神経原線維変化および老人斑との関係を明らかにし、アミロイド高発現のトランスジェニックマウスにおける TLR-3 の発現レベルを検討することにした。

3. 研究の方法

核酸の酸化誘導細胞モデルにおけるタウ蛋白の変化を解析するために、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に 100nM-1 μ M Rose Bengal を添加し、光を照射した後の細胞を回収した。そして、抗タウ蛋白リン酸化特異抗体を用いて、タウ蛋白の変化をウェスタンブロットにて検討した。また、タウ蛋白をリン酸化する酵素として、JNK および p38 MAPK のリン酸化レベルを検討した。

次に、TLR-3 を中心とした自然免疫の神経変性過程における関与を明らかにするために、正常脳および AD 脳における TLR-3 の発現レベルを Real-Time Quantitative RT-PCR (ABI prism 7900 Sequence detection system) によって定量し、比較検討をおこなった。

さらに、正常脳および AD 脳における TLR-3 の発現分布を検討するために、抗 TLR-3 抗体、抗タウ蛋白抗体、抗アミロイド β 抗体を用いた免疫染色をおこなった。

そして、アミロイド高発現トランスジェニックマウス Tg2576 を用いて、同様に Real-Time Quantitative RT-PCR による TLR-3 発現の定量と、抗 TLR-3 抗体、抗アミロイド β 抗体を用いた免疫組織学的検討をおこなった。

4. 研究成果

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に 100nM-1 μ M Rose Bengal を添加し、光を照射した後の細胞ライセートからタウ蛋白の変化を解析したところ、PHF-1 抗体(リン酸化 Ser396/404 を認識)に対する染色性が亢進しており、リン酸化の亢進が示唆された。また、タウ蛋白リン酸化酵素である JNK および p38 MAPK のリン酸化レベルを同様にリン酸化特異抗体にて検討したところ、両者ともに染色性が亢進しており、両キナーゼの活

性化が示唆された。さらに、p38 MAPK のインヒビターである SB20358 を事前に添加しておいた場合、タウ蛋白のリン酸化は減弱しており、ここでも p38 MAPK の関与が示唆された。また、酸化ストレスの一つである一重項酸素のクエンチャーである NaN₃ をを事前に添加しておいた場合もタウ蛋白のリン酸化は減弱しており、このタイプの酸化ストレスの関与が示唆された。よって、酸化ストレスによって誘導された JNK および p38 MAPK の活性化によってタウ蛋白のリン酸化が亢進し、AD を含む神経変性過程にこのような機序が関わっている可能性が示唆された。

次に、TLR-3 を中心とした自然免疫の神経変性過程における関与を明らかにするために、正常脳および AD 脳における TLR-3 の発現レベルを Real-Time Quantitative RT-PCR によって定量したところ、AD 脳において TLR-3 は有意に発現亢進していることが認められた。さらに、免疫組織化学的に AD 脳内でのその発現分布の検討(神経原線維変化および老人斑との関係)の検討をおこなったところ、抗アミロイド β 抗体によって染色される老人斑内にいくつかの TLR-3 陽性細胞が認められたが、抗タウ蛋白抗体によって染色される神経原線維変化と TLR-3 陽性細胞との共在は認められなかった。

さらに、アミロイド高発現トランスジェニックマウス Tg2576 における TLR-3 の発現レベルの検討を行ったところ、コントロールマウスに比べアミロイド高発現トランスジェニックマウスにおいて TLR-3 は有意に発現亢進しており、アミロイド高発現トランスジェニックマウスにおいては老人斑内および老人斑の外にも数多くの TLR-3 陽性細胞が認められた。このことは、アミロイド産生過剰からオリゴマーレベルでの可溶性アミロ

イドβの刺激によって、TLR-3の発現が活性化され、それを通してADの炎症性変化に関与している可能性が示唆された。

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 15 件)

- 1) Currais A, Kato K, Canuet L, Ishii R, Tanaka T, Takeda M, Soriano S. Caffeine Modulates Tau Phosphorylation and Affects Akt Signaling in Postmitotic Neurons. *J Mol Neurosci.* 43(3):326-332, 2011. (査読有)
- 2) Mori K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Yanagida K, Kodama TS, Tatsumi S, Fujii K, Tanimukai H, Hashimoto R, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Funamoto S, Ihara Y, Takeda M. The production ratios of AICD ϵ 51 and A β 42 by intra-membrane proteolysis of β APP do not always change in parallel. *Psychogeriatrics.* 10(3):117-123, 2010. (査読有)
- 3) Hayashi N, Kazui H, Kamino K, Tokunaga H, Takaya M, Yokokoji M, Kimura R, Kito Y, Wada T, Nomura K, Sugiyama H, Yamamoto D, Yoshida T, Currais A, Soriano S, Hamasaki T, Yamamoto M, Yasuda Y, Hashimoto R, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Morihara T, Takeda M. KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in Alzheimer's disease, but does not show association with disease in a Japanese cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 30(4):302-308, 2010. (査読有)
- 4) Takeda M, Martínez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Hashimoto R, Cacabelos R. Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings. *Psychiatry Clin Neurosci.* 64(6):592-607, 2010. (査読有)
- 5) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Morihara T, Takeda M. Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: Implications for the mechanism of tau aggregation. *J Neurochem* 108:33-43, 2009. (査読有)
- 6) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Kudo T, Takeda M. Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. *Biochem Biophys Res Commun* 383(1):37-41, 2009. (査読有)
- 7) Yanagi K, Tanaka T, Kato K, Sadik G, Morihara T, Kudo T, Takeda M. Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau. *Psychogeriatrics* 9:157-166, 2009. (査読有)
- 8) Kazui H, Ishii R, Yoshida T, Ikezawa K, Takaya M, Tokunaga H, Tanaka T, Takeda M. Neuroimaging studies in patients with Charles Bonnet Syndrome. *Psychogeriatrics.* 9:77-84, 2009. (査読有)
- 9) Tanimukai H, Kudo T, Tanaka T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disease. *Psychogeriatrics.* 9:103-109, 2009. (査読有)
- 10) Itoh N, Okochi M, Tagami S, Nishitomi K, Nakayama T, Yanagida K, Fukumori A, Jiang J, Mori K, Hosono

- M, Kikuchi J, Nakano Y, Takinami Y, Dohi K, Nishigaki A, Takemoto H, Minagawa K, Katoh T, Willem M, Haass C, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Hasegawa H, Nishimura M, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M.
 Destruxin E Decreases Beta-Amyloid Generation by Reducing Colocalization of Beta-Amyloid-Cleaving Enzyme 1 and Beta-Amyloid Protein Precursor. *Neurodegener Dis.* 6:230-239. 2009. (査読有)
- 11) Tanaka T, Kazui H, Sadik G, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Kudo K, Takeda M.
 Prevention of psychiatric illness in the elderly I -Path to Prevention of Dementia- *Psychogeriatrics* 9:111-115, 2009. (査読有)
- 12) Tagami S., Okochi M., Fukumori A., Jingwei J., Yanagida K., Nakayama T., Morihara T, Tanaka T, Kudo T., Takeda M. Processes of β -amyloid and intracellular cytoplasmic domain generation by presenilin/ γ -Secretase. *Neurodegenerative Dis.* 5:160-162, 2008. (査読有)
- 13) Tanaka T., Kazui H., Tanimukai H., Morihara H., Sadik G., Kudo T., Takeda M. Post-marketing surveillance of donepezil hydrochloride in Japanese patients with Alzheimer's disease with behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). *Psychogeriatrics* 8;114-123, 2008. (査読有)
- 14) Aidaraliev NJ, Kamino K, Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Kida T, Okuda J, Uema T, Yamagata H, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Takeda M. Dynamin 2 gene is a novel susceptibility gene for late-onset Alzheimer disease in non-APOE-epsilon4 carriers. *J Hum Genet.* 53:296-302, 2008. (査読有)
- 15) Takeda M, Morihara T, Okochi M, Sadik G, Tanaka T Mild Cognitive Impairment (MCI) and Subjective Cognitive Impairment (SCI) *Psychogeriatrics* 8;155-160, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計 13 件)
- 1) Takaya M, Tanaka T, Ataka S, Shimada H, Morihara T, Miki T, Kazui H, Takeda M. PIB-PET images, compared with MR, FDG-PET, and IMP-SPECT images, of a patient with Alzheimer's disease with presenilin-1 mutation (Met233Leu) showing a new phenotype The 13th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul,10-15,2010, Hawaii, U.S.A.
- 2) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Fukusyo E, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Identification of a gene which controls Abeta accumulation using App Tg mice with mixed genetic background The 13th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul,10-15,2010, Hawaii, U.S.A.
- 3) 加藤希世子、田中稔久、Golam Sadik、Antonio Currais、柳健太郎、馬場都、丸山大輔、武田雅俊 アポトーシス阻害蛋白 XIAP の PKC によるリン酸化を介した細胞死抑制性メカニズムの解析 第 29 回日本認知症学会 2010.11.5-7. (愛知県名古屋市)
- 4) Tanaka T, Sadik G, Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 protein differentially interacts with 3-repeat and 4-repeat tau The 12th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul,11-16,2009, Vienna, Austria.
- 5) Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Sadik G, Takeda M. Attenuated proteolysis

of FTDP-17 mutant tau in cultured cells and involvement of increased phosphorylation of tau The 14th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Sept.1-5, 2009 Montreal, Canada.

- 6) 田中稔久、柳健太郎、Golam Sadik, 加藤希世子、武田雅俊 培養細胞におけるタウ蛋白の分解におけるpuromycin感受性アミノペプチダーゼの関与 第28回日本認知症学会 2009.11.20-21. (宮城県仙台市)
- 7) 田中稔久、柳健太郎、Golam Sadik, 加藤希世子, 馬場都、武田雅俊 FTDP-17 タウ変異によるタウ蛋白代謝過程の変化 日本老年医学会: 第20回近畿地方会 2009.12.1、新大阪チサンホテル (大阪市)
- 8) 田中稔久 タウの病理—運動ニューロン疾患を呈する前頭側頭型認知症の分子病態 第19回神経科学の基礎と臨床 2009.12.19、千里ライフサイエンスセンター (大阪市)
- 9) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 Protein Exhibits Strong Affinity for 3-repeat Tau and Increases Its Filament Formation The 11th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul,26-31,2008, Chicago, U.S.A..
- 10) Tanaka T, Sadik G, Kato K, Yanagi K, Takeda M. Involvement of tau protein in neurodegeneration 第51回日本神経化学大会 2008.9.11-13. (富山)
- 11) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Takeda M. 14-3-3 differentially induces 3-repeat and 4-repeat tau aggregation 第51回日本神経化学大会 2008.9.11-13. (富山)
- 12) 加藤希世子、田中稔久、Golam Sadik, 柳健太郎、武田雅俊 GSK3 抑制によるカスパーズ阻害因子XIAPの亢進機序について 第27回日本認知症学会 2008.10.10-12. (群馬県前橋市)
- 13) Sadik G, Tanaka T, Kato K, Kentaro Yanagi, Takeda M. 14-3-3 Protein is a

potential candidate inducer for fibrillization of 3-repeat Tau Society for Neuroscience the 38th Annual Meeting, Nov, 15-19, 2008, Washington, U.S.A.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 稔久 (Tanaka Toshihisa)
(大阪大学・医学系研究科・講師)
研究者番号: 10294068

(2) 研究分担者

武田 雅俊 (Takeda Masatoshi)
(大阪大学・医学系研究科・教授)
研究者番号: 00179649

森原 剛史 (Morihara Takashi)
(大阪大学・医学系研究科・助教)
研究者番号: 90403196