

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15725

研究課題名（和文）タウオパチー細胞モデルを用いた異なるタウ分子種間における細胞間伝播の検討

研究課題名（英文）Intercellular Propagation Among Different Tau Species Using a Tauopathy Cell Model

研究代表者

石黒 敬信 (Ishiguro, Takanobu)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40929634

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）と非ADタウオパチーにおける病態の違いについて、ADに関連する病的蛋白（A $\beta$ 、タウ）の産生、細胞外分泌、神経細胞興奮の相互の関係性について着目し、神経系培養細胞を用いて検証をすすめた。アミロイド前駆体蛋白（APP）からA $\beta$ 産生について、グルタミン酸濃度に依存してAPP processingが変化すること、細胞外へのタウ分泌がA $\beta$ 量に依存し、このA $\beta$ 産生の抑制によってタウ分泌が抑制されること、変異型タウ導入により、アミロイド産生経路が抑制されることを示した。APP processingがADと非ADタウオパチーで異なる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADに関連した病的蛋白（A $\beta$ 、タウ）の産生や細胞外放出の機序を細胞実験レベルで検証した。本研究においては、A $\beta$ 産生にかかわる、APP processingがADと非ADタウオパチーで異なることが示唆された。今後、この機序を明らかにすることが、タウオパチーの病態解明について新たな着想点となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We focused on the differences in pathogenesis between Alzheimer's disease (AD) and non-AD tauopathy, examining the interrelationships between the production, extracellular secretion, and neuronal excitotoxicity of pathological proteins associated with AD (A $\beta$ , tau), and proceeded to verify using neuronal culture cells. We demonstrated: that APP processing varies depending on glutamate concentration for A $\beta$  production, that extracellular tau secretion depends on A $\beta$  levels and is inhibited by suppressing A $\beta$  production, and that introduction of mutant tau suppresses the amyloid production pathway. The possibility that APP processing differs between AD and non-AD tauopathy was suggested.

研究分野：脳神経内科学

キーワード：タウオパチー 神経細胞興奮 -アミロイド タウ

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において、認知症性疾患の分子病態の解明とこれに基づく疾患修飾薬の開発は急務である。アルツハイマー病 (AD) をはじめ、脳内にタウが異常蓄積する疾患をタウオパチーと呼ぶ。タウは複数の分子種があるが、疾患によって優位に蓄積する分子種が異なる。AD では神経活動亢進によって産生が増加した  $\tau$ -アミロイド (A $\beta$ ) も共存し、タウ伝播は助長される。一方、非ADタウオパチーではA $\beta$  に依存せずタウ伝播が進行する。この中には進行性核上性麻痺 (PSP) などADよりも症状進行が急速である疾患も存在する。背景にはタウ分子種による細胞間伝播における挙動の違いが存在している可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究は主に、神経細胞興奮に依存したAD関連蛋白質 (A $\beta$  , タウ) の挙動をもとに、A $\beta$  に依存したタウの細胞外分泌、またタウ分子種による細胞外分泌の違いについて神経系培養細胞を用いて検証し、ADや非ADタウオパチーの分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) マウス神経芽細胞腫由来の Neuro2a (N2a) 細胞及びラット初代培養神経細胞を用いて遺伝子導入や薬剤添加の実験系を構築した。

(2) 薬剤添加後に、ターゲットとする蛋白の細胞内及び培養液中の発現を解析した。この解析ではウエスタンブロッティング法やELISAを用いた。

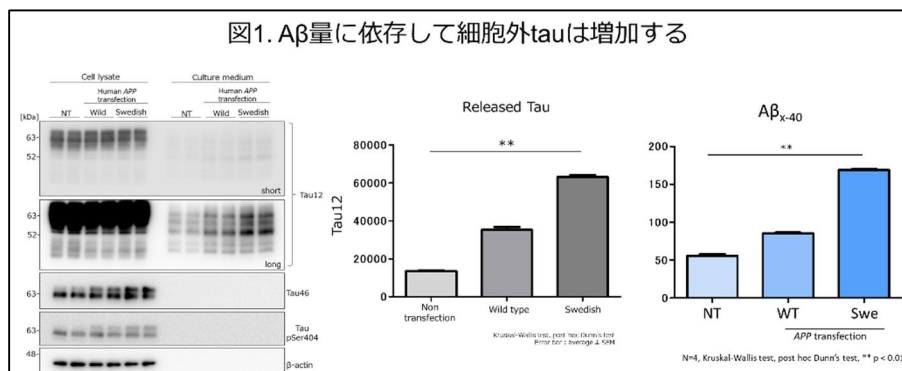
### 4. 研究成果

#### (1) グルタミン酸濃度に依存した APP processing の変化

ラット大脳皮質由来神経細胞 (胎生 17 日) を用いて、グルタミン酸による神経細胞興奮による APP processing の変化を解析した。高濃度グルタミン酸 (100  $\mu$ M) 刺激では APP processing の切断が抑制される一方、低濃度グルタミン酸 (0.1  $\mu$ M) 刺激では APP processing の切断が亢進し A $\beta$  産生が増加することが示された。すなわち、グルタミン酸濃度に依存して APP processing が変化した。両者の検証を 2 時間の短時間刺激で検証したのち、低濃度グルタミン酸刺激においては 24 時間刺激においても検証した。2 時間後刺激において APP の切断後の C 末端断片の増加を、24 時間刺激では A $\beta$  の増加及び APP の切断後の可溶性成分である sAPP の増加を確認した。つまり、切断が増加していることが示された。また、24 時間刺激においては NMDA 受容体阻害薬の添加の検証により、本実験系における A $\beta$  産生の増加は NMDA 受容体活性化を介していることが示唆された。

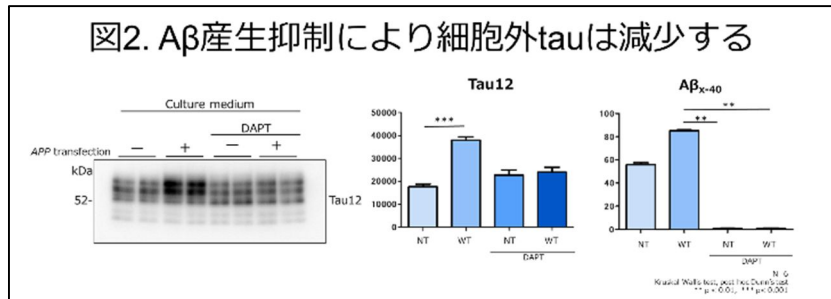
#### (2) A $\beta$ 依存性の tau の細胞外分泌

Tau の細胞外への分泌について、細胞外の A $\beta$  量に依存するかを検証した。ここでヒト wild type 4R1N タウを発現する MAPT プラスミド DNA を安定導入させた Neuro2a 細胞 (N2a-MAPT) を作成、使用した。この培養細胞から培養液中に放出されるタウは N 末端抗体 (Tau12) によりウエスタンブロッティング法により検出した。ヒト APP を一過性に導入することで、A $\beta$  産生を過剰させることで、細胞外での A $\beta$  濃度を上昇させた。この条件下において、A $\beta$  量に依存した細胞外へのタウ分泌を検証した。ここで導入する APP は wild type と遺伝性 AD の原因遺伝子変異の一つである、Sweden 変異を用いた。wild type よりも Sweden 変異の方が A $\beta$  過剰産生状態となることを利用し、A $\beta$  量を段階的に変化させた。これらのプラスミド DNA を lipofection 法により一過性に導入し検証した。この検証により、A $\beta$  過剰産生によって細胞外へ放出される tau は細胞外への A $\beta$  量に依存した (図 1)。



( 3 )  $\gamma$ -secretase 阻害剤によるタウの細胞外分泌の抑制

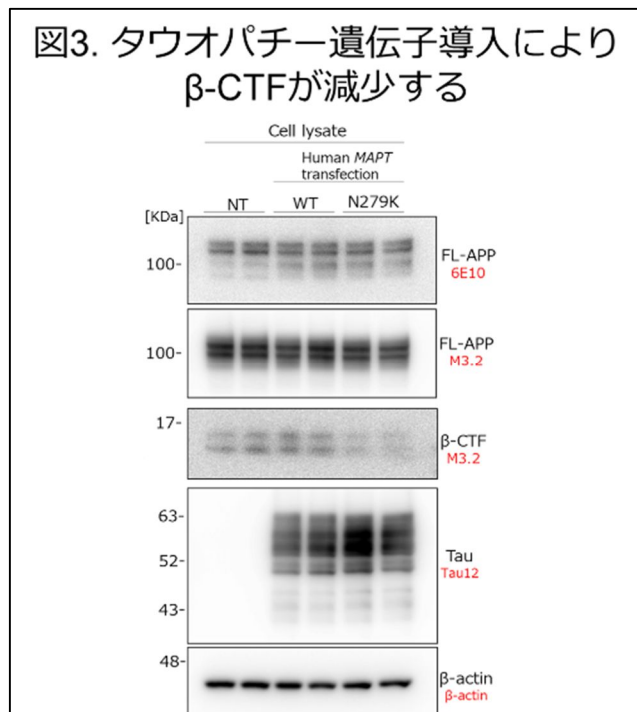
細胞外の A $\beta$  量に依存してタウの細胞外分泌が増加することが予想されたため、 $\gamma$ -secretase 阻害剤(DAPT)を用いて A $\beta$  産生を抑制した。これにより、培養液中の A $\beta$  はほぼ完全に抑制された。この条件下で培養液中のタウを検出したところ、コントロールと同様のレベルまで抑制されていた(図 2)



( 4 ) タウオパチーの原因遺伝子変異をもつヒト MAPT 導入による A $\beta$  産生の変化

PSP は AD とは異なり、A $\beta$  非依存性にタウ病理が進展する。同じタウオパチーでありながら蓄積する病的タウが異なる。すなわち、PSP では主に 4 リpeat であるが、AD は 3 及び 4 リpeat タウが蓄積する。脳脊髄液中で検出される A $\beta$  やタウ分子の挙動も異なっている。例えば、AD では A $\beta$  の脳内沈着を反映して脳脊髄液中の A $\beta$  は低下する。

タウの分子種、特にヒトのタウが A $\beta$  の産生に影響するのかを検証した。遺伝性タウオパチーの原因遺伝子であるヒト MAPT N279K 変異プラスミドを作成、これを一過性に導入することで A $\beta$  の産生に影響があるかを検証した。導入する MAPT はヒト野生型と N279K を用いて、これをヒト APP Sweden 変異を安定発現する Neuro2a 細胞を作成、ここへ一過性に導入し、APP processing の変化を検証した。N279K 変異を導入した細胞では、内在性のマウス APP の切断後の C 末端断片 ( $\beta$ -CTF) の発現が低下しており(図 3)、A $\beta$  産生が低下していることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	池内 健  (Ikeuchi Takeshi)		
研究協力者	春日 健作  (Kasuga Kensaku)		

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