

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591234

研究課題名(和文) アミロイド 依存性に異常タウリン酸化を誘導する分子群の網羅的解析

研究課題名(英文) Non-biased expression analysis to search for molecules associated with amyloid-beta induced hyperphosphorylation of tau

研究代表者

池内 健 (Ikeuchi, Takeshi)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20372469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病脳では、不溶性タンパクの凝集により老人斑と神経原線維変化が形成される。老人斑は、アミロイド(A β)から成り、神経原線維変化はリン酸化タウを主成分とする。A β 蓄積からリン酸化タウが誘導される機序は未解明である。本研究は、A β 依存性にタウリン酸化を誘導する分子群を同定することを目的とした。A β を産生するドナー細胞と、内在性タウを発現する初代神経培養細胞(レシピエント細胞)の共培養を行い、レシピエント細胞の全RNAを回収した。RNA発現解析チップを用いた網羅的解析を行い、発現が変動する分子群を同定し、パスウェイ解析によりインスリンシグナルに關与する経路の障害を見出した。

研究成果の概要(英文)：Senile plaque and neurofibrillary tangle are pathological hallmarks of brains of Alzheimer's disease. Senile plaque consists of amyloid-beta (A β) and neurofibrillary tangle is composed of hyperphosphorylated tau. The mechanism by which A β induces hyperphosphorylation of tau remains unclear. In this study, we addressed this question by establishing coculture system in which A β -induced hyperphosphorylation of tau is recapitulated. Total RNA was extracted from primary cultured neurons in which hyperphosphorylation of tau is induced by physiologically secreted A β by coculture system. By conducting unbiased examination using RNA expression array, we found that expressions in several genes are altered in condition where hyperphosphorylation of tau occurred in primary neurons. Bioinformatics analysis revealed that genes of altered expression affect insulin signaling.

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：脳神経疾患 遺伝子発現 シグナル伝達 認知症

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病患者脳では、不溶性タンパクの凝集により老人斑と神経原線維変化が形成され、大脳皮質に広範な神経細胞脱落が生じる。老人斑はアミロイドβ (Aβ) から成り、神経原線維変化はリン酸化タウを主要成分とする。アルツハイマー病を臨床的に発症する以前から、病理学的には老人斑および神経原線維変化はほぼ完成していることが最近の研究により明らかにされている。アルツハイマー病の分子病態機序として、最初にAβが凝集することで老人斑を形成し、それに引き続いて異常リン酸化タウが蓄積(神経原線維変化)し、神経細胞死に至るというアミロイドカスケード仮説が提唱されている。

アミロイド仮説の初期イベントとしてAβの重要性を支持する所見として、Aβ産生亢進およびAβ42産生増加が生じる遺伝子変異が家族性アルツハイマー病で同定されていることがある。数多くの研究によりAβ蓄積が生じる機序の理解は近年著しく進んだ。またAβを標的とした病態修飾薬の開発も進んでいる。一方、過剰なAβが異常リン酸化タウを引き起こすメカニズムは現在まで未解決である。Aβを標的とした臨床治験の成績が芳しくない現状を考えると、過剰Aβと異常リン酸化タウを結びつける病態に關与する標的分子の同定はアルツハイマー病研究の中でも重要な課題の一つと認識されている。

2. 研究の目的

本研究は、過剰Aβ 異常リン酸化タウを再現する共培養システムを構築し、この過程において変化する分子群を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 共培養システムの構築

宿主細胞にアミロイド前駆体タンパク (APP) を過剰発現する HEK293 細胞と、レシピエント細胞に内在性タウを発現するラット初代神経培養細胞とを共培養するアッセイ系を構築した。共培養後にレシピエント細胞の細胞ライセイトを回収し、リン酸化タウ抗体 (AT8)、非リン酸化タウ抗体 (Tau-1)、非リン酸化タウ抗体 (Tau-5) を用いて内在性タウを免疫プロットにより検討した。また、培養液中のAβは抗Aβ抗体 (82E1) およびサンドイッチ ELISA を用いて定量化した。

(2) 網羅的 RNA 解析

共培養の後、レシピエント細胞から RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用い全 RNA を抽出した。抽出した RNA の品質を Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) を用い RNA integrity number: RIN を決定した。RNA 品質が担保されていることを確認の上、マイクロアレイ (Affymetrix MG-430nPM Array) を用いた解析を GeneAtlas (Affymetrix) により解析した。

(3) バイオインフォマティクス解析

Aβ依存性異常リン酸化タウ誘導に伴って挙動する分子群については、個々の分子の検討に加え、タンパク-タンパク相互作用の面から検討を加える。タンパク-タンパクの相互作用に関するデータベース BioGRID を用い特定の分子の変動がタンパク-タンパク相互作用と連動して挙動しているか否かを検討する。さらに、DAVID (Data base for annotation, visualization and integrated discovery) による変動分子をパスウェイとしてとらえる試みを行う。

4. 研究成果

(1) 過剰Aβが異常リン酸化に及ぼす影響

ドナー細胞が産生するAβの効果について3つのモデルを構築し検討した。過剰Aβ産生モデル (スウェーデン型変異)、過剰Aβ42産生 (PSEN1 変異)、オリゴマーAβ産生 (APP ΔE693) を産生するドナー細胞をレシピエント細胞である初代神経培養細胞と共培養を行った。過剰Aβを産生するドナー細胞と共培養させると、レシピエント細胞の内在性タウの異常リン酸化が誘導された。セクレターゼ阻害剤でAβ産生を抑制するとレシピエント細胞のタウ・異常リン酸化への誘導は消失するので、この異常リン酸化タウの誘導はAβ依存性であることが示唆される。一方、レシピエント細胞の非リン酸化タウ (Tau-1 抗体で検出) は過剰Aβによる影響を受けないので、過剰Aβはタウのリン酸化状態に直接影響を及ぼすことが推測された。

次に過剰Aβ42を産生させるモデルとして、PSEN1 L166P を安定発現するドナー細胞を用いてレシピエント細胞のリン酸化タウの検討を行った。過剰Aβ産生ドナー細胞と同様に、レシピエント細胞の内在性タウのリン酸化が過剰Aβ42により誘導された。さらに、オリゴマーAβ産生モデルとして、APP ΔE693 変異をドナー細胞に発現させ、レシピエント細胞のリン酸化タウに対する効果を検討し、同様に内在性タウのリン酸化促進を確認した。

(2) 網羅的 RNA 解析

共培養の後、レシピエント細胞から RNA を抽出した。RNA 品質を反映する RIN 値は、いずれのサンプルも 8.0 以上を示した。RNA を用い Affymetrix MG-430nPM Array により網羅的な解析を行った。この解析によりAβ依存性にタウが誘導される時に変動する分子群を同定した。それらの分子の挙動をパスウェイ解析を実施したところ、インスリン受容体を含むインスリンシグナルに關与するパスウェイが障害していることを見出した。

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10件)

1) Miyashita A, Koike A, Jun G, Wang LS,

- Takahashi S, Matsubara E, Kawarabayashi T, Shoji M, Tomita N, Arai H, Asada T, Harigaya Y, Ikeda M, Amari M, Hanyu H, Higuchi S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Suga M, Kawase Y, Akatsu H, Kosaka K, Yamamoto T, Imagawa M, Hamaguchi T, Yamada M, Moriaha T, Takeda M, Takao T, Nakata K, Fujisawa Y, Sasaki K, Watanabe K, Nakashima K, Urakami K, Ooya T, Takahashi M, Yuzuriha T, Serikawa K, Yoshimoto S, Nakagawa R, Kim JW, Ki CS, Won HH, Na DL, Seo SW, Mook-Jung I; Alzheimer Disease Genetics Consortium, St George-Hyslop P, Mayeux R, Haines JL, Pericak-Vance MA, Yoshida M, Nishida N, Tokunaga K, Yamamoto K, Tsuji S, Kanazawa I, Ihara Y, Schellenberg GD, Farrer LA, Kuwano R. SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasian. PLOS One 査読有 8:e58618, 2013
- 2) Riku Y, Ikeuchi T, Yoshino H, Mimuro M, Mano K, Goto Y, Hattori N, Sobue G, Yoshida M. Extensive aggregation of α -synuclein and tau in juvenile-onset neuroaxonal dystrophy: an autopsied individual with a novel mutation in the *PLA2G6* gene-splicing site. Acta Neuropathologica Communication 査読有 1:12, 2013
- 3) Shimizu H, Toyoshima Y, Yokoseki A, Shiga A, Arakawa K, Sekine Y, Shimohata T, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Onodera O, Takahashi H. Sporadic ALS with compound heterozygous mutations in the *SQSTM1* gene. Acta Neuropathologica 査読有 126:453-459, 2013
- 4) K akuda N, Shoji M, Arai H, Furukawa K, Kuwano R, Ikeuchi T, Akazawa K, Yamaguchi H, Murayama S, Nagashima Y, Nagaike K, *Ihara Y, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Altered γ -secretase activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. EMBO Molecular Medicine 査読有 4:344-352, 2012
- 5) Omoto M, Suzuki S, Ikeuchi T, Ishihara T, Kobayashi T, Tsuboi Y, Ogasawara J, Koga M, Kawai M, Iwaki T, *Kanda T. Autosomal dominant tauopathy with parkinsonism and central hypoventilation. Neurology 査読有 78:752-764, 2012
- 6) Ikeuchi T, Katsui T, Kasuga K, Hirose M, Nishizawa M. Parkinsonian features in a patient with diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC). Parkinsonism & Related Disorders 査読有 18:649-650, 2012
- 7) Hata S, Taniguchi M, Piao Y, Ikeuchi T, Fagan AM, Holtzman DM, Bateman R, Gandy S, Urakami K, *Suzuki T, Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiatives. Coordinated increase levels of several γ -secretase product peptides in the CSF of a subpopulation of sporadic Alzheimer's disease subjects. Molecular Neurodegeneration 査読有 7:16, 2012
- 8) Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M, Ikeuchi T. Hyperphosphorylation of tau induced by naturally secreted amyloid- β at low nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3 β signaling pathway. Journal of Biological Chemistry 査読有 287:35222-35233, 2012
- 9) Zhang X, Hoey RJ, Lin G, Koide A, Leung B, Ahn K, Dolios G, Paduch M, Ikeuchi T, Wang R, Li Y, Koide S, Sisodia SS. Identification of a TPR-like domain in the Nicastrin subunit of γ -secretase using synthetic antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 査読有 109:8534-8539, 2012
- 10) Kobayashi J, Kuroda M, Kawata A, Mochizuki Y, Mizutani T, Komori T, Ikeuchi T, Koide R. Novel G37V mutation of *SOD1* gene in autopsied patient with familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis 査読有 14:570-572, 2012
- 〔学会発表〕(計 10 件)
- 1) 池内 健 . アルツハイマー病の未病診断 . 第 32 回分子生物学会 . 2013.12.3. 神戸
- 2) 池内 健 . 代謝恒常性の破綻によるアルツハイマー病の発症機序と新規治療法開発 . 第 3 回日本認知症予防学会 . 2013.9.29. 新潟市
- 3) Ikeuchi T. An emerging role of insulin resistance in amyloid-beta cascade hypothesis. The 20th IAGG World Congress of Gerontology and Geriatrics, Seoul, Korea, 2013.6.24

- 4) Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M, Ikeuchi T. Hyperphosphorylation of tau induced by naturally secreted amyloid- β at low nanomolar concentrations is mediated by insulin-dependent signaling pathway. Society for Neuroscience 2012.10.16, New Orleans, USA
- 5) 徳武孝允, 池内 健, 春日健作, 矢島隆二, 西澤正豊. β アミロイド依存性タウ・リン酸化におけるインスリン抵抗性の関与: 初代神経培養細胞を用いた共培養による解析. 第 5 3 回日本神経学会 2012.5. 25. 東京
- 6) 徳武孝允, 手塚敏之, 関根有美, 矢島隆二, 春日健作, 西澤正豊, 池内 健. $A\beta$ により生じるタウリン酸化はインスリン依存性 Akt-GSK3 β シグナル障害が関連する. 第 31 回日本認知症学会 ポスター発表 2012.10.26. つくば市
- 7) Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Nishizawa M, Ikeuchi T. β -amyloid induced hyperphosphorylation of tau: possible involvement of insulin signal dysfunction. Alzheimer's Association International Conference. 2011.7.20. Paris, France
- 8) 池内 健. 第 30 回 認知症学会. シンポジウム 5 「生活習慣病と認知症」. アルツハイマー病の発症機構における糖尿病の関与. 2011.11.11. 東京
- 9) 徳武孝允, 池内 健, 春日健作, 矢島隆二, 石原智彦, 西澤正豊. β アミロイドによる誘発されるタウリン酸化におけるインスリンシグナル障害の関与. 第 5 2 回日本神経学会 口演発表 2011.5.19 名古屋
- 10) 徳武孝允, 春日健作, 矢島隆二, 西澤正豊, 池内 健. 共培養システムを用いた β アミロイド依存性タウリン酸化の解析: インスリンシグナル伝達障害の関与. 第 30 回日本認知症学会 ポスター発表 2011.11.11. 東京

〔図書〕(計 0 件)
 〔産業財産権〕
 出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 池内 健 (IKEUCHI TAKESHI)
 新潟大学・脳研究所・教授
 研究者番号：20372469
 (2) 研究分担者：なし
 (3) 連携研究者：なし