

令和元年6月21日現在

機関番号：87401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2018

課題番号：26860052

研究課題名(和文)脂質代謝異常によるアルツハイマー病発症機構

研究課題名(英文)Pathogenic mechanism of Alzheimer's Disease by lipid metabolism

研究代表者

住岡 暁夫 (Sumioka, Akio)

国立水俣病総合研究センター・その他部局等・主任研究員

研究者番号：00431320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)は本邦でもっとも患者数の多い認知症であり、治療法の開発が社会的急務である。本研究では、ADの原因因子タウの過剰リン酸化や凝集などの病変が脂質2重膜によって調節されることに注目し、その作用機序を研究することで、タウの病変のメカニズムの解明と、病変を阻害しADを治療する方法の開発を目指した。研究の成果として、タウが特異的に結合する脂質X1は生体内でもタウの病変を制御すること見出し、培養細胞系でタウの凝集とリン酸化を検証する実験系を新たに構築し、タウの凝集とリン酸化による毒性メカニズムについて、明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病(AD)の神経細胞死の進行は、タウの病変で形成する神経原線維変化(NFT)と一致している。本研究は、タウの病変形成のメカニズムを理解し、これを防ぐ方法を開発することに役立つ。特に新たに構築した培養細胞系でタウの凝集を検証する実験系は、タウの病変を防ぐ薬剤探索への利用が期待でき、より簡便な手法による検出法を開発中である。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's Disease (AD) is the most prevailing dementia in Japan, and developing treatment for the disease is required. In this study, we focused on that tau pathology including their over-phosphorylation and aggregation, as AD causative factor, is regulated by lipid bilayers, and aim to elucidate the mechanism of tau pathology and develop the approach for their inhibition. As an accomplishment of this study, it is found that lipid X1, which specifically interact with tau, can regulate tau pathology in vivo. We established a platform to validating tau aggregation and phosphorylation at cell culture experiment. It is elucidated a new mechanism underlying toxicity of tau pathology.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 タウ 脂質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は日本で最も多い認知症で、根本療法の早急な開発が望まれる。老人斑形成と神経原線維変化 (NFT) は、AD の病理学的特長で、それぞれ アミロイドとタウ蛋白質を主要構成成分とする。なかでも、脳内 NFT の伝播が神経変性の進行とよく一致すること、他の神経変性疾患でも NFT がみられること等から、NFT は AD でみられる進行性の神経変性に関わっていると考えられる。そこでタウが病変し NFT を形成する仕組みを明らかにして、これを阻害することが重要になる。

私は H24-25 にかけて、「膜脂質によるタウ病変制御モデル」の検証に取り組んできた。その結果、タウの凝集体形成を誘導する膜脂質成分を新たに見出した。さらに、タウが特異的に結合する膜脂質成分として X1 を同定し、これがタウの凝集体形成を強力に阻害することを新たに発見している (図 1, 2)。

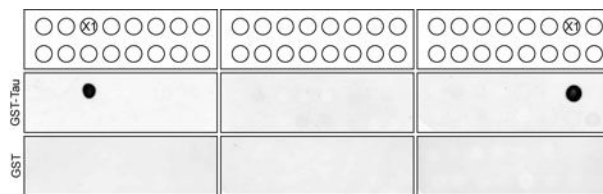


図1 ニトロセルロース膜上にスポットされた膜脂質成分とタウの結合

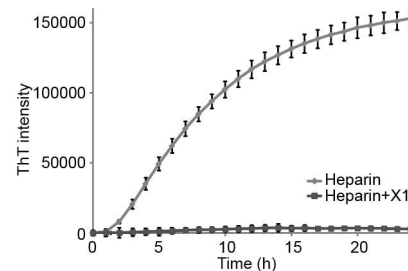


図2 X1によるタウ凝集反応の阻害効果

興味深いことに、脂質 X1 は AD 患者脳や AD モデルマウスで、代謝異常を示すことが報告されている。そこで私はこれらの知見を元に、AD では、脳内の脂質代謝が異常をきたし、タウの病変が進み、その結果神経細胞死に至るのではないかと予想をたて、検証に取り組んだ。

2. 研究の目的

AD の神経変性の進行とタウの病変形成はよく一致しており、主要な原因の一つと考えられている。そこで、AD の治療法を開発するにあたり、タウが病変し NFT を形成する仕組みを明らかにして、これを阻害することが重要になる。本研究は当初、脂質 X1 に注目し、脂質の代謝異常によるタウの病変形成モデルを検証し、そのメカニズムを明らかにする目的で研究を進めた。そして、この解析で得られた知見を発展させ、タウのリン酸化と FTDP 変異の網羅的解析によって、タウの病変メカニズムのより詳細な解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) マウス実験

脂質 X1 の生体内でのタウ病変への作用を検証するため、脂質 X1 の合成酵素遺伝子を欠失させた X1 欠損マウスを繁殖し、実験へ利用した。生後 5 ヶ月齢の X1 欠損マウスと野生型のマウスから海馬を採取した。脂質の発現観察では、Folch 法で脂質を採取後、メンブレンにスポットし、抗 X1 抗体で X1 を検出した。タウのリン酸化修飾の観察では、海馬を SDS と超音波破碎で可溶化し、SDS-PAGE とウェスタンブロットで、タウの発現を検出した。

(2) cDNA

ヒトタウ MAPT 2N4R isoform (NM_005910.5 参照) を哺乳類用発現ベクターに組み込み使用した。各変異は PCR 法を利用してタウの cDNA に導入した。リン酸化候補部位と FTDP 変異部位は Alz forum (<https://www.alzforum.org/>) を参照した。

(3) 細胞実験

哺乳類細胞として、Cos7 細胞、N2a 細胞、Hek293 細胞を使用した。遺伝子発現は、リポフェクション法で一過的に導入した。シードによるタウ凝集実験では、大腸菌から発現精製したリコンビナントタウをヘパリンで誘導した凝集物をシードとして、リポフェクション法で細胞に導入した。細胞は、界面活性剤と遠心法を用いて可溶画分と不溶画分へと分画し、SDS-PAGE とウェスタンブロットで、タウの発現を検出した。細胞の生存性は、ミトコンドリアの活性を WST 法で測定し観察した。

4. 研究成果

(1) 内在性 X1 によるタウの病変制御

脂質 X1 の生体内でのタウ病変への作用を検証するため、脂質 X1 の合成酵素遺伝子を欠失させた X1 欠損マウスを利用した (図 3A)。マウス海馬のタウのリン酸化修飾を観察したところ、野生型に比べて、欠損型で顕著に 199/202、231、396/404、422 残基のリン酸化修飾の増大が観察された (図 3B)。このリン酸化修飾の亢進は、生後 3 週齢から観察され、成長に伴い増大していくことが確認された。

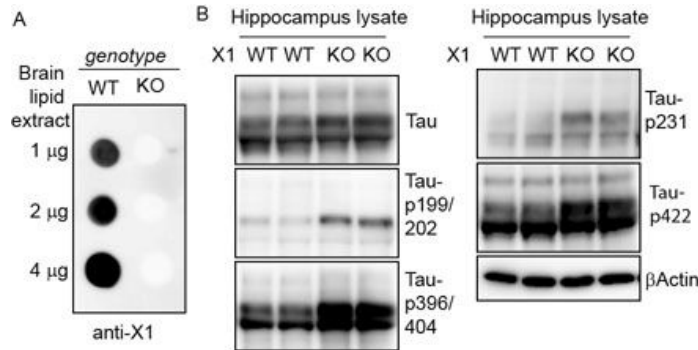


図 3 X1欠損マウスの脳内タウの過剰リン酸化

さらに、1 年齢及び 2 年齢まで加齢したマウスを育成し、界面活性剤を利用した可用性タウと凝集性の不溶性タウを分画したところ、いずれにおいても不溶性画分にタウは観察されなかった。これらの結果より、内在性の X1 はタウのリン酸化を制御すること、しかし X1 の代謝異常のみではタウの凝集形成に不十分であることが明らかになった。

(2) タウのリン酸化修飾の網羅的解析

タウは多数のリン酸化候補部位を有しており、各リン酸化修飾の生理的・病理的な役割は不明な点が多い。そのため、X1 によるタウの過剰なリン酸化修飾の病理学的な解析と評価は困難である。そこで、リン酸化候補部位に網羅的にリン酸化型変異 E 変異を導入し、培養細胞系で発現させ、phostag-AA ゲルを用いた泳動分離によって、リン酸化部位の同定を試みた (図 4)。最終的に、主要なリン酸化部位として 21 箇所のアミノ酸残基を同定し、タウのリン酸化酵素 GSK3 の定常活性化体の共発現でも、これ以外のリン酸化修飾は観察されなかった。

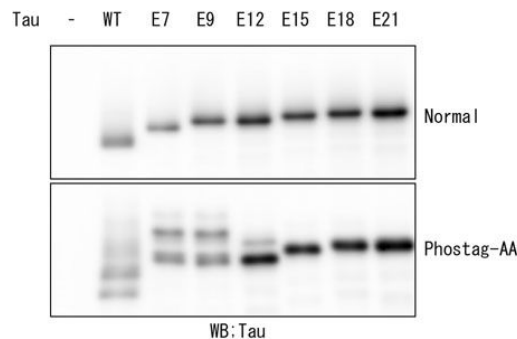


図 4 タウの主要なリン酸化部位の同定

さらにタウのリン酸化修飾の病理学的の意味が探るため、凝集実験と毒性センサー実験を実施した。リン酸化型変異タウを発現させた培養細胞から、界面活性剤を用いて不溶画分を分画したが、野生型及び脱リン酸化型タウにくらべリン酸化型変異タウで特異なシグナルは観察されなかった。そこで、シードによるタウの凝集実験を実施したところ、リン酸化部位特異的な凝集制御作用が観察された (図 5)。つぎに、タウのリン酸化修飾による毒性作用を検証するため、複数のセンサーベクターをタウ変異体と培養細胞に共発現し、毒性評価を行ったところリン酸化部位特異的な異常が観察された (図 6)。

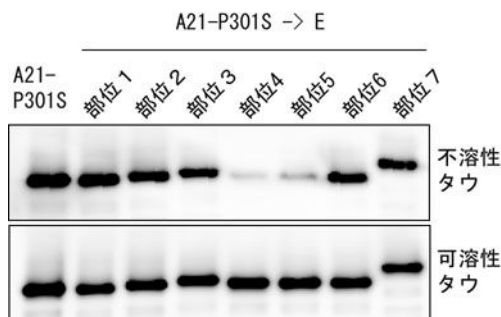


図 5 リン酸化修飾によるタウの凝集制御

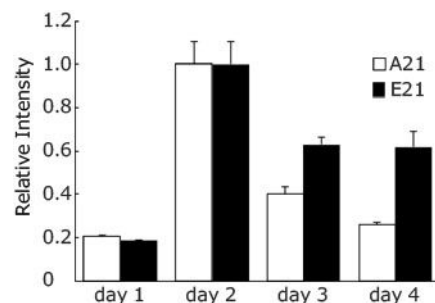


図 6 毒性センサーによるタウのリン酸化の作用の検証

これらの凝集と細胞毒性に関わるリン酸化部位は、脂質 X1 の結合部位に存在する。そこでリン酸化変異体を用いて試験管内での結合実験を実施したところ、リン酸化型変異はタウと膜脂質との相互作用を阻害することが観察された。次に、細胞内でのタウの凝集への X1 の作用を検証するため、シードによる凝集誘導を行ったところ、X1 によるタウ凝集の阻害効果はリン酸化依存的であることが観察された(図 7)。

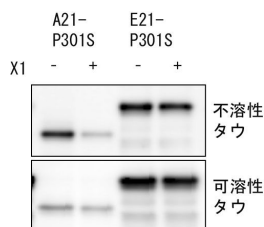


図 7 X1による細胞内タウの凝集制御

以上のことから、タウのリン酸化は細胞毒性を示し、膜脂質との相互作用を介してタウの凝集制御に関与することが明らかになった。

(3) FTDP 変異の網羅的解析

(1)、(2)の研究から、タウの凝集形成には、脂質の代謝異常や過剰なリン酸化では不十分であり、これらとは別の病変形成メカニズムが示唆されている。また、(2)で利用したシードによる凝集誘導では、凝集コアの形成を検証できておらず、凝集誘導の効率の低さから適切な細胞毒性の評価が困難である。これらの問題を解決するため、FTDP 変異の網羅的解析に取り組んだ。FTDP 変異は、17 番染色体に連鎖した前頭側頭型認知症でタウ MAPT 遺伝子上に変異が存在する。そこで、Alz forum を参考に報告のある FTDP 変異を網羅的に導入したタウ変異体を作成し細胞に導入したところ、タウの自発的な凝集形成が観察された(図 8A)。さらに、変異箇所を導入する領域を組み合わせることで、凝集に必須な変異、凝集形成を制御する変異を同定した(図 8B)。また、細胞の生存性をミトコンドリアの活性を測定し検証したところ、FTDP 変異体の発現で顕著な細胞毒性が観察された(図 8B)。また、FTDP を発現した細胞を分画したところ、凝集性のタウの膜画分への異常な局在が観察された。

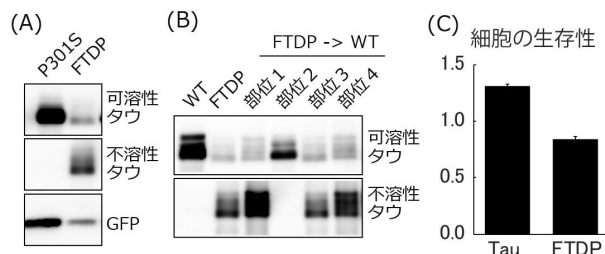


図 8 FTDP変異によるタウの凝集制御と細胞毒性

現在、これらの知見を活かし、薬剤探索用の細胞内凝集、毒性評価実験の構築や、変異部位から推定されるタウの変性メカニズムを細胞系、X1 欠損マウスを利用し検証を行っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 住岡暁夫, 添田義行, 高島明彦: Tau pathology regulated by membrane lipid. Society for Neuroscience 2014, Washington DC, 2014. 11.

(2) 住岡暁夫: 脂質によるタウ病変制御. タウ研究ミーティング, 京都, 2015. 9.

(3) 住岡暁夫: 脂質によるタウ病変制御. 日本分子生物学会年会日本生化学会大会 合同大会, 横浜, 2015. 12.

(4) 住岡暁夫: 神経変性因子 Tau の網羅的解析による毒性機序の研究. 分子生物学会 2018, 横浜, 2018. 11.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://nimd.env.go.jp/kakubu/kiso/sumioka.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。