

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870209

研究課題名(和文) 神経細胞の過活動がネットワーク内のタウ蛋白リン酸化に及ぼす影響

研究課題名(英文) Neuronal activity promotes tau phosphorylation via enhancement of APP processing

研究代表者

春日 健作 (Kasuga, Kensaku)

新潟大学・研究推進機構・助教

研究者番号：70547546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病では、認知機能低下をきたす数年から数十年前には神経活動が亢進していることが報告されている。そこで研究代表者は、神経系培養細胞を用いて、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸により刺激を行った。アミロイド前駆体蛋白の β -セクレターゼによる切断が、神経活動依存性に亢進することを示唆する所見を認めた。このことから過剰な神経活動はA β 産生を亢進させると考えられた。研究代表者はこれまでに細胞外A β 依存性に細胞内タウ蛋白のリン酸化が亢進することを報告しており、アルツハイマー病の早期病態における神経活動亢進は、A β 産生の増加を介して細胞内タウ蛋白を過剰にリン酸化させる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia, which is pathologically characterized by extracellular deposits of β -amyloid (A β) and intracellular accumulation of hyperphosphorylated tau. Hippocampal neurons showing hyperactivity early in the disease course send those axons to the default-mode network where A β accumulates remarkably in the brain. A β is derived from amyloid precursor protein (APP) by sequential cleavages. Here we performed in vitro assay with murine neuroblastoma cells and rat cortical neuron primary cultures. After glutamatergic stimulation, we found that full length APP was reduced in a neuronal activity dependent manner. In addition, C-terminal fragments of APP increased after the stimulation, suggesting that the stimulation enhanced β -cleavage. We previously showed A β -dependent tau phosphorylation by using the coculture system. Taken together, neuronal activity may affect APP processing and tau phosphorylation in neuronal network.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 神経活動 アミロイド前駆体蛋白 A β タウ蛋白

1. 研究開始当初の背景

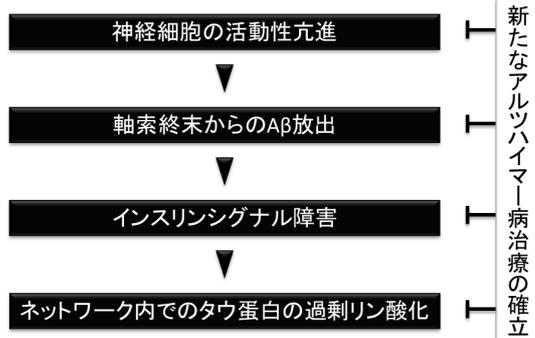
アルツハイマー病は病理学的に、アミロイド蛋白(以下 A)が神経細胞外に沈着した老人斑と、過剰にリン酸化されたタウ蛋白が神経細胞内に蓄積した神経原線維変化に特徴づけられる。A は神経細胞内でアミロイド前駆体蛋白(以下 APP)が、セクレターゼおよびセクレターゼによる切断を受け細胞外に放出される。A は神経細胞の活動亢進とともに細胞外に放出されることが報告されている。

研究代表者は2010年4月から2012年9月まで米国カリフォルニア大学サンディエゴ校神経科学分野で博士研究員として、脳内の特定の部位に APP を発現するトランスジェニックマウスを作成した。このマウスをもちいて、A は神経細胞の軸索終末より細胞外に放出されることを見出した。また研究代表者らは独自に構築した共培養システムを用いて、細胞外に放出された生理的濃度の A がインスリンシグナル障害を介してタウ蛋白の過剰リン酸化をひき起こすことを2012年に報告している。

以上から、A は神経活動の亢進により軸索終末から放出され、インスリンシグナル障害を介してネットワーク内の神経細胞におけるタウ蛋白の過剰リン酸化をひき起こすという仮説が想定される。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、申請者がこれまでに構築した共培養システムをもちいて、脳内ネットワークにおける神経細胞の活動亢進がアルツハイマー病におよぼす影響を明らかにし、新たな治療や予防法開発への研究基盤の確立が目的である。



さらに、てんかんを表現型とする家族性アルツハイマー病が報告されていることから、本邦における家族性アルツハイマー病の臨床実態の把握を目的にシステムティック・レビューを行う。

3. 研究の方法

(1) グルタミン酸による神経活動実験 培養細胞

ヒト野生型 APP を安定発現させたマウス神経芽細胞腫 Neuro2a(N2a)細胞、およびラット大脳皮質初代培養細胞を用いた。N2a 細胞は DMEM(Thermo Fisher Scientific)50 %、

OPTI-MEM(Thermo Fisher Scientific)50 %で調整した培養液に、FBS を終濃度 5 %を含む培養液を用いた。胎生 17 日のラット大脳皮質初代培養細胞は、酵素液(住友ベークライト)で神経細胞以外の細胞を取り除き、分散液(住友ベークライト)でラット大脳を細胞に分散した。DME/F-12 培地(Thermo Fisher Scientific)を改変した神経細胞用培養液(住友ベークライト)で細胞を再分散し、poly-D-lysineでコートした12ウェルのプレートを用いて培養した。その後、初代培養細胞を2週間培養した後に実験を行った。

グルタミン酸実験

神経細胞の活動を誘導させるため、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸(和光純薬)を用いた。N2a 細胞を6ウェルのプレートに継代して1日培養した後、終濃度が1mMになるようにグルタミン酸を添加し、0.5、1、2、4時間反応させた。その後、細胞上清を回収し、lysis buffer(5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 100 % NP-40, 10 % DOC, 500 mM EDTA)により可溶化し細胞溶解液を回収した。ラット大脳皮質初代培養細胞は2週間培養した後、培養液を交換し、24時間後にグルタミン酸10 μMを0.5、1、2、4時間反応させた。細胞上清を回収し、lysis bufferにより蛋白を可溶化し細胞溶解液を回収した。

切断阻害実験

切断阻害剤 L-685,458 (Sigma Aldrich)を終濃度1 μMとなるように培養液に添加し、4時間後にグルタミン酸刺激を行った。L-685,458 の陰性対照として DMSO(Sigma Aldrich)を使用した。

ウェスタンブロット解析

BCA Protein Assay Reagent キット(Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞溶解液の蛋白定量を行った。サンプルバッファー(1 M Tris-HCl, pH 6.8, 20 % SDS, -mercaptoethanol, Glycerol, 1%Bromophenol blue)を用いて、96 で3分加熱し熱変性させ、14000 rpmで1分遠心した。調整したサンプル(5 μg)をポリアクリルアミドゲル(和光純薬)にアプライし、Tris-glycine SDS バッファー(BioRad)で電気泳動を行った。泳動した蛋白を PVDF 膜(Millipore)に転写し、各一次抗体: 抗 APP 抗体(anti APP-CT, Sigma Aldrich)、抗 A 抗体(82E1, IBL)、抗 EGR-1 抗体(Cell Signaling)、抗 actin 抗体(I-19, Santa Cruz)と反応させた。HRP 結合二次抗体と反応させた後、ECL(Millipore)による発光を LAS 4000mini(Millipore)で検出した。ImageQuant TL により半定量化し、GraphPad Prism(MDF)による2way ANOVA 解析を行い、有意差を認めた場合 post hoc を Bonferroni で行った。

(2) 家族性アルツハイマー病のシステムティック・レビュー

2013年12月までに報告された優性遺伝性 AD

関連遺伝子 (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) 変異および *MAPT* 変異の日本人症例を PubMed および医中誌を用いて文献的にレビューした。遺伝子変異の情報に加え、記載のあるものに関しては、発症時年齢、初発症状、経過中に認められた認知症以外の臨床症状(精神症状、気分障害、錐体路症状・痙性対麻痺、錐体外路症状・パーキンソニズム、けいれん・てんかん)などの情報を抽出しデータベース化した。さらに発症時年齢、死亡時年齢、罹病期間および認知症以外の臨床症状の頻度に関し、原因遺伝子間で相違を検討した。

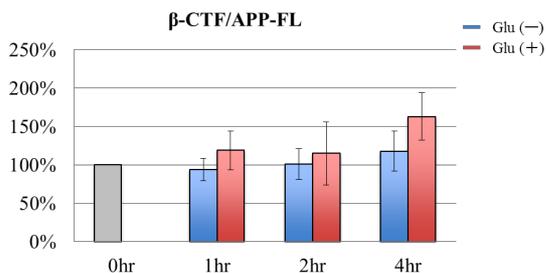
4. 研究成果

(1) グルタミン酸による神経活動実験

マウス神経芽細胞腫における神経活動依存性の APP プロセッシング

神経細胞興奮を誘導するためのグルタミン酸刺激の濃度及び反応時間の条件を検討した。N2a 細胞にグルタミン酸 1 mM 刺激を行い、0.5、1、2、4 時間反応させた。EGR-1 の発現量を神経活動の指標とした。EGR-1 の発現量はグルタミン酸刺激後 2 時間で最大に増加し、その後 4 時間での発現は低下した。この結果から、N2a 細胞の神経活動はグルタミン酸 1 mM で亢進させることが可能であり、また、神経活動の亢進は一過性であると考えられた。

上記のグルタミン酸による刺激条件を用いて、N2a 細胞における APP のプロセッシングを検討した。APP が切断されることで産生される C 末断片 (C-terminal fragment, -CTF) の発現を調べることで切断を評価した。-CTF は産生後、速やかに切断を受け分解されることから、切断阻害剤 L-685,458 (1 μM) を 4 時間反応させ後、グルタミン酸 1 mM を 1、2、4 時間反応させた。



全長型 APP の発現量に対する -CTF の発現量の比は、グルタミン酸刺激により増加する傾向を認めた(上図)。

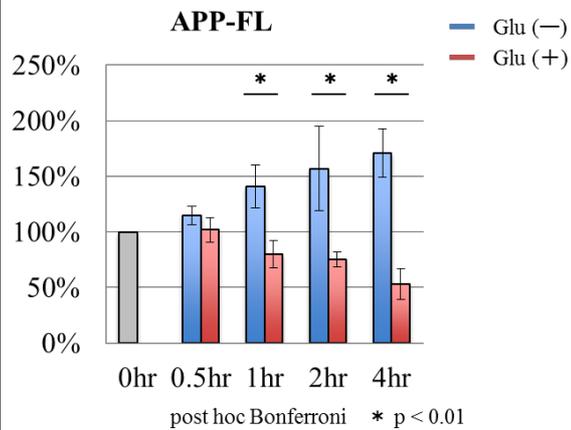
ラット大脳皮質初代培養細胞における神経活動依存性の APP プロセッシング

次に、ラット大脳皮質初代培養細胞を用いて、グルタミン酸による刺激実験を行った。胎生 17 日のラット大脳を 17 日間培養し、グルタミン酸 10 μM を、0.5、1、2、4 時間反応させた。神経興奮性マーカーである EGR-1 の発現は、N2a 細胞と同様にグルタミン酸刺激後 2 時間で最大値を示し、刺激後 4 時間で低下していた。

上記の刺激条件による APP のプロセッシン

グを解析した。

全長型 APP の発現はグルタミン酸刺激後 30

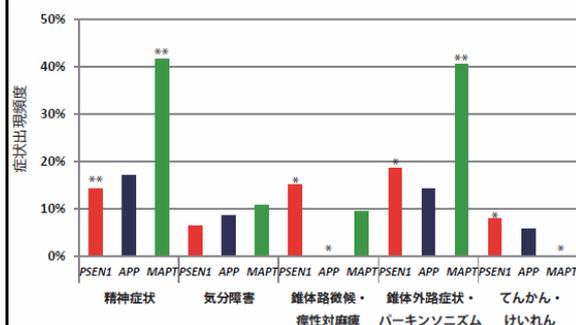


分から有意に減少していた(上図)。一方、切断阻害剤非添加下での APP-CTF の発現は刺激後 30 分で一過性に増加し、以降低下していた。

以上のこの結果から神経活動の亢進は切断の亢進を介して A 産生を増加させる可能性が示唆された。条件検討に時間を要したため本研究内では、共培養システムを用いた神経活動がタウ蛋白のリン酸化に及ぼす影響は解析を行えなかった。今後、本研究で得られた神経細胞の刺激条件をもとに、過剰な神経活動がネットワークにおける神経細胞のタウ蛋白リン酸化に及ぼす影響を検討する。

(2) 家族性アルツハイマー病のシステムレビュー

本邦からの報告をまとめると *PSEN1* 変異 40 家系 140 例、*APP* 変異 13 家系 35 例、*MAPT* 変異 29 家系 84 例を同定した。平均発症年齢は *PSEN1* 変異群 44 ± 8 歳、*APP* 変異群 54 ± 9 歳、*MAPT* 変異群 45 ± 10 歳で、*APP* 変異群が *PSEN1* 変異群および *MAPT* 変異群より有意に高齢であった。認知症以外の臨床症状に関して、精神症状、パーキンソニズムは *MAPT* 変異群に有意に多く、痙性対麻痺、てんかん・けいれんは *PSEN1* 変異群に有意に多かった。



これら臨床情報から database を作成、web 上で公開した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kasuga K, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A,

Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R, Ikeuchi T. Systematic review and meta-analysis of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17. J Hum Genet 2015;60:281-3. doi: 10.1038/jhg.2015.15.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) **春日健作**、菊地正隆、徳武孝允、手塚敏之、月江珠緒、原範和、宮下哲典、中谷明弘、桑野良三、池内健. 本邦における家族アルツハイマー病データベース(Japanese Familial Alzheimer's Disease database, JFADdb)の構築. 第 56 回日本神経学会学術大会. 2015 年 5 月, 朱鷺メッセ, 新潟.

(2) **Kasuga K**, Kikuchi M, Tokutake T, Nakaya A, Tezuka T, Tsukie T, Hara N, Miyashita A, Kuwano R and Ikeuchi T. Systematic review of Japanese familial Alzheimer's disease and FTDP-17. Alzheimer's Association International Conference 2015. 2015 July, Washington DC, USA.

(3) Saito K, **Kasuga K** and Ikeuchi T. Neuronal activity enhances APP processing in cultured neurons. Neuroscience annual meeting 2015. 2015 Oct, Chicago, IL, USA.

〔その他〕

Japanese Familial Alzheimer's Disease (JFAD) database

<http://alzdb.bri.niigata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 春日 健作(Kasuga, Kensaku)
新潟大学, 研究推進機構, 助教
研究者番号: 70547546