

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：32606

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26117004

研究課題名(和文) タウのタンパク質老化と毒性機序

研究課題名(英文) Mechanism of tau protein aging and neurodegeneration

研究代表者

高島 明彦 (Takashima, Akihiko)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：00154774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 193,500,000円

研究成果の概要(和文)：タウタンパク質は選択的スプライシングにより生じる3R、4Rタウは成体神経新生において異なる役割を果たすことが示された。認知症発症に神経新生が関与する可能性が考えられる。また、マーモセットはタウアイソフォームに関してヒトとは異なることが示された。タウは受容体のエンドサイトーシスに関与することが明らかになった。特に過活動している神経細胞ではタウによって受容体を減少させ過活動から神経保護を行なっている可能性が示唆される。この神経細胞のロバストネスが最終的にリン酸化タウの蓄積から病原タンパク質としての顆粒状タウオリゴマー形成へと連なる可能性がある。今後それらの点についてさらに研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウタンパク質は1975年微小管結合タンパク質として精製されて以来、その機能について全貌は明らかにされていない。アルツハイマー病の特徴的な病理像の一つとして神経原線維変化が見出され、この病理像を示す領域は臨床症状の責任病巣とよく相関する。主な構成成分が過剰にリン酸化されたタウである。近年、タウを標的とした治療法開発が注目を浴びている。この研究成果はタウタンパク質の新たな役割がシナプス機能にあること、顆粒状タウオリゴマーが病原タンパク質であること、タウアイソフォームは成体神経新生において異なる役割を果たすことを示しており、アミロイド以外の新たな認知症治療標的分子の探索に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Tau gene express six isoforms by alternative splicing. Among them, we appears that 3R and 4R tau play different roles in adult neurogenesis, which may cause the onset of dementia. Although rodents convert 3R tau to 4R tau in adult, but in adult humans, 3R tau is still expressed as much as 4R tau. In case of marmoset used as a human model, tau is different from human in terms of tau isoform expression in adulthood. Although tau is known as microtubule protein, our study revealed that tau is involved in receptor endocytosis as a synaptic protein. In particular, in hyperactive neurons, tau may decrease the number of receptor on post-synapse, and provide neuroprotection from neuronal hyperactivity. The robustness of this neurons may eventually be linked to the accumulation of phosphorylated tau to the formation of granular tau oligomers as a pathogenic protein. Further studies are needed for clarifying these points based on this conclusion for developing new therapy for dementia.

研究分野：タウタンパク質老化と神経変性機構

キーワード：タウタンパク質 A 老化 認知症 脳機能 凝集 リン酸化 神経細胞死

1. 研究開始当初の背景

タウタンパク質は選択的スプライシングにより6種類のアイソフォームを発現している。生理的環境下では主に軸索微小管上に存在し、その安定化に寄与していると考えられている。認知症を示す脳ではタウタンパク質は過剰にリン酸化され somatodendrite に蓄積し、凝集過程でシナプス消失、神経細胞死によって脳機能低下を引き起こす。病理像を示す領域は臨床症状の責任病巣とよく相関する。βアミロイドを標的とした認知症治療は失敗を重ねており、タウを標的とした治療法開発が注目を浴びている。しかし、このように健常時に生理機能を持つタンパクが老化に伴っていかに病原性を持つようになるのかは未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

タウタンパク質に関して微小管結合安定化以外の機能について全く明らかになっていない。認知症の治療を考える時に、この生理タンパク質がいかにして病原性を持つようになるかを明らかにする必要がある。この課題ではタウタンパク質の生理機能、特にこれまで明らかになっていない微小管安定化以外の生理機能について調べ、老化の初期過程である、タウタンパク質の somatodendrite への細胞内分布機構、タウ凝集機構、凝集に伴う神経細胞死機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タウの生理的な機能を 3R-タウと 4R-タウの異なる isoform ごとに明らかにする目的で、ヒトタウ isoform 特異的 knock-in マウスの解析を通じて評価を行った。具体的にはヒトタウ isoform (3R-tau および 4R-tau) が成体神経新生に与える影響について BrdU 取り込みアッセイをヒトタウ isoform 特異的 knock-in マウスに行った。同時に、タウ isoform (3R-tau および 4R-tau) に対するモノクローナル抗体の作成を行った。

(2) 各マウス脳より total RNA 画分を調整し、GeneChip および real time PCR による発現解析を行った。ラットまたはマウス海馬初代培養神経細胞を作成し、各種タウ cDNA を組み込んだレンチウイルスと tet-ON システムによる一過性発現系を確立した。発現させたタウについて、免疫細胞染色による局在解析、FRAP 法による外来生タウの動態解析を行った。リン酸化タウの組織学的検出については新鮮凍結切片を作成し、4% PFA による燻蒸固定、イオン性界面活性剤処理を行った後に抗体染色に供した。

(3) タウのリン酸化を Phos-tag 法を用いて解析した。Phos-tag 法は最近開発されたリン酸化タンパクを解析する簡便な方法であるが、タウのリン酸化に応用されていなかった。解析したタウの種類は、培養細胞へ発現させたタウ、マウス脳タウ、アルツハイマー病 (AD) モデルマウス脳タウ、ヒト正常脳タウ、アルツハイマー病脳タウ、マーモセット脳タウである。リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットと免疫染色も行なった。マーモセット脳で発現しているタウのアイソフォームについては PCR 法で解析した。

(4) 後シナプスに存在するタウについて海馬初代神経細胞を用いて刺激の有無による翻訳調節についてタウ mRNA の局在、mRNP、結合タンパクを調べた。タウ凝集機構はヘパリン誘導による in vitro タウ凝集系を用い、AFM, ThT、蔗糖密度勾配遠心法によって解析を行った。病原タウタンパクの決定は凝集阻害剤を in vitro タウ凝集系でスクリーニングし、見出された候補化合物をモデル動物に摂取させ、神経細胞数、行動変化によって決定した。

4. 研究成果

タウアイソフォームの生理的機能の解析

タウアイソフォーム (3R-tau および 4R-tau) を GFP および mCherry でそれぞれ蛍光タグ標識をしたヒト 3R-tau および 4R-tau を発現する AAV (AAV9) を作成し、6週齢のタウ KO マウスの両側海馬にそれぞれを導入したところ、4R-tau の過剰発現で海馬歯状回の doublecortin (DCX) 陽性の幼若ニューロンの減少を認めた。しかし 3R-tau の過剰発現で DCX 陽性細胞の変化は認められなかった。BrdU の取り込みを指標に adult neurogenesis について検討を行ったところ、4R-tau の過剰発現系では BrdU の取り込みが減少することがわかった。これは in vitro における neurosphere assay によっても再現され、4R-tau の過剰により neural stem cell の分裂能が抑制されることが海馬における adult neurogenesis 抑制の原因であることがわかった。

ヒト 3R-tau および 4R-tau のノックインマウスを宮坂グループより入手しタウ KO と掛け合わせ、ヒト 3R タウ、4R タウのみを生理的なレベルで発現するモデルマウスの作出を行った。これらのマウスは生存に問題なく1年を経過したマウス脳の解析では神経脱落なども確認されなかった。タウ KO マウスで若齢より確認されている体重増加について、ヒト 3R-tau および 4R-tau のノックインマウスではタウ KO による体重増加が解消されていることから、ヒト 3R-tau および 4R-tau がともに摂食量に関連する何らかの機能を有していると考えられた。

ヒトタウ isoform (3R-tau および 4R-tau) が成体神経新生に与える影響を評価するために、ヒト 3R タウ、4R タウのノックインマウス海馬歯状回における成体神経新生について、BrdU 取り込み法を中心にして研究を進めた。その結果、BrdU を取り込んだ成体新生神経細胞数はヒト 4R タウノックインのホモマウスでタウ KO マウスと比較して有意に減少を認めた。成体神経新生細胞の移動距離はタウ KO マウスで野生型と比較して有意に増加していたが、これはヒト

3R-tau KI、ヒト 4R-tau KI によっても変化を認めなかった。これまでに FUS およびその関連因子である SFPQ の機能喪失によって 4R タウが増加すると成体神経新生が抑制され、4R タウを特異的に抑制するとそれが改善されることを見出してきた。今回、4R タウノックインのホモマウスにおいて、有意に成体神経新生細胞数が減少することを見出したことは 4R タウが成体神経新生にネガティブに作用することを強く示唆するものである。またタウノックアウトマウスで移動距離増加していたことは、タウが微小管の安定化を促進することより、タウの喪失によって新生神経細胞の移動性が増加することを反映しているものと推測した。

タウの軸索局在機構

タウトランスジェニック (Tg)、ノックイン (KI) マウス脳におけるタウの局在を解析した。その結果、解析に用いた全ての Tg ラインにおいて、外来性のヒト型タウは軸索のみならず、細胞体、樹状突起に異常局在していた。これに対し、タウ KI マウスでは外来性ヒトタウは内在性マウスタウと同様に軸索局在していた。各タウの発現解析の結果、正常な軸索局在を呈するタウは、周産期をピークとして生後 2 週にかけて大きく減弱する発現パターンであること、成熟後の脳で異所性に発現されたタウは異常局在することを見いだした。異常局在したタウは微小管結合についても低下していた。以上の発現パターンとタウ局在の関係については初代培養神経細胞を用いた *in vitro* の系でも再現された。タウ病変はタウ Tg マウスにおいてのみ再現されることから、タウの異常局在が神経変性の初期過程であると考えている。構築した *in vitro* タウ局在解析系をもちいた解析の結果、タウの微小管結合能は軸索局在に対して負にはたらくこと、タウの PRR2 領域が軸索局在に重要であることを見いだした。また、PRR2 領域の適切なリン酸化がタウの微小管結合、軸索輸送を制御している可能性を見いだした。本解析系の有用性ととともに、新たなタウの軸索局在機構と現在でも謎である Slow Axonal Transport の解明につながると考えている。

Phos-tag 法を用いたマウス、マーモセット、ヒトタウのリン酸化解析

Phos-tag 法を用いると、培養細胞へ発現させたタウはリン酸化部位と数に応じて分離された。FTDP-17 変異を C 末側にもつタウでは、リン酸化のバンドパターンが正常タウとは異なっていた。JNPL3 (P301L 変異タウ遺伝子導入) マウスでは凝集タウの高リン酸化は確認されたが、可溶性タウは高リン酸化が起こっていなかった。正常なヒトでは個人差も多少見られたが、非リン酸化タウが予想以上に存在していることが明確に示された。マウスを低温処理するとアルツハイマー病 (AD) 脳の主要タウと同程度にリン酸化が亢進した。AD 脳ではブラークステージ V の患者で、高リン酸化が開始されていた。

マウスの脳発達期にはタウが高リン酸化されている。リン酸化とタウのアイソフォームの関連について解析した。生後直後の ON3R タウは生後 12 日~18 日に ON4R タウに変化した。同時にタウのリン酸化も低下した。甲状腺ホルモン合成阻害剤 (MMI) はマウス脳の発達を遅れさせたが、その時、リン酸化の低下 (脱リン酸化) も 3 日ほど遅れた。しかし、アイソフォームの変化には影響を与えなかった。

マーモセットは神経変性疾患の霊長類モデルとして期待されている。マーモセットタウの解析を行なった。生後直後には ON3R タウが、成体のマーモセットでは ON4R と 2N4R のタウが発現しており、ヒトとは異なり、成体では 3R タウの発現は見られなかった。生後直後でのタウはヒトやマウスでと同様に高リン酸化されていた。成体のマーモセットでは、死後直後に脳を PBS で灌流し、脳を 30 分以内に取り出したにも関わらずタウのリン酸化は低下しており、AD 脳で検出される異常リン酸化は検出されなかった。それでも、Ser202 と Ser404 はリン酸化されていた。

病原タンパクとしてのタウ凝集体

これまでの、タウ凝集研究からタウは最初に 2 量体を形成し、その後、オリゴマーとなり、このオリゴマーが β シート構造を持つようになると顆粒状構造物 (顆粒状タウオリゴマー) として不溶化し AFM で観察されるようになる。さらに、その後、タウ線維形成が起こる。顆粒状タウオリゴマー形成にはシステイン残基と PHF6 と呼ばれる領域が関与し、線維形成にはこれに加えて PHF6* の配列が必要であることを見出した。変異タウを発現するマウスモデルの解析では神経原線維変化は観察されなかったが、神経細胞死が起こることから、タウ線維ではなく顆粒状タウオリゴマーに神経毒性があると推測した。この仮説を説明するため顆粒状タウオリゴマー形成を阻害する化合物のスクリーニングを行なった結果カテコール骨格を持った化合物が共通に見出された。凝集阻害はカテコール核を持つ化合物がキノン体と変換した後タウのシステイン残基と共有結合することにより顆粒状タウ凝集体系生を阻害することが明らかとなった。この化合物を変異タウを発現するマウスモデルに投与すると神経細胞死の抑制と行動異常の改善が観察された。さらに、これまで報告されている FTDP-17 タウ変異の凝集形態について調べたところ、全ての変異体で共通に顆粒状タウオリゴマー形成が増大していた。これらのことから、顆粒状タウオリゴマーが病原タンパク質としてのタウ凝集体であると結論した。

Somatodendrite へのタウ分布機構とシナプスタウの役割

認知症神経細胞の最初期反応として知られるタウの somatodendrite への分布異常についてタウ mRNA に注目して研究を進めた。タウ mRNA は somatodendrite でシナプスタンパクであるグルタミン酸受容体や BDNF と同様に mRNA 結合タンパク質 Staufen や FMR1 などと複合体 mRNP を形成している。グルタミン酸刺激により局所翻訳が活性化しタウタンパクの量は 2 倍程度 somatodendrite で増大する。この時、GSK-3 β も同時に活性化されており、リン酸化タウの蓄積が somatodendrite で確認された。このことから、タウの somatodendrite 分布は神経過活動によって惹起されることが示された。また更に、変異 APP トランスジェニックマウスにおいても海馬神経の過活動が見出され、ヒト MCI においても海馬神経過活動が報告されており、神経過活動が神経変性の原因であることが示唆された。

タウは後シナプスにおいて刺激に対応して翻訳増大しており、シナプスタンパクとして何らかの役割を果たしていることが考えられた。これまでタウ KO マウスではシナプス長期抑圧が抑制されることを報告しており、タウのシナプスにおける長期抑圧に関与する機構を調べるためグルタミン酸刺激後の AMPA 受容体の 1 分子観察を行った。その結果、グルタミン酸刺激によって AMPA 受容体の移動速度は増大するがタウがないと細胞内への取り込みが阻害されシナプス外での AMPA 受容体の移動が阻害されることが明らかになった。これらのことは前年度に明らかになった神経過活動によるシナプス領域でのタウ翻訳増大と考え合わせることでシナプスにおけるタウの増大は AMPA 受容体を取り込み神経過活動を抑制する補償機構として作用し得ることが示唆された。

結論

タウタンパク質は選択的スプライシングにより 6 種類のアイソフォームが存在する。その内 3R, 4R タウの生理機能について成体神経新生において異なる役割を果たすことが示された。げっ歯類では幼若期には 3R タウが発現し成体になると 3R タウから 4R タウへと変換するがヒトでは成体においても 3R タウが 4R タウと同程度発現しており、FTDP-17 では 4R タウの増大が起こる変異が多数存在する。このことから認知症発症に神経新生が関与する可能性も考えられた。また、ヒトモデルとして使われているマーモセットでは幼若期には 3R タウが発現し成体になると 3R タウから 4R タウへと変換するためタウに関してはヒトとは異なる変化を示すことが明らかになった。

タウはこれまで微小管安定化に関与すると考えられてきたが、今回の研究からシナプスタンパク質として受容体のエンドサイトーシスに関与することが明らかになった。特に過活動している神経細胞ではタウによって受容体を減少させ過活動から神経保護を行なっている可能性が示唆される。この神経細胞のロバストネスが最終的にリン酸化タウの蓄積から病原タンパク質としての顆粒状タウオリゴマー形成へと連なる可能性がある。今後それらの点についてさらに研究を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 97 件)

1. Kubo A, Misonou H, Matsuyama M, Nomori A, Wada-Kakuda S, Takashima A, Kawata M, Murayama S, Ihara Y, Miyasaka T. Distribution of endogenous normal tau in the mouse brain. *J Comp. Neurol.* (2019) 527, 985, 査読有, DOI :10.1002/cne.24577
2. Furusawa K, Takasugi T, Chiu Y-W, Hori Y, Tomita T, Fukuda M, Hisanaga S. CD2-associated protein (CD2AP) overexpression accelerates amyloid precursor protein (APP) transfer from early endosomes to the lysosomal degradation pathway. *J. Biol. Chem.* In press. 2019, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.RA118.005385.
3. Ishigaki, S. and Sobue, G. (2018). Importance of Functional Loss of FUS in FTL/ALS. *Front Mol Biosci* 5, 44. 査読有, DOI: 10.3389/fmolb.2018.00044.
4. Miyasaka T, Shinzaki Y, Yoshimura S, Yoshina S, Kage-Nakadai E, Mitani S, and Ihara Y. Imbalanced expression of tau and tubulin induces neuronal dysfunction in *C. elegans* models of tauopathy. *Frontiers in Neuroscience* (2018) 12, 415. 査読有, DOI: 10.3389/fnins.2018.00415.
5. Tuerde D, Kimura T, Miyasaka T, Furusawa K, Shimozawa A, Hasegawa M, Ando A, Hisanaga S. Isoform-independent and phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mouse brain during postnatal development. *J. Biol. Chem.* 293: 1781-1793, 2018, 査読有, DOI: 10.1074/jbc.M117.798918
6. Ano Y, Ayabe T, Kutsukake T, Ohya R, Takaichi Y, Uchida S, Yamada K, Uchida K, Takashima A, Nakayama H. Novel lactopeptides in fermented dairy products improve memory function

and cognitive decline. *Neurobiol Aging*. 2018 Aug 6;72:23-31. 査読有, DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.07.016.

7. Sobue, G., Ishigaki, S., and Watanabe, H. Pathogenesis of Frontotemporal Lobar Degeneration: Insights From Loss of Function Theory and Early Involvement of the Caudate Nucleus. *Front Neurosci* (2018)12, 473. 査読有, DOI: 10.3389/fnins.2018.00473

8. Ishigaki S., Fujioka Y, Okada Y, Riku Y, Udagawa T, Honda D, Yokoi S, Endo K, Ikenaka K, Takagi S, Iguchi Y, Sahara N, Takashima A. Okano H, Yoshida M, Warita H, Aoki M, Watanabe H, Okado H, Katsuno M, Sobue G. Altered Tau Isoform Ratio Caused by Loss of FUS and SFPQ Function Leads to FTL-like Phenotypes. *Cell Rep*. 2017 Jan 31;18(5):1118-1131. 査読有, DOI: 10.1016/j.celrep.2017.01.013.

9. Shunsuke Kobayashi, Toru Tanaka, Yoshiyuki Soeda, Osborne F. X. Almeida, Akihiko Takashima. Local somatodendritic translation and hyperphosphorylation of tau protein triggered by AMPA and NMDA receptor stimulation. *EBio Medicine*. 2017 May 12. 査読有, DOI: 10.1016/j.ebiom.2017.05.012.

10. Soeda Y, Yoshikawa M, Almeida OF, Sumioka A, Maeda S, Osada H, Kondoh Y, Saito A, Miyasaka T. Kimura T, Suzuki M, Koyama H, Yoshiike Y, Sugimoto H, Ihara Y, Takashima A. Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. *Nat Commun*. 2015 Dec 16;6:10216. 査読有, DOI: 10.1038/comms10216.

[学会発表] (計 122 件)

1. Fujiwara H, Watanabe S, Iwata M, Nobuhara M, Wada-Kakuda S, Misonou H, Miyasaka T. Tubulin degeneration induces tau abnormalities. *Neuroscience 2018*, San Diego

2. Takashima A. AMPA/NMDA stimulation causes somatodendritic localization of hyperphosphorylated tau protein, EuroTau2018, Lille, France, 2018

3. Tuerde, D., Kimura, T., Miyasaka, T., Asada, A., Saito, T., Ando, K., Hisanaga, S. Phosphorylation and Isoform Expression of Microtubule-Associated Protein Tau are Regulated Independently during Brain Development. Asian-Pacific Society for Neurochemistry, Kuala Lumpur, Malaysia, 2016

4. Ishigaki S., Fujioka Y, Honda D, Yokoi S, Okado H, Watanabe H, Katsuno M, Sobue G, FTL-like phenotypes accompanied with aberrant adult neurogenesis are regulated by altered Tau isoforms in FUS-silenced mice, The 10th brain research conference Chicago, IL, 2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 7 件)

名称: 疾患モデル動物及び疾患治療剤

発明者: 祖父江元、石垣診祐、横井聡

権利者: 名古屋大学

種類: 国内出願

番号: 特願 2016-139308

出願年: 2016

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 3 件)

名称: タウ凝集阻害剤

発明者: 高島明彦、添田義行、長田裕之、井原康夫、宮坂知宏、杉本八郎

権利者: 国立長寿医療センター、同志社大学

種類: 国内

番号: 特許第 6353110 号

取得年: 2018

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：久永 眞市
ローマ字氏名：Shin-ichi Hisanaga
所属研究機関名：首都大学東京
部局名：理学研究科
職名：客員教授
研究者番号（8桁）：20181092

研究分担者氏名：石垣 診祐
ローマ字氏名：Shinsuke Ishigaki
所属研究機関名：名古屋大学
部局名：医学系研究科
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：40378170

研究分担者氏名：宮坂 知宏
ローマ字氏名：Tomohiro Miyasaka
所属研究機関名：同志社大学
部局名：生命医科学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90342857

研究分担者氏名：池川 雅哉
ローマ字氏名：Masaya Ikegawa
所属研究機関名：同志社大学
部局名：生命医科学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60381493

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：添田 義行
ローマ字氏名：Yoshiyuki Soeda

研究協力者氏名：住岡 暁夫
ローマ字氏名：Akio Sumioka

研究協力者氏名：御園生 裕明
ローマ字氏名：Hiroaki Misonou

研究協力者氏名：田口 明子
ローマ字氏名：Akiko Taguchi

※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。