

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08904

研究課題名(和文) ホモシステインが促進するアルツハイマー病・タウ蛋白オリゴマー形成機序の解明

研究課題名(英文) Homocysteine Increases Tau Phosphorylation, Truncation and Oligomerization.

研究代表者

白藤 法道 (Shirafuji, Norimichi)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：40529319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、高Hcy血症がタウの重合を促進し、アルツハイマー病の原因となる神経原線維変化形成に傾くことを明らかにした。GSK3、cdk5活性化またはPP2A不活性化を介してタウのリン酸化レベルを増加させ、カスパーゼ3の活性化によりC末端が切断されるタウを増加させた。Hcyが20Sプロテアソーム活性を低下させ、タウの分解を阻害し、総タウ量が増加させた。リン酸化・C末端切断型タウの増加は、タウの立体構造変化をきたし、神経細胞死、および神経原線維変化を促進した。このことから、ホモシステインを低下させることが、アルツハイマー病におけるタウオパチーの異常な神経細胞障害作用を緩和させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Hcy activated glycogen synthase kinase 3, a major tau phosphokinase, and inactivated protein phosphatase 2A, a main tau phosphatase. Hcy exhibited cytotoxic effects associated with enhanced activation of caspase. Truncation of tau in the C-terminus, the cleavage site of caspase3 (i.e., D421, detected by the TauC3 antibody) also was increased. Total tau, phosphorylated tau, as well as C-terminal cleaved tau were increased in the sarkosyl insoluble tau fraction. Hcy also increased the level of tau oligomers, as indicated by the tau oligomer complex 1 (TOC1) antibody that specifically identifies oligomeric tau species, in the tris insoluble, sarkosyl soluble fraction. The levels of TOC1-positive oligomeric tau were increased in brain lysate from HHCy mice.

These observations suggest that Hcy increases the levels of phosphorylated tau as well as truncated tau species via caspase3 activation, and enhanced tau oligomerization and aggregation.

研究分野：脳神経内科 認知症

キーワード：ホモシステイン タウ蛋白 神経原線維変化 タウオパチー

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症、嗜銀顆粒性認知症、Pick 病、第 17 染色体に関連するパーキンソンズを伴う前頭側頭型痴呆、Niemann-Pick 病 C 型、および慢性外傷性脳症は、タウオパチー群として知られている障害群である。それらは病理学的に修飾されたタウタンパク質の蓄積によって特徴付けられるからである。Hcy はシステインの同族体であり、メチオニン代謝の過程における中間体である。最近の証拠によれば、Hcy の上昇は、AD やパーキンソン病を含む神経変性疾患を引き起こす可能性を示唆している。高 Hcy 血症は、ヒトにおける灰白質の萎縮の原因でもあり得る。高 Hcy 血症はまた、脳卒中、および心筋梗塞の危険因子でもある。実際に、高 Hcy 血症は、DNA 破壊、内皮機能障害、酸化窒素活性の障害、酸化ストレス、アポトーシス、脳微小血管症のリスクとなっている。

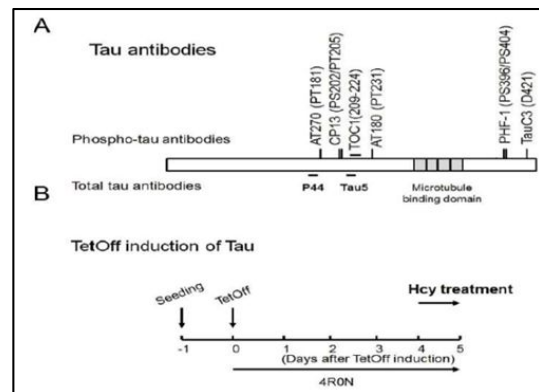
2. 研究の目的

高 Hcy 血症は、AD および血管性認知症をはじめとする認知症の危険因子である。しかしながら、高 Hcy 血症がどうして認知症のリスクを増加させるか機序は不明である。また、AD の病理学的特徴は、高度にリン酸化されたタウ蛋白の凝集体からなる神経原線維変化(NFT)である。Hcy とタウのリン酸化との間にこれらの関係があるにも関わらず、Hcy がタウのオリゴマー化およびタウの切断を促進するかどうかは不明である。タウのリン酸化および切断はタウ凝集体の形成を促進することができる。実際に、キナーゼおよびホスファターゼの調節障害は、神経変性を伴うタウオパチーおよび他の疾患の主要な影響因子として提唱されている。Hcy がタウ蛋白の重合化に及ぼす影響についてヒト野生型タウ(4R0N)を発現するヒト神経芽細胞腫細胞(M1C 細胞)、およびマウ

スのニューロンの初代培養を使用し検討した。さらに、タウオパチーモデルマウス(P301L)に高 Hcy 血症を誘導した検討も行った。

3. 研究の方法

ヒト神経芽細胞腫細胞(M1C 細胞)を用いて、Tet-off 誘導系により、ヒト野生型タウ蛋白(4R0N)を発現させた。Tet-off 誘導系によるタウを有する M1C 細胞のスケジュールは、0 日目に培地中のテトラサイクリン濃度を 2,000~1ng/ml に低下させることによってタウ発現の誘導を開始した。4 日目に L-Hcy(以下 Hcy)処理を開始し、5 日目に細胞を採取した。採取した細胞を、プロテアーゼ阻害剤および脱リン酸化酵素阻害剤を含むトリス緩衝液中で homogenize し、1 μ M エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)で洗浄し、1800 回転で 15 分間遠心分離して核および残屑を除去した。得られたサンプルに対して総タウ、リン酸化タウの変化をウェスタンブロット法、免疫組織化学法により検討を行った。



リン酸化タウは、リン酸化タウ抗体(PHF-1、CP13、AT270 および AT180)を用いて検討を行った。また、同様にタウ蛋白リン酸化酵素(グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 : GSK-3、サイクリン依存性タンパク質キナーゼ 5 : cdk5)および脱リン酸化酵素(プロテインホスファターゼ 2A : PP2A)の活性についても検討した。

タウ蛋白はカスパーゼ 3 により C 末端が

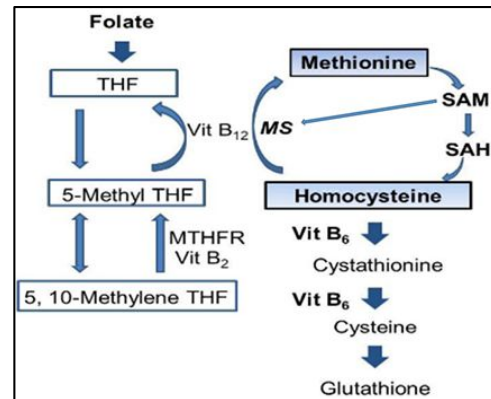
切断されると、凝集しやすくなる性質を有する。そこで Hcy 投与によるカスパーゼ 3 の活性化につき検討した。同時にカスパーゼ 3 による C 末端切断タウ(D421)の変化につき特異的抗体 (TauC3)を用いて検討した。

タウ蛋白は高分子量オリゴマーを経て、ポリマーとなり NFT を形成する。タウオリゴマーはトリス不溶性・サルコシル可溶性画分 (SN2) に存在し、タウポリマーはサルコシル不溶性画分 (S/P) に認められる。そこで画分法を用いて、SN2 および S/P のタウ蛋白を抽出し、その変化を検討した。さらに SN2 に関してタウオリゴマー特異的抗体 (TOC1)を用いたドットプロット法により検討した。Hcy がタウ蛋白の分解経路であるユビキチン-プロテアソーム系に及ぼす影響についても検討した。

M1C 細胞と初代培養マウスニューロン (SLC 会社の ICR マウス)を用いて、Hcy 投与による細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡で確認した。ATP assay による細胞生存率も検討した。また、Tet-off 誘導系を用いない M1C 細胞での内因性タウに対する Hcy の効果に関しても同様に検討した。

タウオパチーのモデルとしてよく特徴付けられた rTg4510 マウス (Jackson Lab, Bar Harbor, USA) を利用した実験を行った。変異型タウ (P301L) を発現するタウオパチーモデルマウス (rTg4510) に対し、ビタミンを含まない餌を摂取させた ($B_6 < 0.1 \text{ mg/kg}$, $B_{12} < 0.001 \text{ mg/kg}$, 葉酸 $< 0.2 \text{ mg/kg}$)。ビタミン B_{12} および葉酸欠乏は、Hcy からメチオニンへの代謝を阻害し、高 Hcy 血症を引き起こす。ビタミン B_6 欠乏症はまた、Hcy のシスタチオニンへの変換を阻害し、過剰な高 Hcy 血症を引き起こす。ビタミン欠乏食餌を投与することで高 Hcy 血症を誘導し (HHcy マウス)、タウオリゴマー量とカスパーゼ 3 活性について検討した。また、Hcy の中間代謝産物である SAM (S-adenosylme-

thionine) を投与し、Hcy の効果を打ち消すかについても検討した。同様に M1C 細胞に対する Hcy の効果が、葉酸投与により打ち消されるかについても検討した。



4. 研究成果

10~1,000 μM の Hcy 投与で、総タウおよびリン酸化タウはウェスタンブロット法において用量依存性に増加した。免疫組織化学法でも同様の結果が得られた。Hcy は主要なタウリン酸化酵素 GSK-3、cdk5 を活性化させた。同時にタウの脱リン酸化酵素である PP2A を不活性化させた。Hcy 投与によりタウ mRNA 量には変化がみられなかったため、Hcy は Tet-off 誘導系自体には影響を及ぼしていないことが証明された。

Hcy はカスパーゼ 3 を活性化するとともに、カスパーゼ 3 により切断された C 末端切断タウを増加させた。また Hcy 投与による経時的な変化に関し、1~4 日間投与群でそれぞれ比較したところ、リン酸化タウは 4 日間投与群で最も増加していた。一方 C 末端切断タウは 2 日間投与群で最大量となり、4 日間投与群でも高値を維持していた。

Hcy 投与により総タウ、リン酸化タウ、および C 末端切断タウ量は、トリス不溶性サルコシル可溶性画分 (SN2)、およびサルコシル不溶性画分 (S/P) の両者において増加していた。Hcy は SN2 のタウオリゴマー量も増加させた。TOC1 陽性オリゴマータウの増加は、免疫組織化学法でも確認された。Hcy 投与により、ユビキチンの増加が認め

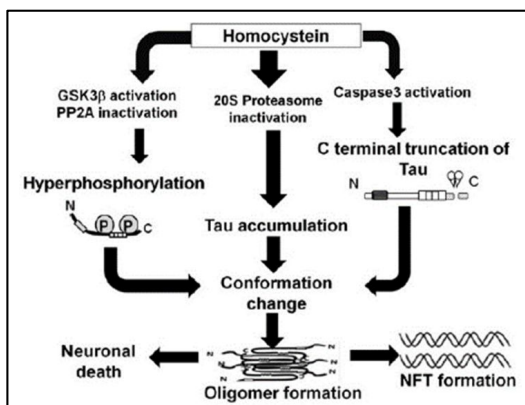
られ、かつ 20S プロテアソーム活性(キモトリプシン様活性)の低下が認められた。

M1C 細胞と初代培養マウスニューロンでは、Hcy 投与による細胞障害作用(細胞の収縮、細胞の不健全な形態、体面積減少、ATP assay 低下)が示された。

rTg4510 マウスである HHcy マウス脳では、TOC1 抗体陽性オリゴマー・タウ、およびカスパーゼ 3 の増加が認められたが、SAM の投与により、その効果は打ち消された。また M1C 細胞に対し Hcy を投与することにより増加した総タウは、葉酸投与により投与前の値まで回復した。

本研究で、高 Hcy 血症がタウの重合を促進し、AD の原因となる NFT 形成に傾くことを明らかにした。Hcy がタウの重合をもたらす機序として以下の経路が推察された。

GSK3 β 、cdk5 活性化または PP2A 不活性化を介してタウのリン酸化レベルを増加させた。カスパーゼ 3 の活性化とともに、カスパーゼ 3 により C 末端が切断されるタウを増加させ、タウオリゴマー化を促進させた。Hcy が 20S プロテアソーム活性を低下させ、タウの分解自体が阻害され、総タウ量が増加した。リン酸化タウ・C 末端切断型タウの増加は、タウの立体構造変化をきたし、総タウ量の増加とあいまってタウオリゴマー化を加速させ、神経細胞死、および NFT 形成を促進した。



高Hcy血症によりADに罹患しやすくなる機序の一つとして、Hcyがタウの分解経路を阻害するとともに、リン酸化タウ・C末端切断タウを増加させることにより、タウのオリゴマー化、および重合を促進することが関与している可能性が推察された。このことから、Hcyを低下させることが、ADにおけるタウオパチーの異常な神経細胞障害作用を緩和させることが示唆された。本研究者の結果は、葉酸、ビタミンB₆またはB₁₂欠乏によって誘導され得る高Hcy血症が、タウ、カスパーゼ活性化およびプロテアソーム機能の障害に影響するキナーゼおよびホスファターゼの誤調節を引き起こすことを示唆した。したがって、タウの蓄積が起こり、タウのリン酸化が増加し、カスパーゼ切断タウが出現し、タウオリゴマーが形成され、これらの全てが細胞毒性と関連する。我々の実験では、Hcy値を低下させることで、タウオパチーにおける異常な毒性タウ種の影響を緩和することができることを示した。

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1件)

Homocysteine Increases Tau Phosphorylation, Truncation and Oligomerization.

Norimichi Shirafuji, Tadanori Hamano,

Shu-Hui Yen, Nicholas M. Kanaan,

Hirotaka Yoshida, Kouji Hayashi,

Masamichi Ikawa, Osamu Yamamura, Masaru

Kuriyama, Yasunari Nakamoto

International Journal of Molecular Sciences 19:891;2018

[学会発表](計1件)

Homocysteine increases tau phosphorylation, truncation and oligomerization

Shirafuji N, Hamano T, Yen S-H, Nicholas

K, Yoshida H, Ikawa M, Hayashi K, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y

第 59 回日本神経学会学術大会 (ポスター)

2018.5 札幌

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
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

白藤法道 (SHIRAFUJI, Norimichi)
福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号：40529319

(2) 研究分担者

濱野忠則 (HAMANO, Tadanori)
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授
研究者番号：40334817