

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07087

研究課題名(和文) ヒトiPS、線維芽細胞から直接誘導された神経細胞におけるタウタンパク質の解析

研究課題名(英文) The expression analysis of Tau protein in hiPSC-derived neurons or directly converted neurons from fibroblasts

研究代表者

前田 純宏 (Maeda, Sumihiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70443025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：タウタンパク質の蓄積はアルツハイマー病を中心とする様々な神経変性疾患において確認されている現象であり、正常老化においても観察される。近年のマウスモデルに基づいて開発された薬剤の治験の失敗から、ヒトの疾患をヒト細胞を用いて modeling するが重要であると我々は考えている。本研究では、タウタンパク質の機能解析を行うための、induced pluripotent stem cell から神経細胞を誘導する系や、線維芽細胞から直接神経細胞を誘導する系の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウタンパク質の蓄積は、アルツハイマー病をはじめとする様々な神経変性疾患において観察されるのみならず、正常老化においても観察される現象であり、脳機能の年齢依存的な低下と深い関連性があるとされている。そのタウタンパク質の機能解析を、年齢依存的変化がキャンセルされた iPS 細胞由来神経、および年齢依存的変化が保存されている体細胞から直接誘導された神経において行うことは、年齢とタウタンパク質の機能異常を解明する上で、非常に重要な系であった。今後、この系を用いて、タウタンパク質の機能異常を解明し、その治療薬を開発出来れば、超高齢社会を迎える日本においては、社会経済的にも非常に大きな意味がある。

研究成果の概要(英文)：Tau protein accumulation is a pathological hallmark observed in various neurodegenerative diseases including Alzheimer's disease (AD). Tau accumulation at lesser extent is even observed in normal aging. Recent failures in the therapy development of AD based on mouse models implied the requirement of the pathomechanism validation using human cells for human diseases. Thus, we established neuronal cultures derived from human induced pluripotent stem cell or directly converted neurons from fibroblast to conserve the aging signature of the cells to model tau- and aging-dependent diseases including AD.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：タウタンパク質 神経変性疾患 老化 脳

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

1. 研究開始当初の背景

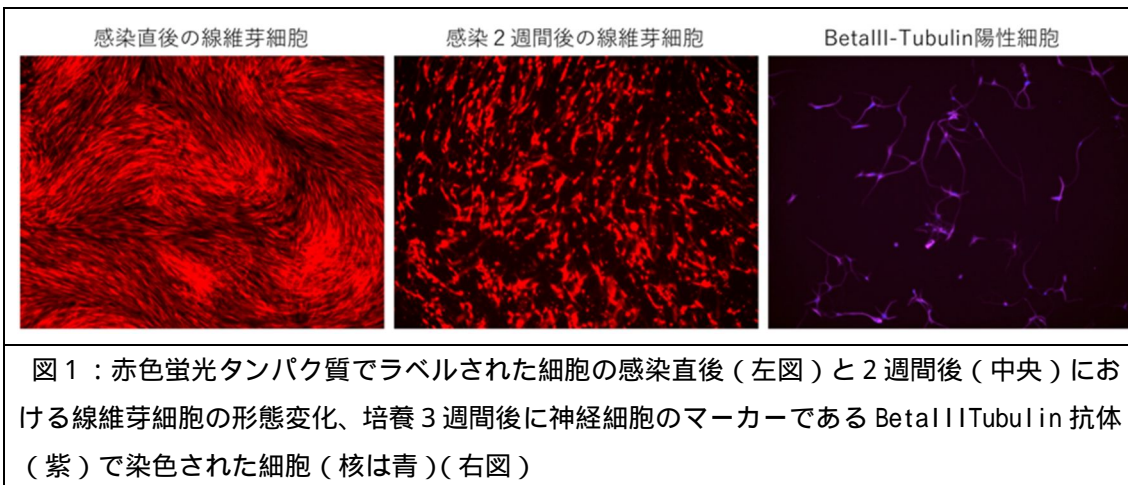
アルツハイマー病研究は主にマウスモデルを中心に進められてきたが、そのようにして治験に入った薬剤はことごとく失敗に終わった。この原因の一つが、マウス細胞とヒト細胞の違いであると考え、ヒト細胞を用いたアルツハイマー病の研究を目指した。ヒト細胞を用いた研究というと、iPS 細胞由来神経を用いた研究が主だが、induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)由来神経では、大人型 Tau isoform が発現しない事が知られており、大人型 Tau isoform の発現が、ヒト由来細胞を用いたアルツハイマー病研究には必須であった。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞、もしくは iPS 細胞を介さずに、ヒト体細胞から直接神経細胞へと誘導した細胞におけるタウタンパク質の発現解析を行う。また、タウタンパク質変異の影響も検討する。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞に、Neurogenin 2 (Ngn2) や microRNA(miR)9/124 などの神経誘導因子を導入し、stable cell lines を作成した。また、そのようにして転写因子で誘導する系と平行して、小分子を利用した Dual smad inhibition によって神経前駆細胞を誘導し、神経細胞培養培地にて、神経細胞へと分化させる手法も平行して使用した。さらに、コーティング条件や培地なども検討して、発現 isoform の解析を行なった。また、iPS 細胞化してしまうと老化依存的変化がキャンセルされてしまうと言われている。アルツハイマー病などのタウ関連疾患 (tauopathy) は全て老化依存的疾患であり、その点が問題視されていた。そこで、本提案では、体細胞から iPS 細胞を経ずに直接神経細胞へと誘導する系 (図 1) も用いて、発現解析を行なった。



また、研究開始当初は想定していなかったが、ワシントン大学から、タウ変異を持つ iPS 細胞、および線維芽細胞を導入する事が出来たので、タウ変異の影響をヒト細胞において検討する前に、まずは in vitro におけるタウタンパク質凝集系を用いて、各種タウ変異の影響も、原子間力顕微鏡観察等を通して検討した。

4. 研究成果

転写因子、もしくは、化合物を用いた誘導法の両者において、ヒト iPS 細胞から、神経細胞を誘導する事が出来た (図 2)。また、それらの細胞において、タウタンパク質が高発現している事も確認出来た。しかし、大人型 Tau isoform を特異的に検出すると報告されている抗体が、培地中成分とクロスしてしまうことが判明してしまった為に、条件を再度検討する必要性が出てきた。現在、そのような条件下で再度大人型タウの isoform の発現確認を行なっているところである。

ヒト iPS 細胞からの神経細胞誘導法と平行して、体細胞由来神経を誘導する為のレンチウィルスの開発に成功した。誘導後 20 日程度では、タウタンパク質自身の発現が認められなかった為、培養条件を最適化、および長期化する事によって、今後タウタンパク質の発現、および発現 isoform の確認を行う。

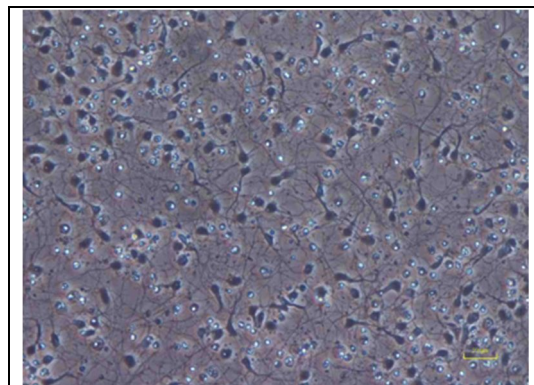


図 2 : ヒト iPS 細胞から小分子化合物によって誘導された神経細胞

また、今後タウ変異を持つ細胞から神経細胞を誘導するにあたり、in vitro におけるタウ変異の影響を評価した。その結果、試した全てのタウ変異がタウオリゴマー形成を促進すること、特

に P301L 変異においては、直径の小さなオリゴマーが形成されるなどの特徴があることなどが判明した。これらの変異の影響がタウタンパク質の凝集促進作用であり、その凝集体は神経毒性を発揮するという考えは、タウタンパク質凝集阻害剤(メチレンブルー)が治験で効果を発揮できなかったという報告と矛盾するように思われるが、他研究室との共同研究により、メチレンブルーはタウ線維形成を阻害するが、タウオリゴマー形成を逆に促進してしまうという結果によって説明することが出来た。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Soeda Y, Saito M, **Maeda S**, Ishida K, Nakamura A, Kojima S, Takashima A.
Methylene Blue Inhibits Formation of Tau Fibrils but not of Granular Tau Oligomers:
A Plausible Key to Understanding Failure of a Clinical Trial for Alzheimer's Disease. J
Alzheimers Dis. 2019; 68(4): 1677-1686. DOI: 10.3233/JAD-181001. Peer reviewed.
2. *Das D, ***Maeda S**, Hu B, Yu G, Guo W, Lopez I, Yu X, and Mucke L. Neuronal
levels and sequence of tau modulate the power of brain rhythms. Neurobiology of
Disease. 2018 June. *Co-first author, equally contributed. Peer reviewed. DOI:
10.1016/j.nbd.2018.05.020
3. **Maeda S***, Y Sato, A Takashima, FTDP-17 mutations enhance tau oligomer formation.
Neurobiology of aging. 2018 May. *Corresponding author. Peer reviewed. DOI:
10.1021/bi3010818
4. **前田純宏**. タウタンパク質研究における新たな潮流, オベリスク, 2018 年 1 月号. Vol 1,
1-5 査読なし
- 5.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. **Sumihiro Maeda**, Yuhei Sato, Akihiko Takashima, 2018 第 41 回 日本神経科学会 (ポスター
発表), Frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17 mutations enhance
tau oligomer formation
2. **Sumihiro Maeda**, 2018: Invited seminar at German Center for Neurodegenerative Disease (DZNE)
at Bonn. Oral, title: Aggregation-dependent and independent pathogenesis of tau protein
3. **Sumihiro Maeda**, 2018: Keio-Cologne Symposium on Aging and Longevity, oral, title:
Aggregation-dependent and independent pathogenesis of tau protein
4. **Sumihiro Maeda**, 2017: Tau meeting 2017, oral (Organizer), title : Epileptic activity caused by
soluble tau species
5. **Sumihiro Maeda**, 2017 Summer school of Keio university, King's college of London, Beijing
University, Karolinska Institute for 2017, oral, title: Aggregation-dependent and -independent
pathogenesis of tau protein

他 2 件

〔図書〕(計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：高島 明彦

ローマ字氏名：TAKASHIMA, Akihiko

所属研究機関名：学習院大学

部局名：理学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 00154774