様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ６ 月 １４ 日現在

機関番号：１２６０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０７０４０

研究課題名（和文）アルツハイマー病において早期に変化する分子の病態分子機構の解明

研究課題名（英文）Study of pathological protein phosphorylation changes in early-phase Alzheimer's disease

研究代表者
田川　一彦（TAGAWA, Kazuhiko）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：８０２４５７９５

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）：アルツハイマー病(AD)ではアミロイド仮説に基づきアミロイドβ(Aβ)抗体治療法などの開発が進められてきたが、臨床試験で認知症状の明らかな改善がこれまでには認められていない。アミロイド蓄積前の超早期ADにおける治療法の開発を目指して、申請者らはリン酸化プロテオーム解析によりAD病態タンパク質を同定した。本申請では当初AD病態タンパク質GAPDHに注目し研究を計画したが、同様にAD病態タンパク質であるMARCKS、SRRM2と、Aβ以外のトリガー分子として申請書にも記載したタウについて、分子病態の解明に進展がみられたので、研究計画を修正しそれぞれがAD分子病態に関与することを論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アミロイド仮説に基づいて開発が進められてきたADの治療法が臨床試験での成果が得られていないという学術的な問題に対して、アミロイド仮説の前後あるいは並行して起こる超早期のAD分子病態に基づいた治療法の開発を進めることで、我々は問題の解決を目指している。先行研究により同定したAD病態タンパク質の解析を進めることで、認知症のうち最も多いADの予防を含めた治療法の開発が期待できる。本研究の成果は、超高齢化社会を迎えた日本をはじめとし国際的にも高齢化と認知症問題の解決法の一端として社会的に重要な意義がある。

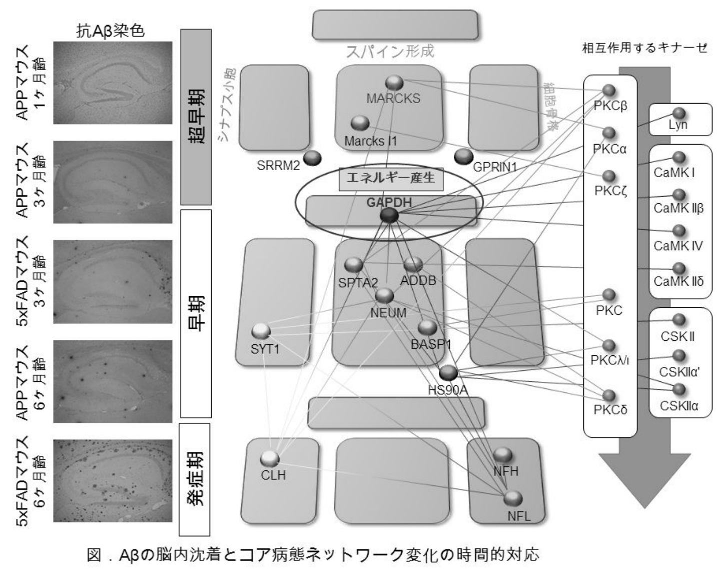
研究成果の概要（英文）：Alzheimer’s disease (AD) is defined by extracellular beta amyloid (Aβ) aggregates in human pathology. Therapeutic drugs were developed with the aim of removing extracellular Aβ aggregates. However, clinical trials of drugs designed to remove Aβ aggregates failed to recover memory and cognitive function in symptomatic AD patients. Our previous work, we found that the phosphorylation status of AD pathological proteins changes on phosphoproteome study in early phase of AD. We reported the molecular pathology of MARCKS and SRRM2 in AD. And our findings revealed a new tau phosphorylation-dependent mechanism in the pathology of non-tau FTLD (frontotemporal lobar degeneration) as common pathology with AD.

研究分野：分子神経病理学、生化学、分子細胞生物学

キーワード：アルツハイマー病　超早期病態　MARCKS　SRRM2　タウ　アミロイドβ　神経変性疾患

１．研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)は神経変性疾患であり、神経細胞外に蓄積するアミロイドベータ(Aβ)ペプチドである老人斑、神経細胞内に線維状に蓄積する過剰にリン酸化されたタウタンパク質である神経原線維変化、そして神経細胞死が病理学的な特徴である。Aβ はアミロイド前駆体タンパク質(APP)から膜タンパク質プロテアーゼである、β、γ-セクレターゼにより産生されたペプチドである。当初「アミロイド仮説」は、神経細胞外にAβ が凝集し、何らかの作用を神経細胞に及ぼし、細胞内でタウのリン酸化を引き起こし、タウ凝集が起き、細胞死を経て発症に至るとされた。しかし、その後の研究で可溶性Aβ オリゴマー（あるいはモノマー）によりシナプス機能障害がおこり [1]、ネットワークの障害から神経細胞死へと繋がると考えられている。この「アミロイド仮説」に基づきAβ 凝集あるいは産生をターゲットとする治療法の開発が進められている。ひとつは抗体によるAβ 凝集（老人斑形成）の抑制とクリアランスであり、もう一つは、β、γ-セクレターゼによるAβ 産生を抑制することである。凝集したAβ に対する抗体を用いた臨床試験結果に有効性は認められず、加えて患者治療群剖検脳においてAβ 抗体により老人斑が減少あるいは消失したにも関わらず症状が改善していなかった点は非常に注目すべき点である [2]。このことより、Aβ 凝集が発症メカニズムの最上流にない事が再確認され、凝集を取り除くことではAD病態を改善できないことを示している。この問題点については、Aβ抗体の標的を沈着したAβ ではなく可溶性Aβ モノマーやオリゴマーとすること、老人斑形成より以前の早期から投与を開始すること（家族性AD患者への早期投与など)、これらの検討により抗体療法の有効性が明らかになるであろう。もうひとつの戦略である β、γ-セクレターゼをターゲットとする治療法の開発も進められている。γ-セクレターゼ阻害剤のひとつが臨床試験まで進められたが、症状の改善は認められなかった [3]。γ-セクレターゼはNotchがAPP以外の生理的な基質である事が報告されており、これ以外にも γ-セクレターゼの生理的な基質の存在が推測される。一方、β-セクレターゼ（BACE1:β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1）はノックアウトマウスの研究より神経に関連した複雑な表現型（軸索ガイダンス異常、ミエリン形成不全、記憶欠損、スパイン密度の減少、神経発生異常、神経変性、てんかんなど）が明らかとなった。β-セクレターゼの基質には多くの報告があり、APP以外の基質による作用機序に基づく副作用が問題となっている [4]。β、γ-セクレターゼ共にAPPに対して特異的なプロテアーゼ活性阻害あるいはモジュレ－とする分子の開発が待たれるところである。以上のように現時点で既存ターゲットに対して有効な治療法が開発されていないことより、発症前あるいはAβ 凝集が開始される早期のAD病態を明らかにし、新たな治療ターゲットを探索することが最重要課題のひとつではないかと考えている。加えて、タウの過剰リン酸化カスケードにおいては過剰（異常）に活性化されたキナーゼが関与すると考えられており、AD病態を解明する上でタンパク質リン酸化を網羅的に解析することは非常に重要であると考えられる。我々はハイエンドな質量分析(MS)技



図．Aβの脳内沈着とコア病態ネットワーク変化の時間的対応

術を導入しリン酸化タンパク質を網羅的に解析するリン酸化プロテオーム解析と、得られたビックデータに公的データベースの膨大な情報についてスーパーコンピューターを用いて重ね合わせるシステムズバイオロジー解析を用いて、AD 治療法開発に直接繋がる AD 病態の分子メカニズムの解明に取り組み報告した[5]。
AD モデルマウス間の共通性とアミロイド仮説に基づき Aβ 蓄積を考慮した共通性により、変化するリン酸化タンパク質が 17 個抽出され、コア病態タンパク質とした（図）。この 17 個のコア病態タンパク質に PPI データベースの情報を加え病態ネットワークを構築すると、驚くべきことにそのうち 12 個が直接的に相互作用していた。このコア病態タンパク質は、AD 患者の死後脳において 8 個の変化が認められ、加えてアミロイド病態の下流に位置付けられるタウ病態モデルマウスにおいて 10 個の変化が認められた。このことより、超早期から発症後の晩期までに持続される異常シグナルであること、モデルマウスの AD 病態のみならずヒト AD 病態にも共通性を持つトランスレータブルな変化であること、Aβ のオリゴマー化あるいは凝集というアミロイド病態から、タウの過剰なリン酸化から神経原線維変化というタウ病態をつなぐ変化であることなどの複数の可能性が示唆された[5]。

２．研究の目的

先行研究により報告した超早期に変化する AD 病態タンパク質 MARCKS、SRRM2 と、Aβ以外のトリガー分子としての Tau を検討の対象として、AD における分子病態メカニズムを解明することを目的とした。これらの分子は治療法開発における超早期の分子作用点となりうる可能性が高いと考えている。本研究は AD の分子病態メカニズムに新しい知見を与え、治療法と予防法の開発に貢献することが目的であり、共通する分子病態を通して神経変性疾患研究にも貢献することが目標である。

３．研究の方法

ターゲット分子について生化学的、免疫組織化学的に AD の分子病態の解析を進め、得られた知見に基づいて２光子顕微鏡を用いた in vivo イメージングでスパイン病態を解析し、モデル動物での治療効果について行動解析を含め評価するという流れで進めてきた。

４．研究成果

当初の本研究計画ではアミロイドの出現と同時期の早期に変化が確認された GAPDH を当初のターゲットとして注目し取り組みを始めたが、AD 病態タンパク質として報告した MARCKS、SRRM2 と、申請書に織り込んだ Aβ以外のトリガー分子としての Tau について AD の分子病態研究に進展がみられたため、方向性を修正し進めた研究を報告する。
(1) AD コア病態タンパク質である MARCKS の 46 番目セリンのリン酸化が細胞外 HMGB1 の作用により亢進され、超早期アルツハイマー病態に関連する知見が得られ、抗 HMGB1 抗体投与により認知機能の改善された[6]。
(2) Aβ以外のトリガー分子として Tau あるいは家族性の前頭側頭葉変性症(FTLD)の原因遺伝子である TDP43，プログラニュリン(PGNR)等を検討の対象とすることを一部記載しており、こちらの研究について進展があり論文を発表した。家族性 FTLD の変異を導入した PGNR をノックインしたモデルマウスを樹立した。PGNR 変異型 FTLD のヒト病理では TDP43 タンパク質の脳内凝集が観察されるが、それより前にタウタンパク質の異常なリン酸化増加し、シナプルの障害を引き起こしていること見いだした。この異常リン酸化タウタンパク質によるシナプスの障害は

FTLD と AD に共通する病態と考えている[7]。

(3) AD 病態タンパク質 SRRM2 は、超早期に Ser1068 のリン酸化が異常に亢進した SRRM2 は核移行が妨げられ、神経細胞において RNA スプライシング関連タンパク質が減少していた。SRRM2 とのタンパク質―タンパク質相互作用があり、RNA スプライシング関連タンパク質でもある発達障害原因遺伝子 PQBP1 は、その減少がシナプス関連分子の発現量の大幅な変動を引き起こした。また、AAV-PQBP1 による PQBP1 の補充により AD モデルマウスの認知機能やスパイン病態は回復され、遺伝子治療の可能性を示した[8]。

＜引用文献＞

① Walsh DM, Selkoe DJ. Neuron. 2004;44(1):181-93.

② Holmes C, Boche D, Wilkinson D, et al. Lancet. 2008;372(9634):216-23.

③ Doody RS, Raman R, Farlow M, et al. N Engl J Med. 2013;369(4):341-50.

④ Yan R, Vassar R. Lancet Neurol. 2014;13(3):319-29.

⑤ Tagawa K, Okazawa H, et al. (2014) Hum Mol Genet. 24 (2): 540-558.

⑥ Fujita K, Tagawa, K, Okazawa, H, et al. (2016) Scientific Reports. 6:31895.

⑦ Fujita K, Tagawa K, Okazawa H et al. (2018) Nat Commun. 9(1):433.

⑧ Tanaka H, Tagawa K, Okazawa H, et al. (2018) 23(10):2090-2110.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　１４　件）

(*These authors contributed equally to this work.)

1. Fujita K, Homma H, Kondo K, Ikuno M, Yamakado H, Tagawa K, Murayama S, Takahashi R, Okazawa H. (2018) Ser46-phosphorylated MARCKS is a marker of neurite degeneration of PD/DLB pathology. *ENEURO*. 5(4)pii: ENEURO. 0217-18.2018. Published 2018 September 4. doi: 10.1523/ENEURO.0217-18.2018

2. Tanaka H, Kondo K, Chen X, Homma H, Tagawa K, Kerever A, Aoki S, Saito T, Saido T, Muramatsu SI, Fujita K, Okazawa H. (2018) The intellectual disability gene PQBP1 rescues Alzheimer's disease pathology. *Mol psychiatry*. 23(10):2090-2110 Published 2018 October. doi: 10.1038/s41380-018-0253-8.

3. Sato K, Kerever A, Kamagata K, Tsuruta K, Irie R, Tagawa K, Okazawa H, Arikawa-Hirasawa E, Nitta N, Aoki I, Aoki S. (2017) Understanding microstructure of the brain by comparison of neurite orientation dispersion and density imaging (NODDI) with transparent mouse brain. *Acta Radiologica Open*. 6(4) 1-6. Published 2017April 1. doi: 10.1177/2058460117703816.

4. Fujita K, Mao Y, Uchida S, Chen X, Shiwaku H, Tamura T, Ito H, Watase K, Homma H, Tagawa K, Sudol M, Okazawa H. (2017) Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a model of spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Commun*. 8(1):1864. Published 2017 Nov 30; doi: 10.1038/s41467-017-01790-z.

5. Irie R, Kamagata K, Kerever A, Ueda R, Yokosawa S, Otake Y, Ochi H, Yoshizawa H, Hayashi A, Tagawa K, Okazawa H, Takahashi K, Sato K, Hori M, Arikawa-Hirasawa E, Aoki S. (2017) The Relationship between Neurite Density Measured with Confocal Microscopy in a Cleared Mouse Brain and Metrics Obtained from Diffusion Tensor and Diffusion Kurtosis Imaging. *Magn Reson Med Sci*. Published 2017 Dec 7. doi:

10.2463/mrms.mp.2017-0031. [Epub ahead of print]

6. Fujita K, Chen X, Homma H, Tagawa K, Amano M, Saito A, Imoto S, Akatsu H, Hashizume Y, Kaibuchi K, Miyano S, Okazawa H. (2018) Targeting Tyro3 ameliorates a model of PGRN-mutant FTLD-TDP via tau-mediated synaptic pathology. *Nat Commun.* 9(1):433 Published 2018 Jan 30;. doi: 10.1038/s41467-018-02821-z.
7. Mao Y, Tamura T, Yuki Y, Abe D, Tamada Y, Imoto S, Tanaka H, Homma H, Tagawa K, Miyano S, Okazawa, H. (2016) The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing. *Cell Death and Disease.* Vol.7: e2207. Published online 28 April 2016. doi:10.1038/cddis.2016.101.
8. Taniguchi JB, Kondo K, Fujita K, Chen X, Homma H, Sudo T, Mao Y, Watase K, Tanaka T, Tagawa K, Tamura T, Muramatsu SI, Okazawa H. (2016) RpA1 ameliorates symptoms of mutant Ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair. *Hum Mol Genet.* 25 (20): 4432-4447. Published online 11 Aug 2016. doi: 10.1093/hmg/ddw272.
9. *Fujita K, *Motoki K, *Tagawa, K, Chen, X, Hama, H, Nakajima, K, Homma, H, Tamura, T, Watanabe, H, Katsuno, M, Matsumi, C, Kajikawa, M, Saito, T, Saido, T, Sobue, G, Miyawaki, A, Okazawa, H. (2016) HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Scientific Reports.* 6:31895. Published online 25 Aug 2016. doi: 10.1038/srep31895.
10. Mao Y, Chen X, Xu M, Fujita K, Sasabe K, Homma H, Murata M, Tagawa K, Tamura T, Kaye J, Finkbeiner S, Blandino G, Sudol M, *Okazawa H. (2016) Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology. *Hum Mol Genet.* 25 (21): 4749-4770. Published online 12 Sep 2016. doi: 10.1093/hmg/ddw303.
11. *Imamura T, *Fujita K, *Tagawa K, Ikura T, Chen X, Homma H, Tamura T, Mao Y, Taniguchi JB, Motoki K, Nakabayashi M, Ito N, Yamada K, Tomii K, Okano H, Kaye J, Finkbeiner S, Okazawa H. (2016) Identification of hepta-histidine as a candidate drug for Huntington's disease by in silico-in vitro-in vivo-integrated screens of chemical libraries. *Scientific Reports.* 6:33861. Published online 22 Sep 2016. doi: 10.1038/srep33861.
12. Yamanishi E, Hasegawa K, Fujita K, Ichinose S, Yagishita S, Murata M, Tagawa, K, Akashi T, Eishi Y, Okazawa H. (2017) A novel form of necrosis, TRIAD, occurs in human Huntington's disease. *Acta Neuropathologica Communications.* 5:19. Published 8 Mar 2017. doi: 10.1186/s40478-017-0420-1

〔学会発表〕（計　14　件）

1. 藤田 慶大、田川 一彦、岡澤 均 他 "Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a mouse model of spinocerebellarataxia type 1." 口演、第 59 回日本神経学会学術大会、2018.
2. 藤田 慶大、田川 一彦、岡澤 均 他「ハンチントン病における新規ネクローシス TRIAD の分子病態 (A novel form of necrosis, TRIAD, in Huntington's disease)」、口演、第 41 回日本神経科学大会、2018.

3. Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa 他"Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a model of spinocerebellar ataxia type 1" 口演、第 41 回日本神経科学大会、2018.
4. Hikari Tanaka, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa 他 "The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing"ポスター、第41回日本神経科学大会、2018.
5. 藤田慶大、田川一彦、岡澤均、他「アルツハイマー病と前頭側頭葉変性症に共通する異常タウリン酸化とシナプス障害」、ポスター、第 37 回日本認知症学会学術集会、2018.
6. Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他 "HMGB1, a pathogenic molecule that induces neurite degeneration via TLR4-MARCKS, is a potential therapeutic target for Alzheimer's disease" ポスター、第 40 回日本神経科学大会、2017.
7. Juliana Bosso Taniguchi, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他 "RpA1 ameliorates symptoms of mutant ataxin-1 knock-in mice and enhances DNA damage repair" ポスター、第 40 回日本神経科学大会、2017.
8. Mao Ying, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他"Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology" ポスター、第 40 回日本神経科学大会、2017.
9. Juliana Bosso Taniguchi, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他 "RPA1 AMELIORATES SYMPTOMS OF MUTANT ATAXIN-1 KNOCK-IN MICE AND ENHANCE DNA DAMAGE REPAIR" ポスター、合同開催：第 58 回日本神経学会学術大会・第 23 回世界神経学会議、2017.
10. Kyota Fujita, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他 "HMGB1 TRIGGERS NEURITE DEGENERATION VIA TLR4-MARCKS, AND IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET FOR ALZHEIMER'S DISEASE." ポスター、第 58 回日本神経学会学術大会・第 23 回世界神経学会議, 2017.
11. Mao Ying, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他 "Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology" ポスター、第 58 回日本神経学会学術大会・第 23 回世界神経学会議、2017.
12. 田川　一彦「網羅的リン酸化プロテオーム解析による早期 AD 病態の解明」(招待講演)、第 46 回日本神経精神薬理学会年会、2016.
13. Ying Mao, Kazuhiko Tagawa, Hitoshi Okazawa, 他"The hnRNP-Htt axis regulates necrotic cell death induced by transcriptional repression through impaired RNA splicing" ポスター、第 39 回日本神経科学大会、2016.

６．研究組織

(1)研究分担者　なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡澤　均

ローマ字氏名：OKAZAWA, Hitoshi

研究協力者氏名：藤田　慶大

ローマ字氏名：FUJITA, Keita