

令和元年6月17日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19057

研究課題名(和文)オートファジーによるtau病理の形成と伝播 そのメカニズムと意義の解明

研究課題名(英文)Autophagy-mediated tau pathology formation and propagation

研究代表者

梅田 知宙(Umeda, Tomohiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：70549790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内で生じるタウ凝集に選択的オートファジーシャペロン分子p62が関与することを示した。p62によって凝集したタウは、オートファジー機能の亢進に伴い細胞外へと分泌される。またタウ病理伝播動物モデルの作製に成功した。さらにオートファジー回復能を有する既存薬rifampicinを用いた抗認知症投与方を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出されたオートファジーのタウ病理形成への影響と、これらを抑制可能なrifampicinの薬効の発見は、既存医薬品のdrug-repositioningの有用性を示すとともに、他因子疾患ともいえる認知症に対してrifampicinが単剤でカクテル療法同等の効果を発揮可能であることを示している。今後臨床試験を経て、適応の拡大による臨床現場での使用を実現したい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that intracellular tau aggregation was associated by selective-autophagy chaperon p62. P62-mediated tau aggregates were secreted to extracellular space depend on autophagy activity. And we succeeded in the generation of tau pathology transmission model based on our WT htau-Tg mouse. Furthermore, we found that the well-known drug "rifampicin" works as the autophagy restoration agent and the intranasal administration of rifampicin shows highly protective effects on the phenotypes of Alzheimer's disease model mouse.

研究分野：神経科学

キーワード：ドラッグリポジショニング タウ リファンピシン

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

1. 研究開始当初の背景

加齢性認知症、アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症で共通に見られる特徴的病理変化 NFT は細胞質タンパク質である tau の不溶性凝集体である。近年、NFT は、凝集 tau が細胞間を伝播することで、病理領域を拡大することが明らかとなった。凝集 tau が細胞外へ分泌され、隣接する神経細胞に取り込まれ、取り込んだ細胞内で凝集核 (シード) として働くことで新たな細胞内凝集体を形成するという。しかし、このような神経病理の細胞間伝播における細胞内タンパク質凝集および凝集タンパク質の分泌メカニズムについては不明である。

2. 研究の目的

神経変性疾患では凝集タンパク質が神経細胞内に蓄積し病理変化を形成する。近年この凝集タンパク質が細胞間を伝播して病理の拡大を起こすことが明らかとなったが、これら病理の形成および伝播の意義は不明のままである。本研究では、神経変性疾患の多くで共通して見られる tau 病理 NFT (neurofibrillary tangle; 神経原線維変化) の形成メカニズムが、細胞のオートファジープロセスによる「毒性分子の不活性化」にあることを明らかにする。さらにこのオートファジー機能は、不活性化タンパク質を細胞外に分泌し病理伝播を生じさせることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Tau 凝集への p62 関与の検証

COS7 細胞にヒト tau 遺伝子を導入し、特に凝集性の高い変異 tau の導入によって、細胞内 tau 凝集体の蓄積を誘導し、その際の p62 分子の動態を免疫細胞化学および生化学的に解析する。さらに筆者自身の作製した tauopathy モデル Tau609 マウスを用いて同様の検証を行う。

(2) Tau 分泌へのオートファジー関与の検証

Tau 導入細胞からの tau 分泌が、オートファジー促進因子の共発現により亢進されることを確認する。さらにオートファジー機能の促進が tau 以外の病理関連分子の分泌をも誘導することを Tg2576 マウスを用いて検証する。

(3) Tau 病理伝播モデルマウスの作製

近年、マウス脳内に不溶性凝集 tau を注入することでこれが凝集核 (シード) として働き NFT 形成を誘導して tau 病理の伝播を生じさせる手法が多く報告されている (Clavaguera et al., Proc Natl Acad Sci. 110, 9535-9540, 2013)。本研究でもこれにならい、マウス脳海馬実質への不溶性凝集 tau 注入による病理伝播の手技を施す。前述の報告によると野生型マウスよりもヒト tau を発現する遺伝子改変マウスでより顕著な tau 病理伝播が観察されていることから、本研究においても著者自身が作製した遺伝子改変マウス Tau264 マウスを用いる (Umeda et al., Am J Pathol. 2013)。Tau264 と名付けたこの系統は、野生型ヒト tau のアイソフォーム 3R tau と 4R tau をヒトと同様に発現し、一切の病理変化を示さない。上記手法にならい Tau264 マウスに tau 病理の伝播を誘導する。

(4) オートファジー回復薬による認知症予防効果

本研究課題において見出されたオートファジー回復薬効を有する既存医薬品 rifampicin を、認知症モデル APP_{OSK} マウス (Tomiyama, Umeda, et al., 2010) に経口、経鼻、皮下にて投与を行い、脳内移行性、肝障害、認知機能障害、病理への影響について検証を行った。

4. 研究成果

研究代表者は、「分泌性オートファジー」という新たな機構を提唱し、これが神経変性疾患での細胞内タンパク質凝集と凝集タンパク質の分泌に寄与するものと考え、本研究では、1. Tau 凝集細胞モデルと tau 分泌の解析、2. tau 病理伝播マウスモデルの作製、3. オートファジー回復による抗認知症効果の検証を行った。

(1) Tau 凝集細胞モデルと tau 分泌

培養細胞系で tau 凝集を再現するため、COS7 細胞にヒト tau の野生型および V337M 変異を遺伝子導入した。細胞染色により野生型 tau 発現細胞での微小管結合 tau の正常な細胞骨格ネットワークを確認した (図 1)。一方変異 tau 発現細胞では細胞骨格ネットワークが消失し、代わりに dot-like tau が観察された (図 1)。生化学解析によりこれら dot-like tau が不溶性であることを確認した (図 2)。この結果は、変異 tau が細胞質中で不溶性凝集体として蓄積していることを示唆する。さらに p62 との共染色を行うことで dot-like tau に p62 が共局在していることを見出し (図 1) 生化学解析では tau の不溶性凝集に一致して細胞質画分の可溶性 p62 が不溶性画分へと移行したことを観察した (図 2)。これらの結果は、p62 が tau 凝集に寄与することを示している。実際に、著者自身の作製した tauopathy モデル tau609 マウス (Umeda et al., 2013) を用いてオートファジー因子を解析したところ、凝集 tau の細胞内蓄積と共に、p62 蓄積とオートファジーの異常亢進が検出された (図 3)。そこで、著者の発見した凝集阻害薬 rifampicin を投与すると、tau と p62 蓄積がともに消失した (図 3)。NFT 形成細胞でオートファジーによる tau の除去が滞っていることを確認した (Umeda et al., 2016)。

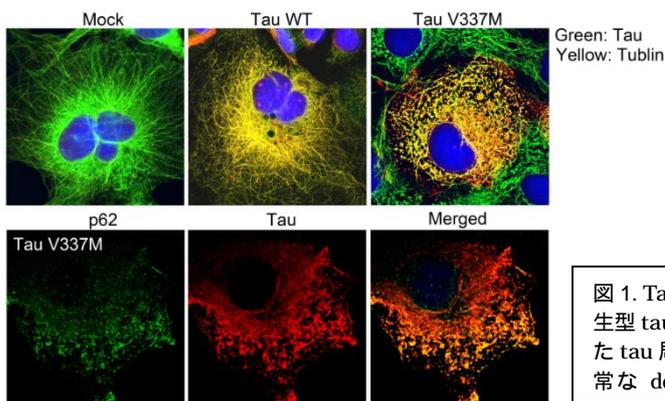


図 1. Tau 導入細胞における tau の細胞内局在。上) 野生型 tau 発現細胞では細胞骨格ネットワークに結合した tau 局在が観察されたが、変異 tau 発現細胞では異常な dot-like tau として存在している。下) この

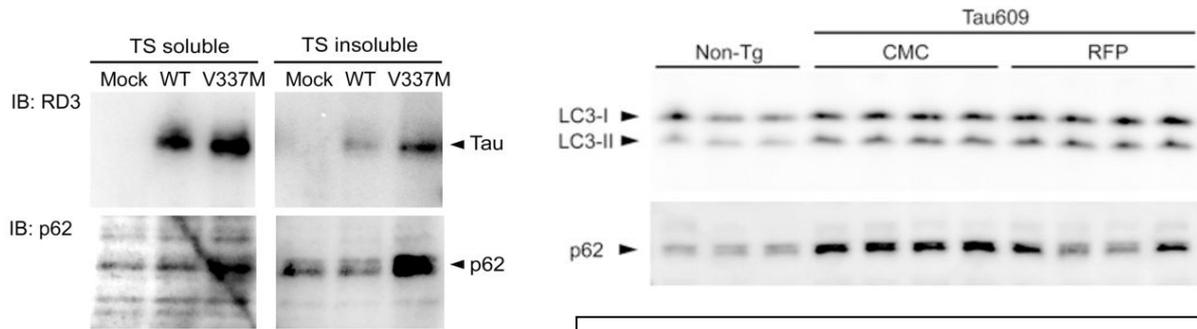


図 2. Tau 導入細胞の生化学解析。発現した変異 tau は不溶性凝集体として細胞内に蓄積しており、これは p62 の不溶化に一致している。

図 3. Tau609 マウス脳におけるオートファジー因子。上) Tau609 マウスでは LC3 発現が亢進し、さらに活性型の LC3-II が増加している。下) Tau609 マウスでは p62 の異常蓄積が見られるが、rifampicin 投与によってこれが解消する。

さらに、オートファジーの介在する tau 分泌を確認するため、tau 導入細胞の培養上清中から分泌 tau の検出を行った。その結果、オートファジーの tau 除去に寄与する GSK-3 の共発現が、その分泌を促進することを見出した(図 4)。この結果は、tau が通常条件で細胞外へと分泌されており、GSK-3 の制御する選択的オートファジーが標的分子 tau の分泌除去に寄与することを示唆している。

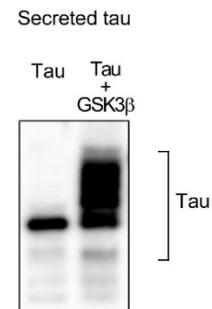


図 4. 変異 tau 発現細胞からの tau 分泌が、GSK-3β の共発現によって増加する

(2) Tau 以外の病理タンパク質の「分泌性オートファジー」による細胞外分泌

著者らは新しいオートファジー促進剤 X の開発に成功した (data not shown, 現在投稿中)。X を古典的 AD モデルマウス Tg2576 に対し投与を行った。その結果、Tg2576 マウスの神経細胞内に蓄積した A オリゴマーが減少し、その一方で細胞外に不溶性凝集体として蓄積した A が老人斑としてその増加が観察された。以上の結果は、オートファジー促進剤 X が分泌性オートファジーを亢進した結果、細胞内の毒性 A が細胞外へ排出され、細胞外において無毒化された A として老人斑を形成したものと考えられる。

(3) Tau 病理伝播マウスモデルの作製

著者自身の作製した野生型ヒト tau 発現モデル tau264 マウス (Umeda et al. 2013) を用い、AD 脳抽出物注入による病理伝播モデルの確立を試みた。注入後 1 ヶ月、2 ヶ月において脳切片を作成し、tau 病理について評価を行った。その結果、海馬苔状線維で異常リン酸化 tau を検出し、歯状回顆粒細胞層に Gallias 銀染陽性となるリン酸化 tau 蓄積細胞を観察したが、主たる tau 病理である NFT の典型的形態は認められなかった。注入後 1、2 ヶ月の時点では tau 病理 NFT の伝播形成が認められなかったことを踏まえ、さらに飼育期間を延長し、注入後 6 ヶ月での評価を行った。まず、注入後 6 ヶ月のマウスにおいてモリス水迷路試験を行い、これらの認知機能の評価を行った。その結果、注入群において有意な認知機能の低下を確認した。行動試験後、これらマウスから脳切片を作成し、tau 病理について評価を行った。その結果、海馬および嗅内皮質で異常リン酸化 tau の神経細胞内蓄積と、Gallias 銀染陽性となる NFT の形成を検出した。さらに、記憶障害および tau 病理の出現に一致して、海馬におけるシナプス消失と、神経細胞脱落の傾向を認めた。Tau 病理伝播モデルとして、分泌性オートファジーの検証に有用な

モデル系の確立に成功した。(data not shown, 投稿準備中)

(4) オートファジー回復薬による認知症予防効果

研究成果項目1において発見した既存医薬品 rifampicin のオートファジー回復薬効は、様々な毒性分子の関わる各種の認知症原因疾患に対し、幅広く予防的薬効を有するものと期待される。そこで申請時の予定を変更し、rifampicin の適応拡大による臨床応用に向けて、認知症モデルマウスを用いた検証を行った。鼻腔内への投与によって、経口投与よりも脳内到達量を増加させつつ、肝臓での初回通過効果を回避することで rifampicin の副作用である肝毒性を低下し、長期投与を可能にした(図5)。この際 rifampicin はモデルマウスの脳内病変を減少させ、認知機能を回復させた(図6)。これは drug-repositioning の有用性を示すものである (Umeda et al. 2018)。

Serum levels of liver enzymes after 1-month rifampicin treatment

	Non-Tg		APP _{OSK} mice			
	CMC	CMC	0.25		0.05	0.25
	Oral	Intranasal	Oral	Intranasal	Intranasal	Subcutaneous
	n = 10	n = 9	n = 12	n = 12	n = 11	n = 10
AST	74 ± 5	104 ± 13	248 ± 56*	189 ± 25	165 ± 32	72 ± 6
ALT	29 ± 1	35 ± 3	39 ± 5	45 ± 5	40 ± 10	29 ± 2

Abbreviations: AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; CMC, carboxymethylcellulose; SEM, standard error of the mean.

Note. Values represent the mean ± SEM (IU/L).

**P* < .05 vs. Non-Tg mice, CMC-treated Tg mice, and subcutaneous rifampicin-treated Tg mice by Tukey-Kramer test.

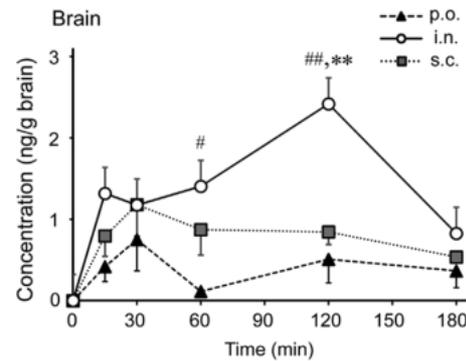


図5. Rifampicin 投与マウスにおける肝臓障害と脳移行性。左) 経口投与により誘導された肝臓障害が、経鼻および皮下投与では生じていない。右) 各投与経路における脳内移行性の違い。経鼻 rifampicin 投与によって最も高い脳内移行性が示された。

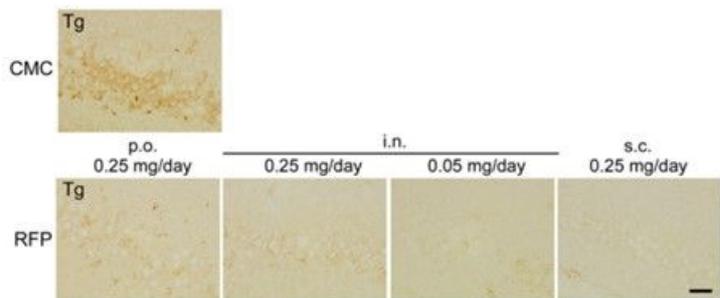
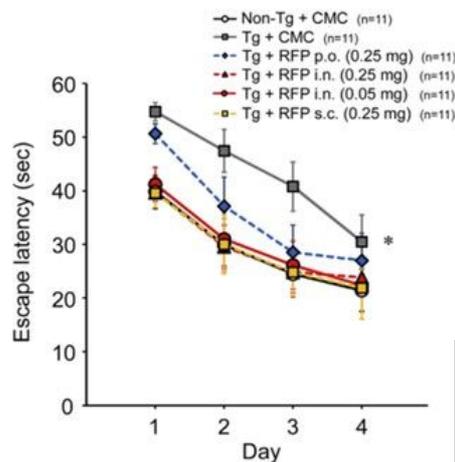


図6. Rifampicin 投与マウスにおける認知機能と脳内病理。左) モリス水迷路試験による認知機能評価。経口投与、皮下投与により APP_{OSK} マウスに見られる認知機能障害が改善している。右) アミロイドの細胞内蓄積。投与によって APP_{OSK} マウスの脳内アミロイド 病理が消失している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Umeda T, Tanaka A, Sakai A, Yamamoto A, Sakane T, Tomiyama T: Intranasal rifampicin for Alzheimer's disease prevention. *Alzheimers Diment: TRCI*. 4, 304-313, 2018. 査読あり. DOI: 10.1016/j.trci.2018.06.012
2. Umeda T, Ono K, Sakai A, Yamashita M, Mizuguchi M, Klein W, Yamada M, Mori H, Tomiyama T: Rifampicin is a candidate preventive medicine against amyloid and tau oligomers. *Brain*. 139, 1568-1586, 2016. 査読あり. DOI: 10.1093/brain/aww042

〔学会発表〕(計3件)

1. **梅田知宙**, 田中晶子, 酒井亜由美, 山本昌, 坂根稔康, 富山貴美. 経鼻リファンピシン - リファンピシンの新しい投与経路による認知症予防. 第37回日本認知症学会学術集会 (2018.10 札幌)
2. (シンポジウム) **梅田知宙**. Generation of Animal Models and Development of Anti-Dementia Medicines. 第60回神経化学学会大会 (2017.9.8 仙台)
3. **梅田知宙**, 小野賢二郎, 酒井亜由美, 山下港, 水口峰之, 山田正仁, 森啓, 富山貴美. 既存医薬品リファンピシンはオリゴマーを標的とする認知症予防薬の有望な候補である. 第36回日本認知症学会学術集会 (2016.12 東京)

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔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

該当なし

6. 研究組織

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

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。