

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07113

研究課題名(和文) タウオパチー神経変性疾患に特異的なタウのリン酸化解析と発症因子の解明

研究課題名(英文) Tauopathy Analysis of tau phosphorylation specific to neurodegenerative diseases and elucidation of pathogenic factors

研究代表者

木村 妙子(KIMURA, Taeko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・研究員

研究者番号：60748820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病を含むタウオパチーの病理的特徴は異常リン酸化タウを含む凝集体である。タウの部位特異的なリン酸化の役割は、生理的にも病理的にも明らかになっていない。本研究ではリン酸化を定量的かつ組み合わせ可能なPhos-tag法を用い、病理モデルとして有用性の高い、ヒトに類似した霊長類であるマーモセットでのタウのリン酸化の詳細な解析を行った。これは、非ヒト霊長類での応用研究に適応できると考えられる。また、複数のタウオパチー神経変性疾患患者における凝集性タウのリン酸化を詳しく解析し、各タウオパチー特異的なリン酸化アイソタイプを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本では高齢化が急速に進み、2025年には認知症患者数が700万人を超えると予測されている。そのため認知症の予防、診断、治療の開発が急務な課題となっている。アルツハイマー病(AD)など神経変性疾患では、発症原因に関わる病理変化は死後脳における確定診断として用いられているが、それらの臨床診断への応用は確立していなかった。本研究は、各タウオパチー神経変性疾患における凝集性タウのリン酸化状態を詳しく解析し、各タウオパチー特異的なリン酸化アイソタイプを同定する。そしてその形成メカニズムを探索し、リン酸化の制御を標的とした各タウオパチー特異的な治療開発に近づけるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Tauopathy is a group of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD), characterized by aggregates containing abnormally phosphorylated tau. The role of tau site-specific phosphorylation has not been clarified physiologically or pathologically. In this study, we used the Phos-tag method, which can quantitatively and combine phosphorylation, to perform a detailed analysis of tau phosphorylation in marmosets, which are primates similar to humans and are highly useful as pathological models. This may be applicable to applied research in non-human primates. In addition, the phosphorylation of aggregated tau in patients with multiple tauopathy neurodegenerative diseases was analyzed in detail, and the phosphor specific tau isotype to each tauopathy was clarified.

研究分野：神経化学

キーワード：タウ リン酸化 Phos-Tag SDS-PAGE マーモセット タウオパチー アルツハイマー病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、高齢者の認知症予防や治療が急務となっている。主な認知症であるアルツハイマー病(AD)の特徴は神経原線維変化と呼ばれる神経細胞内沈着物であり、その主要成分は異常にリン酸化されたタウである。異常リン酸化タウの蓄積が見られる疾患は他にも数多く知られており、それらは総称してタウオパチーと呼ばれている。ADの他に皮質基底核変性症(CBD)、進行性核上性麻痺(PSP)、ピック病(PiD)嗜銀顆粒性認知症(AGD)などがある。また近年、スポーツ選手が受ける脳外傷による慢性外傷性脳損傷(CTE)もその一つとなっている。また、家族性の前頭側頭葉型認知症(FTDP-17)ではタウの変異が原因となり、異常リン酸化、蓄積、そして神経変性が引き起こされることが明らかになっている。

異なるタウオパチーでは発病時期、病態に違いがあるが、これらはタウの蓄積箇所やリン酸化の違いによるものと考えられる。即ちタウオパチーを引き起こす理由を明らかにするためにはタウの異常リン酸化が起きる仕組みを解析することが重要と考えられる。

研究代表者は以前の研究により、リン酸化の組合せとリン酸化の総量を定量可能な Phos-Tag 法を用い、タウのリン酸化解析に応用した (Kimura et al., 2018 Front Neurosci)。 *In vitro* 培養細胞を用いた実験系から、タウリン酸化部位の全組み合わせを同定することで、主なアイソタイプの定量的リン酸化解析を可能にした。そしてタウには 12 の異なるリン酸化アイソタイプが存在し、主な部位は Thr181, Ser202, Thr231, Ser235, Ser404 であることを見出した (kimura et al., 2016 Sci Rep)。そして、この基盤を、マウス脳のリン酸化タウに適応させ、 *in vivo* タウのリン酸化も明らかにした。また、一部のタウオパチー患者におけるタウのリン酸化を、Phos-Tag による解析を行い、患者間で特徴的なリン酸化が起きていることを明らかにした (kimura et al., 2016 Am J Pathol)。

近年ヒトに類似した非ヒト霊長類での神経変性疾患研究がタウオパチー解明に向け、より良いモデルとして考えられている。たとえば、コモンマーモセットは、加齢に伴う神経変性疾患の病因を調査するための非ヒト霊長類モデルとして使用されてきている。しかしマーモセット脳でのタウの生化学的研究は行われていなかった。そこで、マーモセットの脳におけるさまざまなタウアイソフォームの発現とそのリン酸化状態を含む、タウのいくつかの重要な側面を調査した。また今回、以前の研究で解析しきれなかった様々なタウオパチー患者脳について、Phos-Tag 解析、そしてリン酸化抗体を駆使し特徴だったタウリン酸化を明らかにした。

2. 研究の目的

タウオパチーはタウの凝集体を病理とする一群の神経変性疾患である。タウの毒性が疾患の原因となっていると考えられるが、その実体は不明である。凝集タウは異常リン酸化されており、異常リン酸化を解明することはその毒性及び病理の解明につながると考えられる。これまでのタウのリン酸化研究は主としてリン酸化抗体により行われてきた。しかし、リン酸化抗体による解析では特定のリン酸化部位の相対的なリン酸化量の比較しか出来ず、全体のリン酸化量は評価出来なかった。本研究ではタウの異常リン酸化の実体を明らかにするため、リン酸化の組合せとリン酸化の総量を定量可能な Phos-Tag 法を用いて、タウオパチーにおけるタウのリン酸化解析を行うことで異常リン酸化の実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

非ヒト霊長類モデルとして、週齢の異なる 6 匹のコモンマーモセットを慶應義塾大学、理化学研究所

脳科学センターにて提供いただいた。生後 0 日目(P0)の新生児マーモセット 3 匹、1 歳 11 か月と 5 年 7 か月の成体雌 2 匹、4 年 8 か月の成体雄 1 匹を使用した。また、各ヒトタウオパチー(AD, CBD, PSP, AGD, PiD)脳は東京都健康長寿医療センターから提供していただき、側頭葉部位を Phos-tag 法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 非ヒト霊長類モデルであるコモンマーモセットタウのリン酸化解析

マーモセットタウの発現様式

哺乳類のタウは、N 末端の 11 アミノ酸の挿入が、チンパンジーとマカクでは見られるが、ウシ、ヤギ、ネコ、げっ歯類では見られないことから、「霊長類特有のモチーフ」と定義されている (Stefanoska et al., 2018)。マーモセットについて調べたところ、霊長類特有のモチーフ配列は存在しなかった。さらに、脳の発達とともに変化するタウアイソフォームの発現についても調べた。一般的にタウは、2 つの N 末端挿入部位の有無と、微小管結合領域を 3 つ (3R)、4 つ含むもの(4R)が存在している。ヒトとマウスの両方で、胚および出生後早期に 3R タウが発現し、ヒトの成体の脳では 3R と 4R の両方が発現される。それに対して、成体のマウスの脳では 4R アイソフォームのみが発現している (Takuma et al., 2003)。マーモセットの脳で発現するタウアイソフォームを明らかにするために、新生児および成体のマーモセット脳タウの mRNA 逆転写産物の cDNA を、N 末端挿入と微小管結合部位の繰り返しを含むプライマーを使用し、RT-PCR 法により調べた。結果、新生児マーモセットの脳では 0N3R のアイソフォームと、少量の 0N4R タウのアイソフォームが存在すること。成人マーモセット脳では 0N4R と 2N4R のアイソフォームが mRNA レベルで発現していることが明らかとなった。ここから、マーモセットのタウアイソフォームの発現パターンはヒトよりもマウスの発現パターンに類似していることが明らかとなった。

マーモセットタウの Phos-Tag 解析

マーモセットタウのリン酸化を解析するにあたり、ヒト、マウスタウとの比較を培養細胞発現系にて Phos-Tag SDS-PAGE により解析した。マーモセット、ヒト、およびマウスのタウは、9 つのアイソタイプが見られ、デンストメトリスキャンにより、それらのバンドパターンはほぼ同一であることが確認された。したがって、培養細胞によるマーモセットタウは、ヒトまたはマウスタウと同じ部位で同程度にリン酸化されることが示唆された。

次に、マーモセット脳でのリン酸化について、ヒト AD 患者タウとの比較を行った。タウの主要リン酸化部位を認識する抗体を使用したところ、成人マーモセットタウの Ser202 はヒトと同程度、Ser404 ではヒトよりは低量であるが、同様にリン酸化されていた。また、Thr231 と Ser235、そして S396 のリン酸化は、ヒトの脳では微量反応しか検出されなかったが、成人マーモセットではより検出された。タウは出生後早期に高度にリン酸化されていることが知られており、病理を呈するリン酸化と同程度であると考えられている。生後 5 日目 (P5) マウスタウと生後 0 日目(P0)マーモセットを比較したところ、Ser202 でマウスの約 60~70%、Ser404 で 45~55%の割合でリン酸化されていることがわかった。これらの結果は、神経変性疾患の潜在的に有用な非ヒト霊長類モデルであるマーモセット脳におけるタウの発現およびリン酸化の重要な特徴を明らかにした。これらの内容は 2019 年に J Biol Chem に掲載された。

(2) タウオパチー患者におけるタウのリン酸化解析とその意義

タウオパチータウの Phos-Tag 解析

さまざまなタウオパチーにおけるタウリン酸化のパターンを解析するために、Phos-tag SDS-PAGE による分離バンドのデンストメトリスキャンを行った。その結果、AD、PiD、AGD、および CBD 患者ごとに、ピークの異なる特徴だったバンドパターンを示した。これらの結果は、タウオパチーに疾患特異的なリン酸化パターンがあることを示唆した。次に、タウリン酸化の部位特異性を知るために、Ser202、Thr205、Thr231、Ser235、Ser396、および Ser404 リン酸化抗体を用いた解析を行った。PiD および AD 患者で、Ser202 が、健常者(NC)に比べて有意に高くリン酸化された。Thr205 では、AD 患

者で他の疾患患者よりも高リン酸化傾向であった。また、他のタウオパチー患者と比較して、AD 患者脳 Thr231 と Ser235 でより強い反応が検出された。AGD では Ser396 のリン酸化が、NC および CBD 患者よりも高度にリン酸化されていた。また、Ser404 でのリン酸化レベルは、タウオパチー患者と同じくらい NC で高かった。これらの結果は、各タウオパチーが異なるリン酸化プロファイルによって特徴付けられることを示した。

タウオパチーにおける cis p-タウと Pin1

タウのリン酸化の制御因子として、Pin1 という cis-trans イソメラーゼが知られている。これはタウのリン酸化 Thr231 に結合し、後ろのプロリンのペプチド結合を cis から trans に変えることで、脱リン酸化酵素が働きやすくなるというものである。研究代表者の以前の論文で、タウオパチーの1つである FTDP-17 型変異タウと Pin1 の結合が落ちるとい結果も報告している (Kimura et al., 2013)。また、AD では Pin1 の発現減少を伴う cis p(Thr231)-タウの増加が見られ、脱リン酸化の低下が起きていると報告されている(Kondo et al., 2015)。したがって cis p-タウが毒性初期ドライバーであると示唆されている。今回、さまざまなタウオパチーにおける Thr231 の病理学的リン酸化を検出するために、抗 cis p-タウ抗体を用いて免疫プロットした。結果、cis p-タウ抗体は AD と AGD 脳で強い反応があり、PiD 脳では検出されたが、NC と有意差はなかった。次に、タウオパチー患者の脳内の Pin1 の量を調べた。AD 患者は NC よりも抗 Pin1 抗体に対して有意に低い反応性を示し、これは以前の報告 (Lu et al., 1999) と一致していた。そして予想通り、cis p-タウ量に関連して、AGD 患者では他の患者よりも Pin1 量が低く検出された。対照的に、CBD および PiD 患者の脳は NC 脳と同じくらい Pin1 を含んでいた。これらの結果は、AD および AGD 患者における高レベルの cis p-タウが Pin1 の発現低下によって引き起こされることを示唆している。これらの結果は、タウがさまざまなタウオパチーで異なってリン酸化されることを示し、AGD および AD における高レベルの cis p-タウは、これらの疾患における病理学的メカニズムを示唆した。これらの内容は Neurobiology of aging の投稿に向け、リバイス中である。

研究代表者は、Phos-tag SDS-PAGE 法を用いることで生体内でのタウのリン酸化部位や組み合わせを定量的に解析する手法を独自に開発し、この手法を非ヒト霊長類モデルのコモンマーモセット、そしてタウオパチーヒト疾患に適用することで、異なる種、そしてタウオパチー間で特有なタウリン酸化アイソタイプを明らかにした。これは非ヒト霊長類モデルを用いた疾患モデルでの解析の基盤を作り、またタウオパチーリン酸化解析により異なる病理原因の手がかりとなる結果であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sharma G, Huo A, Kimura T, Shiozawa S, Kobayashi R, Sahara N, Ishibashi M, Ishigaki S, Saito T, Ando K, Murayama S, Hasegawa M, Sobue G, Okano H, Hisanaga SI.	4. 巻 26;294(30)
2. 論文標題 Tau isoform expression and phosphorylation in marmoset brains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 11433-11444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakamura M, Shiozawa S, Tsuboi D, Amano M, Watanabe H, Maeda S, Kimura T, Yoshimatsu S, Kisa F, Karch CM, Miyasaka T, Takashima A, Sahara N, Hisanaga S, Ikeuchi T, Kaibuchi K, Okano H	4. 巻 8;13(4)
2. 論文標題 Pathological progression induced by the frontotemporal dementia-associated R406W tau mutation in patient-derived iPSCs.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 684-699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sahara Naruhiko, Kimura Taeko	4. 巻 1007
2. 論文標題 Biochemical Properties of Pathology-Related Tau Species in Tauopathy Brains: An Extraction Protocol for Tau Oligomers and Aggregates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 435 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7816-8_26	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Gen, Matsumoto Kazuki, Kimura Taeko, Suhara Tetsuya, Higuchi Makoto, Sahara Naruhiko, Mori Nozomu	4. 巻 19
2. 論文標題 Tau Fibril Formation in Cultured Cells Compatible with a Mouse Model of Tauopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1497 ~ 1497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19051497	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Krishnankutty Ambika, Kimura Taeko, Saito Taro, Aoyagi Kyota, Asada Akiko, Takahashi Shin- Ichiro, Ando Kanae, Ohara-Imaizumi Mica, Ishiguro Koichi, Hisanaga Shin-ichi	4. 巻 7
2. 論文標題 In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 activity in neurons and brains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-09239-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tuerde D, Kimura T, Miyasaka T, Furusawa K, Shimozaawa A, Hasegawa M, Ando K, Hisanaga SI.	4. 巻 293
2. 論文標題 Isoform-independent and -dependent phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mouse brain during postnatal development.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 1781-1793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura T, Sharma G, Ishiguro K, Hisanaga SI	4. 巻 12
2. 論文標題 Phospho-Tau Bar Code: Analysis of Phosphoisotypes of Tau and Its Application to Tauopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Neurosci	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 木村 妙子、久永 眞市	4. 巻 61
2. 論文標題 複雑怪奇なリン酸化タンパク質タウのPhos-tag解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 電気泳動	6. 最初と最後の頁 49 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2198/electroph.61.49	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Taeko Kimura, Chie Seki, Kazuaki Sampei, Jun Maeda, Maiko Ono, Tetsuya Suhara, Ming-Rong Zhang, Naruhiko Sahara and Makoto Higuchi
2. 発表標題 [18F]PM-PBB3 PET imaging of Tau deposition in the tauopathy model mice. poster presentation.
3. 学会等名 The 29th international symposium on cerebral blood flow, metabolism and function. The 14th international conference on quantification of Brain function with PET. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村妙子
2. 発表標題 Phospho-Tau Bar Code: Analysis of Phosphoisotypes of Tau and Its Application to Tauopathy.
3. 学会等名 第40回日本生物学的精神医学会 第61回日本神経化学学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村妙子
2. 発表標題 タウモデルマウスを用いた新規タウPETリガンド[18F]PM-PBB3の有用性
3. 学会等名 新学術領域研究 脳タンパク質老化と認知症制御 第8回班員会議・第4回リトリート
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村妙子
2. 発表標題 タウモデルマウスを用いた新規タウPETリガンド[18F]PM-PBB3の有用性
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村妙子
2. 発表標題 Development of in vivo imaging platform for investigating pathological tau propagation
3. 学会等名 新学術領域研究「脳タンパク質老化と認知症制御」第2回国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 木村妙子, 久永眞市
2. 発表標題 複雑怪奇なリン酸化タンパク質タウのPhos-Tag解析
3. 学会等名 第68回日本電気泳動学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村妙子, 久永眞市, 長谷川成人	4. 発行年 2020年
2. 出版社 別冊B10 Clinica	5. 総ページ数 156
3. 書名 タウオパチー神経変性疾患と脳内炎症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	久永 眞市 (HISANAGA Shin-ichi) (20181092)	東京都立大学・理学研究科・客員教授 (22604)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------