

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06896

研究課題名(和文)新規アプタマーを用いたタウ凝集による認知症発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidating the Mechanism of Dementia Caused by Tau Aggregation Using a Novel Aptamer

研究代表者

添田 義行 (Soeda, Yoshiyuki)

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：10553836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複数の神経変性疾患において、タウタンパク質の線維状の凝集体が脳内に沈着する。線維形成前に生じる中間凝集体は多様な構造を持つが、その解明は十分に進んでいない。本研究では、タウ中間凝集体の病的意義を解明できるツールの開発を試みた。まず、アプタマーという一本鎖核酸に着目したが、期待するようなポジティブな結果は得られなかった。そこで、バックアップの抗体を用いて検討を行った結果、タウ中間凝集体に強く結合する抗体を同定した。さらに、細胞内で中間凝集体である顆粒状タウオリゴマーが形成する培養細胞を確立した。これらのツールを用いて今後は中間凝集体の病態意義の解明に取り組む。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会に伴ってアルツハイマー病等の神経変性型認知症は増加している。最近では、アミロイドを標的としたアルツハイマー病疾患修飾薬が上市されたことが大きなニュースになっており、この分野の高い社会的関心を反映している。本研究では、もう一つの認知症原因主要タンパク質であるタウに着目した。その上で、タウによる病態形成メカニズムの解明を行うため、中間凝集体に着目して、毒性との関わりを解明しうるツールの開発を行った。このように、この研究は、社会課題の枠組みの一つである認知症を示す病気の病態メカニズムに迫れるツールを開発しているという点で社会的意義と学術的意義を有していると考えている。

研究成果の概要(英文)：Fibrillar aggregates of tau protein are deposited in the brain in several neurodegenerative diseases. The tau aggregation intermediates that form prior to fibril formation have diverse structures, but their characteristics have not been well understood. In this study, I attempted to develop tools that elucidate the pathological significance of the tau aggregate intermediates. Initially, I focused on single-stranded nucleic acids known as aptamers, but did not obtain positive results. Therefore, I identified an antibody that binds strongly to the tau aggregation intermediates. Further, I have established the cultured cells that form granular tau oligomers, a tau aggregation intermediate, within the cells. Using these tools, I will now focus on elucidating the pathological significance of the tau aggregation intermediates.

研究分野：神経病態学

キーワード：タウタンパク質 中間凝集体 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

多くの神経変性疾患においてタウタンパク質が凝集し、線維化したものが明確な病理変化として観察される。様々のグループの解析から線維形成前に中間凝集体があることが存在し、線維より高い毒性を示すことが報告されてきた。一方、中間凝集体にも多様な構造があるが、多様な構造体と毒性の関わりは十分に解明されていない。

2. 研究の目的

一方、中間凝集体にも多様な構造があるが、本研究の核心をなす学術的「問い」は多様なタウ中間凝集体のうちどれが毒性を示すか?である。アプタマーは、一本鎖の核酸であり、複雑な立体構造をとることで標的分子に結合することで立体構造の阻害や機能阻害を発揮するとされる。私は多様な構造を持つタウ中間凝集体の特定のコンフォメーションを認識できるアプタマーがあると考え、アプタマーを用いて多様な構造体と毒性の関わりについて検討した。また、バックアップとして、抗体も用いた解析も併せて実施した。

3. 研究の方法

(1) アプタマーの作製

これまでの研究ではアプタマーとして RNA が用いられることが多いが、最近の研究ではこれまで考えられていたほど両者に違いはなく、一本鎖の DNA も RNA と同じ程度の機能性構造をとることが報告されている (Int J Mol Sci. 2018;19. pii: E470)。DNA は RNA と比較して安定性など多くの点で利点が多い。そこで、本研究では DNA アプタマーを使用するために 1 本鎖 DNA ランダムプールを調整した。

(2) タウ凝集阻害効果の検討

アプタマーや抗体によるタウ凝集効果を検討するため、チオフラビン T アッセイを行った。リコンビナントタウは凝集誘導剤としてポリアニオンであるヘパリンを加えることで凝集させることができ、凝集の程度はチオフラビン T 蛍光の増強に基づき判定することができる。そこで、これらの試薬とアプタマーや抗体を混合し、チオフラビン T 活性を観察することで凝集阻害効果を検討した。

(3) タウ凝集抗体による解析方法

タウ中間凝集体を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。リコンビナントタウから調整した中間凝集体との結合を dot blot 法で検討した。

(4) 細胞の解析方法

タウにオリゴマー形成ツールを融合させたタウ cDNA コンストラクトを作製した。培養細胞にこのコンストラクトを発現させ、生化学的な手法等を用いて凝集体形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) アプタマーを用いた検討

アプタマーは標的の特定形状にフィットして結合する。タウは凝集に伴ってコンフォメーション変化が起き、特定の配列が露出する。このことはアプタマー作製には、中間凝集体に共通の配列を標的にすれば良いことを示している。そこでまず本研究では、ある程度の幅を持たせた中間凝集体を抗原とした複数のタウ凝集抗体を作製し、さらにそのエピトープを同定した。その結果、タウ C 末端部位 (370-441 アミノ酸残基) が中間凝集体のエピトープであることを見出した。アルツハイマー病等の神経変性疾患で観察されるタウ線維のコア構造もタウ C 末端部位を含む (Nature 547, 185-190; Cell 180, 633-644.e612)。そこで次に C 末端ペプチド及び 1 本鎖 DNA ランダムプールを調整したし、その結合を観察したが、結合できる条件は見出せなかった。その一因として、この実験に使用した 370-441 残基は 72 アミノ酸から構成され、複雑な立体構造になり得り、アプタマーとの結合に負の影響を与えている可能性、またランダムプールに含まれる DNA が少なかったため、検出限界以下になってしまった可能性が考えられた。

そこで次に上述のような直接的な方法ではなく、間接的にアプタマーと凝集タウとの結合を観

察するため、アプタマー候補物質のタウ凝集阻害作用を検討した。その結果、アプタマーの候補物質はタウ凝集を阻害しないことが見出された。したがって、今回作製した候補物質の中にタウと結合できるアプタマーは含まれていない可能性が示唆された。

(2) 抗体を用いた検討

タウ凝集抗体の実験はアプタマーのバックアップとして確実に進めていた。具体的には、リコンビナントタウタンパク質を用いてタウを凝集させ、その後ショ糖密度勾配遠心法により様々な形態のタウ中間凝集体を得た。この中間凝集体それぞれとタウ凝集抗体との結合を観察した。その結果、小さいオリゴマーや線維に比べ、顆粒状タウオリゴマーという大きい中間凝集体に結合しやすいタウ凝集抗体(以下抗体と略す)を見出した(図1)。この抗体も使用して、研究を進めた。リコンビナントタウ凝集体を細胞に暴露すると、細胞毒性が起こることが知られている(J Neurosci. 2015;35(42):14234-50)。つまり、リコンビナントタウと抗体を混合した後、凝集反応をさせた反応物を細胞に暴露し、毒性を観察すれば、毒性に関わる中間凝集体を解明できると考えた。そこでまず、抗体処理によってリコンビナントタウが作る凝集体形成を抑制するかを検討した。しかし、抗体は凝集体の形成を抑制できなかった。したがってこのようなアプローチではない方法を今後は選択し、検討を進める。抗体がタンパク質を排除するには必ずしもタウ凝集体形成を阻害する必要はなく、タウ凝集体への結合をすれば良いと考えた。

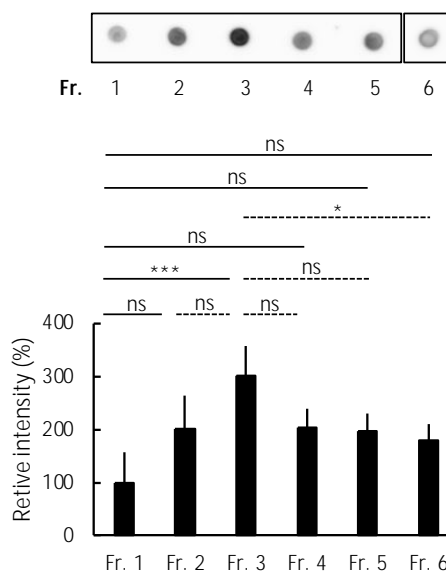


図1; タウ中間凝集体を認識する抗体の dot blot

(3) タウ中間凝集体を観察できる細胞の作製

上述の結果を受け、タウ凝集体を細胞内で強制的に作らせる細胞の作製を試みた。これまでに、Neuro2A細胞に様々なダブル変異体タウを一過性に発現させる実験を行い、P301L, S320F-タウの発現後にタウ凝集及び細胞死が観察される in cellulo の系があったため、その細胞を使用して実験を続けたが、凝集体形成の再現性があまり高くなかった。そこで、オリゴマーを形成するツールをタウに結合させ、強制的に細胞内で凝集させた。その結果、細胞内において界面活性剤に不溶性の凝集体が観察され(図2)。それは顆粒状タウオリゴマーという中間凝集体であった。これまでの研究から、顆粒状タウオリゴマーは神経細胞死に関わる可能性が示唆されており、本課題では初めて人工的な操作によって細胞内に顆粒状タウオリゴマーの形成をさせることに成功した。今後は細胞死との検討を上記の抗体を使って検討し、中間凝集体とタウとの関わりを解明する。

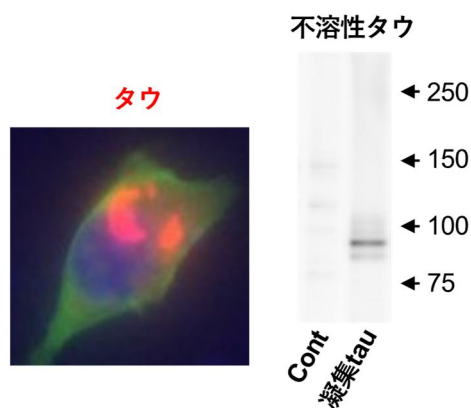


図2; 中間凝集体が観察される培養細胞

このように、本研究では、多様なタウ中間凝集体のうちどれが毒性を示すかの解明まで到達することはできなかった。しかし、その解明を行うためのツールの開発には一定の成果を得ることができた。また、アルツハイマー病を含む神経変性疾患では、タウの中間凝集体が異常に関わっていることが繰り返し報告されているが、そのメカニズムは不明であり、今一步創薬ターゲットになるという決定的な因子になりきっていなかった。本研究の遂行はこのような分野の知識蓄積の一助になっており、これから神経変性疾患治療薬の創薬を行う上で重要な一知見となったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Konishi F, Furusho T, Soeda Y, Yamauchi J, Kobayashi S, Ito M, Araki T, Kogore S, Takashima A, Takekoshi S	4. 巻 12
2. 論文標題 Administration of Mucuna Beans (Mucuna Pruriences (L.) DC. Var. Utilis) Improves Cognition and Neuropathology of 3×Tg-AD Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 996
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-04777-z.	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 Takaichi Y, Chambers JK, Takahashi K, Soeda Y, Koike R, Katsumata E, Kita C, Matsuda F, Haritani M, Takashima A, Nakayama H, Uchida K	4. 巻 9
2. 論文標題 Amyloid and tau pathology in brains of aged pinniped species (sea lion, seal, and walrus)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01104-3.	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 Koike R, Takaichi Y, Soeda Y, Takashima A	4. 巻 1
2. 論文標題 Memory formation in old age requires GSK-3	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging Brain	6. 最初と最後の頁 100022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.nbas.2021.100022	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 Yoshiyuki Soeda, Akihiko Takashima	4. 巻 13
2. 論文標題 New Insights Into Drug Discovery Targeting Tau Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Mol Neurosci	6. 最初と最後の頁 590896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnmol.2020.590896	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 Yuta Takaichi, James K Chambers, Kei Takahashi, Yoshiyuki Soeda, Riki Koike, Etsuko Katsumata, Chiaki Kita, Fuko Matsuda, Makoto Haritani, Akihiko Takashima, Hiroyuki Nakayama, Kazuyuki Uchida	4. 巻 9
2. 論文標題 Amyloid and tau pathology in brains of aged pinniped species (sea lion, seal, and walrus)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01104-3.	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 添田義行、高島明彦	4. 巻 53
2. 論文標題 タウ凝集体の役割と凝集阻害剤開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 月刊細胞 THE CELL	6. 最初と最後の頁 17-21
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 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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 添田義行
2. 発表標題 抗タウオパチー薬開発とタウオリゴマー
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会、シンポジウム11「ヒトと社会に役立つタウバイオロジー」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 添田義行 笠井淳史 源田公平 甲斐英隆 高島明彦
2. 発表標題 認知症最初期に起こる嗅内野機能低下を検出するVR-ゴーグルの開発
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------