

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：82502

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年度 ～ 2012 年度

課題番号：23700431

研究課題名（和文）選択的オートファジー経路は、過剰リン酸化タウへの神経細胞の応答を決定づけるのか？

研究課題名（英文）Pivotal roles of p62 and selective autophagy in tau deposition and consequent neurodegeneration revealed with tauopathy mouse models

研究代表者

小野 麻衣子（MAIKO ONO）

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・研究員

研究者番号：70595876

研究成果の概要（和文）：本研究は、不要なタンパク質などを分解する機構である選択的オートファジーとその関連タンパク質 p62 が、タウが引き起こす神経細胞死に密接に関与することを示した。p62 は細胞毒性を持つ異常なタウの分解を促進し、また、それらを神経細胞体に封入することで、タウの毒性から神経細胞を保護した。さらに、異常なタウを処理する p62 のキャパシティー不足が、異常なタウ蓄積下で神経細胞死を誘引することを示唆した。

研究成果の概要（英文）：In Alzheimer's disease, cytotoxicity exerted by abnormal tau is considered to be one of the main causes of neuronal death. Results from the present study indicate that selective autophagy and p62, a ubiquitinated cargo receptor mediating selective autophagy, are closely involved in neuronal death provoked by abnormal tau. p62 exerted neuroprotection against tau pathologies by eliminating nonfibrillar hyperphosphorylated tau species and sequestering hyperphosphorylated tau into cell bodies. Moreover, our findings suggested that insufficient capacity of p62 for processing of abnormal tau induces neuron death under tau accumulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：脳神経科学 神経解剖学・神経病理学

キーワード：タウ、p62、選択的オートファジー、神経細胞死、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の発症機序は未だ解明されていない。アルツハイマー病の病理学的特徴は、凝集・線維化したタウを主成分とする神経原線維変化と認知障害の原因となる神経細胞の脱落、および老人斑である。タウの異常は神経細胞死を引き起こすが、その詳細な機序は明らかではない。タウの異常により、微小管安定化作用というタウ本来の機能が損なわれることや、凝集したタウが細胞毒性をもつことで、神経細胞の変性が進むと推定されている。アルツハイマー病においても、神経細胞死の主因は過剰にリン酸化された

タウであると考えられ、アルツハイマー病における神経変性メカニズムを解明する上で、タウのリン酸化から神経変性に至るメカニズムを解明することは、非常に重要である。

p62 は、細胞内浄化のために恒常的に起こる選択的オートファジー（恒常的オートファジー）に関与するタンパク質である。ユビキチン化基質をオートファジーによる分解に誘導する役割を持つ他、自己オリゴマー形成能により、捕捉した基質を封入化していると考えられている。過剰にリン酸化されたタウはユビキチン化を受けることから、リン酸化タウの分解や封入に、p62 およびオートファジ

一が関与することが強く示唆される。

PS19 系統のヒトタウ突然変異導入マウスでは、[1]脳幹では神経原線維変化が多量に形成され、[2]海馬ではタウは蓄積するが神経原線維変化を形成せず神経細胞が脱落し、[3]その他の部位では顕著なタウ病理は発現しない。我々は、これらの部位の神経細胞では、p62 の挙動に違いが生じているという予備的な研究結果を得ている。この知見から、p62 を含む選択的オートファジーに関連する因子が、タウが過剰に存在する条件下で、神経細胞の応答の違いを生じさせると想定している。また、オートファジーを不能化した神経細胞は脱落することが報告されており、特にタウ病理における神経細胞脱落については、リン酸化タウの増加による恒常的オートファジーの破綻が、神経細胞脱落の一因となると考えている。

2. 研究の目的

異常なタウタンパク存在下で、神経細胞が①神経原線維変化を形成する、②形成せずに細胞死を起こす、③明らかなタウ病理を生じない、と異なる応答を示す要因を、選択的オートファジーによるタンパク質分解機構と、それらに過剰リン酸化タウを誘導する因子である p62 を中心に明らかにすることが目的である。タウ病理の発現を決定づける神経細胞内の環境的背景を特定し、タウのリン酸化から神経変性に至るメカニズムの解明に繋がる知見を獲得する。また、神経原線維変化形成あるいは神経細胞脱落における選択的オートファジーおよび p62 の役割を詳細に解析することで、タウ病理抑制ターゲットとしての可能性を模索する。

(1) タウ病理の発現と、p62 を含む選択的オートファジーに関連する因子との相関を明らかにする

一変異型タウへの応答の違いを生じさせる神経細胞内の環境的背景を特定するため、タウ病理の発現と、選択的オートファジーに関連する細胞内因子との相関を、PS19 系統ヒトタウ突然変異導入マウス (PS19 マウス) を用いて解析する。

(2) ヒトタウ突然変異導入マウスにおいて、p62 を欠損させた場合にタウ病理に生じる変化を検証する

一神経原線維変化形成あるいは神経細胞脱落における p62 の役割を明らかにするために、PS19 マウスにおいて p62 を遺伝的に欠損させた場合にタウ病理に生じる変化を解析する。

3. 研究の方法

(1) タウ病理の発現と、選択的オートファジーに関連する因子との相関の解析

一PS19 マウスの脳幹・海馬において、神経細胞内へのリン酸化タウの蓄積、神経原線維変化形成、神経細胞脱落を、免疫組織染色、ウエスタンブロット法、 β シート線維構造を認識する分子プローブの結合 (FSB) により調査してタウ病理の発現を評価し、以下の解析を行った結果との相関を調べる。

- ① p62 の蓄積量および神経細胞内局在をウエスタンブロット法、免疫染色法を用いて評価する。また、p62 遺伝子発現量の部位差を、リアルタイム PCR 法を用いて評価する。
- ② p62 と結合しているユビキチン化基質の組成を、溶媒性による分画およびウエスタンブロット法を用いて解析する。
- ③ オートファゴソームマーカーである LC3 タンパクを利用して、ウエスタンブロット法によりオートファジー活性を評価する。
- ④ 神経細胞内でのリン酸化タウの増加が恒常的オートファジーによるタンパク質分解機構の破綻を引き起こした場合、神経細胞内には恒常的オートファジーにより分解される物質が蓄積することが予想される。恒常的オートファジーにより分解される変性オルガネラをマーカーとし、これらの蓄積を免疫染色法により評価する。

(2) ヒトタウ突然変異導入マウスにおいて、p62 を欠損させた場合にタウ病理に生じる変化の検証

一p62 は、リン酸化タウの分解誘導や封入化を直接的に担うと考えられることから、PS19 マウスにおいて p62 を遺伝的に欠損させることにより、発現するタウ病理に変化が生じることが予想される。生じるタウ病理の変化を以下の方法により解析し、p62 がタウ病理の発現に果たす直接的な役割を明らかにする。

- ① p62 を遺伝的に欠損した PS19 マウス (PS19/p62-KO マウス) の脳幹・海馬において、ウエスタンブロット法、免疫染色法、分子プローブを用いて、神経細胞内へのリン酸化タウの蓄積、神経原線維変化形成、神経細胞脱落を評価する。
- ② 免疫染色法を用い、脳幹・海馬における神経炎症の変化を評価する。
- ③ ウエスタンブロット法を用い、p62 の欠損によりタウリン酸化酵素活性およびオートファジー活性に変化が生じるかを調査する。

4. 研究成果

本研究課題で、p62 が以下の働きによりタウ病理に対して神経保護作用を発揮することが明らかにされた。

- ・非繊維性リン酸化タウ分子種の蓄積を阻害する
- ・リン酸化タウの神経細胞体への封入を促進する
- ・変性オルガネラを封入体に隔離する

さらに、異常なタウを処理する p62 のキャパシティー不足が、異常なタウ蓄積下で神経細胞死を誘引することが示唆された。

(1) PS19 マウスのタウ病理

PS19 マウスの海馬では、神経細胞体へのリン酸化タウの蓄積や神経原線維変化形成はほとんど見られなかった。一方で、脳幹の神経細胞では、細胞体へのリン酸化タウの蓄積が多く見られ、神経原線維変化形成も形成された。海馬では神経細胞脱落を原因とする委縮とともに、放射層や網状分子層にディフューズな形態でリン酸化タウが蓄積していたが、脳幹ではこの形態でのリン酸化タウ蓄積はあまり見られず、神経細胞脱落も起こらなかった。

(2) p62 は神経細胞体へのリン酸化タウの封入を促進する

p62 の免疫反応性は野生型マウス脳幹の神経細胞でも観察され、PS19 マウス脳幹の神経細胞では、リン酸化タウの蓄積および神経原線維変化の形成に伴い、p62 の免疫反応強度が増加していた。一方野生型マウスおよび PS19 マウスの海馬錐体細胞では、神経細胞体での p62 の免疫反応性はほとんど観察されなかった。このことから我々は、ベースレベルで神経細胞体に局在する p62 が、神経原線維変化形成において中心的な役割を担うと考え、p62 を遺伝的に欠損した PS19 マウス (PS19/p62-K0 マウス) の脳幹での神経原線維変化形成を観察した。その結果、PS19/p62-K0 マウスの脳幹でも、PS19 マウスの脳幹と同程度の神経原線維変化が形成され、p62 は神経原線維変化形成に必須ではないことが判明した。

その一方で、PS19/p62-K0 マウスの脳幹では、PS19 マウスの海馬で豊富に観察された、神経細胞体外へのディフューズな形態でのリン酸化タウの蓄積が増加した。また、神経細胞体へのリン酸化タウの低密度な蓄積も観察された。これらの結果は、p62 がリン酸化タウの神経細胞体への封入を促進し、神経細胞体外へのディフューズな蓄積を阻害していることを示唆している。さらに、PS19/p62-K0 マウスの脳幹では、PS19 マウスと比較して神経炎症が亢進しており、神経細

胞体外へディフューズな形態で蓄積するリン酸化タウは、細胞毒性を発揮する可能性が示された。

(3) タウを処理する p62 のキャパシティー不足が、異常なタウ蓄積下での神経細胞死を誘引する

PS19 マウスの脳幹では、p62 が神経細胞体外へのディフューズなリン酸化タウ蓄積を阻害することで、神経保護作用を発揮することが示唆された。一方で、PS19 マウスの海馬では、ディフューズな形態のリン酸化タウの蓄積が豊富に起こり、大規模な神経脱落が生じていた。PS19 マウスの脳幹で見られた p62 による神経保護効果が海馬では低下している原因を解析するために、PS19 マウスの脳幹・海馬において、p62 の蓄積量を比較した。その結果、PS19 マウスの脳幹と海馬では、p62 遺伝子の mRNA レベルおよび可溶性 p62 蓄積量に有意な部位差は生じていなかった。

PS19 マウスの脳幹と海馬で生じるタウ病理の部位差は p62 蓄積量の差に起因しないことが示唆されたため、p62 とインタラクションを形成しているユビキチン化基質の部位差を、溶媒性による分画により解析した。その結果、PS19 マウスの海馬では、一部の p62 がリン酸化タウと同じ可溶性で高密度の分画に存在したが、多くの p62 が、リン酸化タウをほとんど含まずかつ多くのユビキチンを含む不溶性画分に存在した。一方脳幹では、この不溶性画分への p62 とユビキチンの溶出は、海馬と比較して顕著に少なかった。これらの結果は、PS19 マウスの海馬では、p62 はリン酸化タウ以外のユビキチン化基質とより多くのインタラクションを形成していることを示唆している。

PS19 マウスの海馬では、脳幹と比較して、リン酸化タウ以外のユビキチン化基質とインタラクションを形成している p62 の比率が高いことが示唆された。p62 が処理する基質に部位差が生じる原因を解析するため、野生型マウスの脳幹・海馬において、ユビキチンの蓄積量を比較した。その結果、海馬では脳幹と比較して、ベースレベルでより多くのユビキチンが蓄積していることが明らかになった。これは、海馬では脳幹と比較して、p62 が処理するユビキチン化基質がベースレベルで多く存在する可能性を示している。この環境的背景の差が、リン酸化タウを処理する p62 のキャパシティーに部位差をもたらすと考えられる。それにより、PS19 マウスの海馬では、p62 のタウ病理に対する神経保護作用が低下し、異常なタウ蓄積下での神経細胞死が誘引されることが示唆される。

(4) p62 は変性オルガネラを封入体に隔離する

PS19 マウスの海馬において、リン酸化タウ以外のユビキチン化基質と p62 との高いインタラクション性が示唆された。実際、PS19 マウスの海馬では、恒常的オートファジーにより分解される変性オルガネラのひとつであるペルオキシソームのマーカー、カタラーゼ、およびユビキチンと免疫染色的に共局在するが、リン酸化タウは含まない p62 陽性封入体が豊富に形成される。この p62 陽性封入体の形成は、PS19 マウスの脳幹では観察されなかった。また、PS19/p62-K0 マウスの海馬では p62 陽性封入体の形成は顕著に抑制され、この封入体の形成において p62 は重要な役割を担うことが示された。これらの結果は、PS19 マウスの海馬における、リン酸化タウ以外のユビキチン化基質と p62 との高いインタラクション性を支持するものであり、また、PS19 マウスの海馬では、リン酸化タウの増加により恒常的オートファジー機構の機能低下が生じている可能性を示唆している。

(5) p62 は非繊維性リン酸化タウ分子種の蓄積を阻害する

p62 は、ユビキチン化基質を選択的オートファジーによる分解に誘導する役割を持つことから、過剰にリン酸化されたタウの分解を促進することが期待された。実際、PS19/p62-K0 マウスの脳幹と海馬では、PS19 マウスの同部位と比較して、リン酸化タウの蓄積量が有意に増加していた。この時、オートファジー活性およびタウリン酸化酵素である GSK-3、CDK5 の活性に有意な群差は生じていなかった。これらの結果より、p62 はリン酸化タウの分解を促進することが示された。さらに、溶媒性による分画により、p62 が蓄積を阻害するリン酸化タウは、可溶性で高密度の分画に溶出する非繊維分子種であることが明らかになった。

さらに PS19/p62-K0 マウスの海馬では、PS19 マウスと比較して、神経脱落を原因とする萎縮が亢進することが明らかになった。可溶性タウオリゴマーや顆粒状タウオリゴマーは細胞毒性を示すことが知られている。p62 はこれらの分解を促進することにより、異常なタウの蓄積をもたらす神経細胞死に対して保護的な効果を発揮することが予想される。

本研究では、ベースレベルでのユビキチン化基質存在量の差が、p62 の示す神経保護機能に影響を及ぼし、発現するタウ病理に違いを生じさせることが示唆された。これは、神経細胞が持つ環境的背景が、異常なタウの処理に関与する機構を介して、異常なタウの蓄積に対する神経細胞の応答に影響を及ぼす可能性を示唆している。本研究で得られた知見に基づき今後は、環境的背景と、神経細胞

の異常なタウに対する応答との直接的な因果関係を実験的に検証することで、タウのリン酸化から神経変性に至るメカニズムの解明に繋がる知見の獲得を行う。

また、現在アルツハイマー病の根本的治療薬は発見されていない。本研究では、オートファジー関連タンパク質 p62 が、タウの蓄積が引き起こす神経細胞死に対して保護的な作用を発揮することが初めて示された。これは、アルツハイマー病を含む、異常なタウの蓄積を原因とする神経変性疾患に対して、それらの治療および予防ターゲットとしての p62 の有用性を示唆する結果である。今後は、p62 の活性化によるタウ病理の治療効果の検証を進めていく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) Maiko Ono, Bin Ji, Masaki Tokunaga, Masaaki Komatsu, Tetsuro Ishii, Tetsuya Suhara and Makoto Higuchi
Pivotal roles of p62 and selective autophagy in tau deposition and consequent neurodegeneration revealed with tauopathy mouse models
BRAIN 2013 2013 年 5 月 Shanghai China
- (2) Maiko Ono, Bin Ji, Masaki Tokunaga, Takeharu Minamihisamatsu, Masahiro Maruyama, Jun Maeda, Masaaki Komatsu, Tetsuro Ishii, Eiji Warabi, Toru Yanagawa, Tetsuya Suhara and Makoto Higuchi
Selective autophagy in neurons and its involvement in the tau pathogenesis
Alzheimer's Association International Conference 2012 2012 年 7 月 Vancouver Canada
- (3) Maiko Ono, Bin Ji, Masahiro Maruyama, Jun Maeda, Takeharu Minamihisamatsu, Tetsuya Suhara, Makoto Higuchi.
Selective autophagy in neurons and its involvement in the tau pathogenesis.
日本神経科学学会 第 34 回大会 2011 年 9 月 横浜

[図書] (計 1 件)

- (1) 小野麻衣子, 樋口真人
日本臨牀 認知症学 (上) - その解明と治療の最新知見 - 2011 年 64-68

[その他]
ホームページ等
<http://www.nirs.go.jp/seika/brain/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 麻衣子 (ONO MAIKO)
独立行政法人放射線医学総合研究所・分子
イメージング研究センター・研究員
研究者番号 : 70595876

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :