

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460893

研究課題名(和文) タウ蛋白オリゴマーが誘導するアルツハイマー病の分子機序の解明 臨床への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of Alzheimer's disease induced by oligomeric tau protein.

## 研究代表者

濱野 忠則 (HAMANO, TADANORI)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：40334817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病(AD)の主たる病理所見はタウ蛋白より形成される神経原線維変化である。タウオリゴマーが神経細胞死を惹起することが知られている。今回TET-OFF誘導系を導入した神経系細胞を用いた検討の結果、細胞画分法によりサルコシル不溶性画分に120kDa, 180kDa, 240kDaの分子量のオリゴマータウが形成されることをウエスタンブロット法により証明した。またタウオリゴマー形成によるcaspase3の活性化、ならびに生存細胞の減少効果を示した。また本細胞モデルを用いた解析により、2型糖尿病治療薬ピオグリタゾンによりリン酸化タウ、ならびにオリゴマータウが減少することが示された。

研究成果の概要(英文)：One of the pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD) is neurofibrillary tangle (NFT) which is composed of highly phosphorylated tau protein. It was shown that oligomeric tau causes neuronal cell death. We have demonstrated that neuronal cell models which express the wild type tau protein via TET OFF induction shows 120 kDa, 180 kDa, and 240 kDa oligomeric tau in sarkosyl insoluble fraction which was shown by Western blotting. It was also shown that oligomeric tau activates caspase3, and induces neuronal cell death. We have also determined that pioglitazone, PPARgamma agonist, decreased phosphorylated tau, as well as oligomeric tau.

研究分野：アルツハイマー病

キーワード：アルツハイマー病 タウ蛋白 タウオリゴマー 神経細胞死 ピオグリタゾン

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の急速な進行に伴い、アルツハイマー病(AD)患者数が急増している。ADの主たる病理所見は、アミロイドβ蛋白(Aβ)から構成される**老人斑**と、高度にリン酸化した**タウ蛋白**からなる**神経原線維変化(NFT)**である。タウは微小管に結合し、安定化させる生理的作用を有するが、ひとたび**GSK3β**によりリン酸化されるとコンフォメーション変化をきたし、微小管への結合能がなくなり、重合が開始する。また、**Caspase3の活性化**が細胞死を伴わず**タウのC末端の切断を生じ、タウ重合が開始**する。私達の研究成果を含め、ひとたび**Caspase切断タウ**が形成すると、C末端の保たれたタウモリクルトされ、タウ重合がより促進する (Nature 464:1201, 2010; Hamano et al., Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2: 561, 2009)。Aβオリゴマーによるタウ重合促進機構も推察されている (J. Neurosci. 30:1938, 2010)。

近年、NFTを形成する前段階の**タウオリゴマー**(図1)が**神経変性**、および**記憶障害**をきたすことが示された (J. Biol. Chem. 286: 23063, 2011)。また培養ニューロンに**タウオリゴマー**を加えるとCaが流入し、神経細胞死を生ずること (F.E.B.S. Letter 580: 4842, 2006)、変異タウ(P301L)を発現するマウスでは、**神経変性**、および**認知機能低下の程度とタウオリゴマー量は相関する**が、NFT量とは相関しないこと (J. Neurosci. 27: 3650, 2007)が判明した。また、AD剖検脳では正常者の4倍のタウオリゴマーが生じていた (F.A.S.E.B. J. 25: 1946, 2012)。このようにAD病態における**タウオリゴマー**の重要性がさらに強調されている。

## 2. 研究の目的

近年の疫学研究では、ADの危険因子は2型糖尿病 (Nat. Rev. Neurol. 6: 551, 2010)、脂質異常症をはじめとする生活習慣病であることが判明した。我々はTET-OFF誘導系により野生型タウ(4R0N)を発現する神経系細胞を用い、タウの分解系、および重合・リン酸化機構につき検討してきた。今までに**オートファジー・ライソソーム系の阻害によりタウオリゴマーの形成が促進すること**、そして、C末端の切断されたタウとfull lengthのタウがクロスリンクすることを明らかにした (Hamano et al., Eur J Neurosci 27: 1119, 2008)。さらに、AD治療法解明の一端として脂質異常症治療薬**スタチン**により、タウのリン酸化、重合が抑制されることを見出した。

## 3. 研究の方法

(1)TET-OFF誘導系により、野生型タウ(4R0N)を発現する神経系細胞を用い、以下1)~3)の誘因による**タウ蛋白オリゴマー形成**

**促進機序**につきウエスタンブロット法、および免疫組織学的に検討する。生活習慣病による酸化ストレスの増加、**Aβオリゴマー投与の影響**、**ライソソーム**、**オートファジー系の障害**(2)タウ合成ペプチドにより**タウオリゴマー**を作成し、培養ニューロンの培養上清中に添加し、アポトーシス誘導機構につき検討する。(3)2型糖尿病、脂質異常症をはじめとする生活習慣病治療薬がタウオリゴマーにより促進されたアポトーシス亢進、およびタウオリゴマー形成促進を改善するかの検討を行う。

## 4. 研究成果

タウオリゴマーが惹起する神経細胞死、タウ重合促進を誘導する分子メカニズムにつきTET-OFF誘導系細胞を導入した神経系細胞を用いて検討した結果、細胞画分法により抽出したサルコシル不溶性画分のウエスタンブロット法により120kDa, 180kDa 240kDaの分子量のオリゴマータウの形成に成功した。これらの分子はオリゴマータウを特異的に認識するTOC1(tau oligomer complex 1)抗体陽性であった。また、ドットプロット、および免疫組織化学的検討でもTOC1陽性となるタウオリゴマーの形成が証明された。またタウオリゴマーが惹起する細胞死に関しては、caspase3の活性化、ならびにATP assayを用いた検討により生存細胞の減少効果が示された。さらに、TET-OFF誘導系を導入した神経系細胞を用い、新規薬剤の評価系を構築した。我々は新たに2型糖尿病治療薬ピオグリタゾンによりリン酸化タウ、ならびにオリゴマータウが減少することを示した (in submission)。またクリオキノール、さらにはRho-ROCK阻害薬投与がリン酸化タウ、ならびにタウオリゴマーを減少させることを示してきた。現在は頸動脈コイルを用いた慢性低脳循環マウスモデルを用い、脳虚血がタウリン酸化亢進、ならびにタウオリゴマー形成促進に働く機序につき検討中である。なお、Aβオリゴマーのタウ重合に及ぼす影響については共同研究者内木とともに検討を継続中である。タウ合成ペプチドの作成は検討中であり、オートファジー阻害薬、ならびにオートファジー促進薬のタウ代謝に及ぼす影響は現在検討中である。

## 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)

[雑誌論文](計21件)

1.前田 文江, 山村 修, 植田 信策, 齋藤 佐, 柴田 宗一, 濱野 忠則, 浜田 敏彦, 木村 秀樹 被災地検診活動から得られたヒラメ静脈径拡張の関連要因について 医学検査 65(1), 25-31, 2016

2. Hamaguchi T, Taniguchi Y, Sakai K, Kitamoto T, Takao M, Murayama S, Iwasaki Y, Yoshida M, Shimizu H, Kakita A, Takahashi H, Suzuki H, **Naiki H**, Sanjo N, Mizusawa H, Yamada M. Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A $\beta$  deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*. 2016 Jun 17. [Epub ahead of print]
3. Inai K, Noriki S, Kinoshita K, Sakai T, Kimura H, Nishijima A, Iwasaki H, **Naiki H**. Postmortem CT is more accurate than clinical diagnosis for identifying the immediate cause of death in hospitalized patients: a prospective autopsy-based study. *Virchows Arch*. 2016 Apr 16. [Epub ahead of print]
4. **Naiki H**, Okoshi T, Ozawa D, Yamaguchi I, Hasegawa K. Molecular pathogenesis of human amyloidosis: Lessons from  $\beta$ 2-microglobulin-related amyloidosis. *Pathol Int*. 2016; 66(4):193-201. doi: 10.1111/pin.12394. Epub 2016 Mar 11. Review.
5. Ikawa M, Okazawa H, Tsujikawa T, Matsunaga A, Yamamura O, Mori T, **Hamano T**, Kiyono Y, Nakamoto Y, Yoneda M. Increased oxidative stress is related to disease severity in the ALS motor cortex: A PET study. *Neurology*. 2015; 84:2033-9. doi: 10.1212/WNL.0000000000001588.
6. Okoshi T, Yamaguchi I, Ozawa D, Hasegawa K, **Naiki H**. Endocytosed 2-Microglobulin Amyloid Fibrils Induce Necrosis and Apoptosis of Rabbit Synovial Fibroblasts by Disrupting Endosomal/Lysosomal Membranes: A Novel Mechanism on the Cytotoxicity of Amyloid Fibrils. *PLoS One*. 2015 Sep 30;10(9):e0139330. doi:10.1371/journal.pone.0139330.
7. So M, Ishii A, Hata Y, Yagi H, **Naiki H**, Goto Y. Supersaturation-Limited and Unlimited Phase Spaces Compete to Produce Maximal Amyloid Fibrillation near the Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate. *Langmuir*. 2015; 31(36):9973-82. doi: 10.1021/acs.langmuir.5b02186.
8. Sawashita J, Zhang B, Hasegawa K, Mori M, **Naiki H**, Kametani F, Higuchi K. C-terminal sequence of amyloid-resistant type F apolipoprotein A-II inhibits amyloid fibril formation of apolipoprotein A-II in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(8):E836-45. doi: 10.1073/pnas.1416363112.
9. Ohta M, Ookoshi T, **Naiki H**, Imamura Y. HBME-1 and CD15 immunocytochemistry in the follicular variant of thyroid papillary carcinoma. *Pathol Int*. 2015; 65(3):119-25. doi: 10.1111/pin.12252.
10. Kodera T, Arishima H, Kitai R, Kikuta K, Iino S, Noriki S, **Naiki H**. Utility of postmortem imaging system for anatomical education in skull base surgery. *Neurosurg Rev*. 2015, 38(1):165-70; discussion 170. doi: 10.1007/s10143-014-0574-2.
11. Muramatsu T, Ikawa M, Yoneda M, Sugimoto K, Matsunaga A, Yamamura O, **Hamano T**, Okazawa H, Nakamoto Y. Pathophysiological decrease in the regional cerebral blood flow in Hashimoto's encephalopathy: a multiple-case SPECT study. *Eur Neurol*. 2014;72(1-2):13-9. doi: 10.1159/000358220.
12. **濱野 忠則**【神経症候群(第2版)-その他の神経疾患を含めて-】医薬品副作用、中毒性疾患 医薬品による神経・筋骨格系障害 横紋筋融解症日本臨床 (0047-1852)別冊神経症候群 V 598-602, 2014
13. 齋藤 有紀, 松永 晶子, 山村 修, 井川 正道, **濱野 忠則**, 米田 誠 脳梁膨大部右側梗塞により左半側相貌変形視をきたした左ききの1例. *臨床神経学* 54(8) 637-642, 2014
14. **濱野 忠則**【神経症候群(第2版)-その他の神経疾患を含めて-】変性疾患 運動ニューロン疾患 脊髄性筋萎縮症 良性一側下腿筋萎縮症(BMALL)(解説/特集)\_日本臨床別冊神経症候群 II 556-559, 2014
15. **濱野 忠則**, 白藤 法道, 栗山 勝, 中本 安成【B群ビタミンによる疾患の治療】アルツハイマー病とホモシステイン(解説/特集) ビタミン 88(2)92-96, 2014
16. 神澤 朋子, 井川 正道, **濱野 忠則**, 永田 美和子, 木村 浩彦, 米田 誠 発症時のカルボキシヘモグロビンが正常であったが頭部 MR spectroscopy 所見が診断の契機となった間歇型一酸化炭素中毒の1例 *臨床神経学* 54(3)234-237, 2014
17. Inai K, Noriki S, Kinoshita K, Nishijima A, Sakai T, Kimura H, **Naiki H**. Feasibility of liver weight estimation by postmortem computed tomography images: an autopsy study. *Pathol Int*. 2014;64(7): 315-24. doi: 10.1111/pin.12174.
18. Inai K, Noriki S, Iwasaki H, **Naiki H**. Risk factor analysis for bone marrow histiocytic hyperplasia with hemophagocytosis: an autopsy study. *Virchows Arch*. 2014; 465(1): 109-18. doi:10.1007/s00428-014-1592-8.

19. Ikenoue T, Lee YH, Kardos J, Yagi H, Ikegami T, **Naiki H**, Goto Y. Heat of supersaturation-limited amyloid burst directly monitored by isothermal titration calorimetry. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111(18):6654-9. doi:10.1073/pnas.1322602111.

20. Ikawa M, Yoneda M, Muramatsu T, Matsunaga A, Tsujikawa T, Yamamoto T, Kosaka N, Kinoshita K, Yamamura O, **Hamano T**, Nakamoto Y, Kimura H. Detection of preclinically latent hyperperfusion due to stroke-like episodes by arterial spin-labeling perfusion MRI in MELAS patients. Mitochondrion. 2013;13(6):676-80. doi:10.1016/j.mito.2013.09.007.

21. 村松 倫子, **濱野 忠則**, **白藤 法道**, 松永 晶子, 井川 正道, 米田 誠 . Periodic synchronous discharge を呈し Creutzfeldt-Jakob 病との鑑別を要した橋本脳症の1例 . 臨床神経学 53(9)716-720, 2013

〔図書〕(計0件)

〔学会発表〕(計60件)

1. Lin, G, **Hamano, T**, **Shirafuji, N.**, Ishida, A., Hayashi, K., Yen, S. H., Nakamoto, Y. (2015). Clioquinol decreases phosphorylation levels of tau protein. AAIC 2015 July 2015 in Washington DC, USA (Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 11(7), P501).

2. Hayashi, K., **Hamano, T.**, Ishida, A., Fujita, Y., Hama, Y., Yamamura, O., & Nakamoto, Y. (2015). Reduction of serum cholinesterase by cholinesterase inhibitor (donepezil, galantamine, or rivastigmine). AAIC 2015 July 2015 in Washington DC, USA (Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 11(7), P747-P748).

3. **Shirafuji N**, **Hamano T**, Yen SH, Ishida A, Fujita Y, Matsunaga A, , Osamu Yamamura, Masaru Kuriyama, Yasunari Nakamoto  
ROCK INHIBITOR DECREASES PHOSPHORYLATION LEVELS OF TAU PROTEIN. 01-08-04 AAIC 2014, July 2014 in Copenhagen, Denmark DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.101>

4. Fujita Y, **Hamano, T.**, **Shirafuji, N.**, & Nakamoto, Y. CHRONIC CEREBRAL HYPOPERFUSION INDUCES TAU HYPERPHOSPHORYLATION ACCOMPANIED BY AXONAL DAMAGE IN ADULT MICE. AAIC 2014 July 2014 in Copenhagen, Denmark (Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's

Association 4.10 (2014): P789).

5. **Hamano, T.**, **Shirafuji, N.**, Sasaki, H., Ishida, A., Ueno, A., Yen, S. H., Nakamoto, Y. (2013). Donepezil reduces phosphorylation levels of tau protein in a cellular model of tauopathy. AAIC 2013, July 2013, Boston, USA. (Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 9(4), P305).

6. **Shirafuji N.**, **Hamano T.**, Ishi-da, A., Yoneda, M., Kuriyama, M., Nakamoto, Y. (2013). Homocysteine accelerates tau aggregation via caspase activation. AAIC 2013 July 2013 in Boston, USA. (Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 9(4), P715).

7. 林 浩嗣, 北崎 佑樹, 山口 智久, 遠藤 芳徳, 岸谷 融, **白藤 法道**, 井川 正道, 山村 修, **濱野 忠則**, 中本 安成筋強直性ジストロフィー1型患者の上肢筋 MRI 所見の検討. 第113回日本内科学会総会 . 2016年4月(日本内科学会雑誌 105 Suppl, 184(2016.02))

8. 中嶋 久栄, 星野 友佳, 遠藤 芳徳, 林 高平, 山村 修, **濱野 忠則** スモン病患者の認知機能評価 . 第33回日本神経治療学会総会 神経治療学 32巻5号 Page852(2015.09)

9. 佐々木 宏仁, **濱野 忠則**, **白藤 法道**, 上野 亜佐子, 石田 愛子, Yen Shu-Hui, 林 浩嗣, 山村 修, 栗山 勝, 中本 安成 . 塩酸ドネペジルのタウ蛋白リン酸化におよぼす影響 . 第33回日本神経治療学会総会 (神経治療学 32(5) 842(2015.09))

10 . **濱野 忠則**, **白藤 法道**, 石田 愛子, 上野 亜佐子, 林 浩嗣, 山村 修, 中本 安成 . ピタバスタチンの認知機能に及ぼす影響第33回日本神経治療学会総会 (神経治療学 32(5): 784(2015.09))

11. **白藤 法道**, **濱野 忠則**, 石田 愛子, Yen Shu-Hui, 松永 晶子, 山村 修, 栗山 勝  
ホモシステインによるタウ蛋白リン酸化・重合促進機序の解明 . 第55回日本神経学会学術大会 . 2014年5月福岡 . 臨床神経学 54 S235(2014.12)

12. **濱野 忠則**, **白藤 法道**, Yen Shu-Hui, 林 浩嗣, 松永 晶子, 山村 修, 藤田 祐之, 安川 善博, 栗山 勝, 中本 安成 . ROCK 阻害薬のタウ蛋白リン酸化・重合に及ぼす影響 . 第55回日本神経学会学術大会 . 2014年5月福岡 (臨床神経学 54S43(2014.12))

13. 神澤 朋子, 井川 正道, 齋藤 有紀, 村松 倫子, 松永 晶子, 山村 修, **濱野 忠則**, 村山 繁雄, 米田 誠 . 自律神経障害を主体とした

Lewy 小体病の診断における皮膚生検の有用性．第 54 回日本神経学会学術大会．2013 年 5 月東京)(臨床神経学 53(12)1588(2013.12))

14. **濱野 忠則**, 佐々木 宏仁, 白藤 法道, 石田 愛子, Yen Shu-Hui, 米田 誠, 栗山 勝, 中本 安成．塩酸ドネペジルのタウ蛋白リン酸化におよぼす影響(第 2 報) 第 54 回日本神経学会学術大会．2013 年 5 月東京(臨床神経学 53(12) 1555(2013.12))

以上、主要な発表 14 件 他 46 件あり

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

濱野 忠則 (Hamano Tadanori)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：40334817

### (2)研究分担者

内木宏延 (Naiki Hironobu)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：10227704

白藤法道 (Shirafuji Norimichi)

福井大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40529319