

201026005A

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しい
アルツハイマー病の根本治療法に関する研究

平成 22 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 23 年 (2011 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告書

- リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しい
アルツハイマー病の根本治療法に関する研究…………… 1
武田 雅俊

II. 分担研究報告書

1. 重合核導入によりタウ凝集体を形成する新規細胞モデルの構築…………… 8
長谷川 成人
2. 顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究……………11
高島 明彦
3. 小胞体ストレスモデルマウスに対するシャペロン誘導剤の効果に関する研究……………13
工藤 喬
4. タウの重合過程に関する研究……………15
田中 稔久
5. アルツハイマー病に対する臨床評価項目の検討と臨床評価の1年間の推移……………19
數井 裕光
6. 小胞体ストレスによる神経細胞内タウ凝集に関する研究……………22
武田 雅俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………25

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………29

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
総括研究報告書

リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しいアルツハイマー病の
根本治療法に関する研究

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: 本研究ではリン酸化タウ凝集阻害やその分解促進を行うことでシナプス消失、神経脱落を抑制し、アルツハイマー病(AD)の根本的治療法を確立する事を目的とする。凝集阻害の観点からは、SDS 不溶性タウ形成を阻害する化合物が得られた。また、小胞体(ER)ストレスがタウの蓄積をもたらすことが示された。さらに、タウ凝集の機序を検討できる重合核導入によるタウ凝集体細胞モデルを構築した。分解促進の観点からは、シャペロン誘導剤について発症後投与の効果について検討した。また、アルツハイマー病に対するタウ線維凝集阻害物質の臨床治験をおこなうための臨床評価項目について検討した。認知機能評価としてはMMSE、ADASを、精神行動障害の評価のためにNPIを、日常生活活動を評価するためにはPSMSとIADLを、記憶障害に対する自覚的、他覚的重症度評価には日常生活記憶チェックリスト(Everyday memory checklist: EMC)が有用と考えられた。

キーワード: タウ、神経原線維変化、オリゴマー、シャペロン、タウオパチー、ER ストレス

分担研究者

高島明彦 独立行政法人理化学研究所・チームリーダー

長谷川成人 東京都精神医学研究所・プロジェクトリーダー

工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・講師

数井裕光 大阪大学大学院医学系研究科・講師

アミロイドワクチンなどの「アミロイドカスケード仮説」に基づくADの治療薬の近年の臨床治験では厳しい結果が続いている。ADの重症度はタウで構成されるNFT量に相関し、タウ変異による前頭側頭葉型認知症の報告やアミロイド発現マウスの神経細胞死がタウ発現抑制により消去できる報告は、タウの神経変性への直接関与を示唆している。タウはリン酸化、顆粒状凝集物、線維形成が行われ神経原線維変化(NFT)になるが、リン酸化タウはシナプス消失に、顆粒状凝集物

A.研究目的

は神経脱落に関与するとされる。従って、本研究ではリン酸化タウ凝集阻害やその分解促進を行うことでシナプス消失、神経脱落を抑制し、ADの根本的治療法を確立する事を目的とする。

B. 研究方法

①顆粒状タウ凝集体凝集阻害物質の探索

化合物マイクロアレイとリコンビナントヒトタウ溶液をインキュベートし洗浄後、抗タウ抗体によってマイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得る。得られた化合物は試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定する。化合物は P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を細胞レベルで検討する。

②重合核導入によりタウ凝集体を形成する新規細胞モデルの構築

大腸菌に発現し、精製した3リピート(3R)タウ、4リピート(4R)タウをヘパリン存在下でインキュベートすることにより線維化したタウを作製した。それを超音波処理することにより、細かな線維にした後、遺伝子導入と同じようにリポフェクタミンを用いて培養細胞内に導入した。細胞はあらかじめヒト3Rタウ、あるいは4Rタウを発現させた SH-SY5Y 細胞、あるいは何も強制発現しない細胞を用いた。

培養3日後に細胞を固定し、リン酸化タウを特異的に認識する抗体などを用いて、蛍光抗体法によるタウの免疫染色を行って、その局在、凝集を観察すると共に、界面活性剤を用いた段階的抽出を行い、イムノブロット法による生化学解析を行った。

③ER ストレスによる神経細胞内タウ凝集の検討

SY5Y 細胞や初代培養細胞に、グルコース除去や tunicamycin 等の薬剤により ER ストレスを負荷し、タウの変化を検討する。タウの産生の変化を検討する目的で、タウの 5'UTR を有するタウ発現ベクターと 5'UTR を持たない発現ベクターをトランスフェクトし、ER ストレスをかけてタウの発現を検討した。また、タウの分解の変化を検討する目的でタウのユビキチン化およびタウの E3 ライゲースである CHIP の ER ストレス下での変化について検討した。

④シャペロン誘導剤 BIX の ER ストレス負荷後投与の効果

中大脳動脈閉塞マウスモデル (ER ストレスモデル) を用いて、5 μ g あるいは 20 μ g を脳室内に虚血後 5 分、3 時間、6 時間に投与し、効果を検討した。

⑤タウオパチーの臨床治験に特化した診断プロトコールの作成

AD に対するタウ線維凝集阻害物質の臨床治験をおこなうため、AD の臨床症状を広範に評価する項目を検討した。また大阪大学病院神経科精神科を受診し、NINCDS-ADRDA の probable AD を満

たした外来症例 18 例を対象に、認知機能の評価のために Mini-Mental State Examination (MMSE) とを Alzheimer's Disease Assessment Scale- cognitive subscale (ADAS)、精神行動障害の評価のために Neuropsychiatric Inventory (NPI) を参加時、半年後、1 年後に施行した。

C. 研究結果

① 顆粒状タウ凝集体凝集阻害物質の探索

理研化合物バンク 6600 から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPR によって親和性の高い化合物約 100 種類が得られた。

リバスチグミンを P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、10 μ M で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察された。

② 重合核導入によりタウ凝集体を形成する新規細胞モデルの構築

4R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入するとリン酸化タウ陽性の凝集体形成が観察された。細胞の外から導入したタウ線維と細胞内に発現したタウを区別するため、GFP タグを付加したタウを細胞内に発現する実験も行ったが、外から導入したものを核として細胞内に発現するタウが凝集することが確認された。また興味深いことに、4R タウを発現する細胞

に 3R タウの線維を導入しても 4R タウの凝集が起こらないことも判明した。逆に 3R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入しても凝集がおこらず、3R タウ線維を導入すると凝集体形成が観察された。すなわち同種のタンパク質の線維が導入された場合に限って凝集が進むことが判明した。

細胞内に発現した正常タウのほとんどは Triton 可溶画分までに回収され、その不溶性画分にバンドが検出されないのに対し、重合核シードを導入した細胞では、Triton 不溶性画分に抗 pS396 抗体、AT100 陽性のバンドが検出された。また、患者脳の異常タウ線維の調製に用いられる界面活性剤 Sarkosyl を用いて細胞を可溶化し、その不溶性画分に回収される線維を免疫電顕によって観察したところ、抗 pS396 抗体、あるいは AT100 抗体陽性のタウ線維が観察された。

③ ER ストレスによる神経細胞内タウ凝集の検討

ER ストレスはタウ蛋白の上昇をもたらす。グルコース除去 24 時間後では 1.5 倍のタウ蛋白量が観察された。

グルコース除去 24 時間および 48 時間後のタウに結合するユビキチン量は、グルコース添加群に比し、低下が観察された。またグルコース除去 24 時間および 48 時間後の SH-SY5Y のライセートにおいて、CHIP 量の低下が観察された。

④ シャペロン誘導剤 BIX の ER ストレス負荷後投与の効果

虚血後の投与時間であるが、5 分後

と3時間後 BIX 投与が、有意に虚血巣を検証させ、脳浮腫も軽減することができた。

⑤タウオパチーの臨床治験に特化した診断プロトコルの作成

AD の認知機能の評価には、信頼性、および過去の研究における使用頻度から MMSE と ADAS が有用であると考へた。精神行動障害の評価には同様の理由で、NPI が適切であると考へられた。その他、日常生活活動を評価するためには Physical self-maintenance scale(PSMS)と Instrumental activities of daily living scale(IADL)を、記憶障害に対する自覚的、他覚的重症度評価には日常生活記憶チェックリスト (Everyday memory checklist: EMC) が使用しやすいと考へられた。さらに近年患者の介護負担に対する効果を検討することも重要となっており、Zarit burden interview (ZBI)が適切であると考へられた。

D.考察

近年 AD の治療薬開発は、「アミロイドカスケード仮説」を基盤にアミロイド・ワクチンや γ シクレターゼ阻害薬などが精力的に開発されてきたが、ここにきて芳しい臨床治験の成果が出ず、足踏み状態である。従って、AD のもう一つの病理である神経原線維変化の中心的存在であるタウ病理についての治療法応用も必要である。

AD 脳では何らかの理由で異常にリン酸化されたタウが神経細胞内に蓄積し、凝集して神経原線維変化になると考へら

れている。このリン酸化タウ凝集は、AD 以外の神経変性疾患でも認められ、タウオパチーと言われるにいたっている。本研究では、このタウの凝集阻害と分解促進の2観点からタウオパチーの治療を検討している。

本研究で、顆粒状タウ凝集体を経て、神経原線維変化へと変化することが分かり、この中間凝集物への凝集阻害効果を持つ物を検索している。細胞レベルで 100nM 以下で凝集阻害効果を示す化合物が得られた。この化合物は細胞レベルで効果を示すため膜透過性を有する化合物であることが示唆される。今後、血液脳関門透過性及び生体での効果を検討する予定である。

線維化したタウなどのアミロイド様分子は条件を整えば比較的簡単に細胞内に取り込まれ、それがシードとして作用して、プリオンのように正常分子を異常分子に変換して線維化することが明らかとなった。Braak らにより、タウ病変が病気の進行に伴って広がること、さらにその広がり病気の症状と強く相関することが示されているが、このタウ病変の広がり、異常タウのプリオン様性質で説明できる可能性がでてきた。

今回の検討から、ER ストレスはタウのユビキチン化を減少させることが明らかになった。タウの特異的なユビキチン E3 ライゲースである CHIP について検討したところ、ER ストレスによって CHIP は減少することが確認された。すなわち、ER ストレスによってユビキチンライゲースが減少

し、タウのユビキチン化が阻害され、本来プロテアソームで分解されるべきタウが蓄積することで、蛋白量上昇につながると考えられる。

本年度の検討より、BIXはERストレス負荷後においても脳虚血モデルでは効果がある事が示された。しかし、20 μ gを3時間までに投与した場合に有意な効果が見られ、高容量の早期投与が必要であることも示されている。

タウオパチーに特化したADの臨床症状の評価項目を目指し検討を続けている。そのために、ADに対する臨床評価項目の検討と臨床評価の1年間の推移したところ、MMSE、ADASは治験の評価項目として使用しやすいが、NPIの使用には慎重な態度が必要であると考えられた。タウオパチーには、AD以外にも、FTD、CBD、PSPもあるので、ADに対する効果の検証の後には、上記のように各疾患の診断基準、評価方法を用い、同様の検討を行う予定である。今回、評価項目を上記の通り設定したが、今後の動物実験等の結果も踏まえ、現在のプロトコールについては臨床研究開始前に再検討する予定である。

E. 結論

SDS不溶性タウ形成を阻害する化合物が得られた。また、小胞体(ER)ストレスがタウの蓄積をもたらすことが示された。さらに、タウ凝集の機序を検討できる重合核導入によるタウ凝集体細胞モデルを構築した。分解促進の観点からは、シャペロン誘導剤について発症後投与の効果について

検討した。

F. 研究発表

論文発表

1. Kimura T, Fukuda T, Sahara N, Yamashita S, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Lee B, Sotiropoulos I, Maeda S, Takashima A., Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss. *J. Biol Chem.* 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]
2. Peethumnongsin E, Yang L, Kallhoff-Muñoz V, Hu L, Takashima A, Pautler RG, Zheng H. Convergence of presenilin- and tau-mediated pathways on axonal trafficking and neuronal function. *J Neurosci.* 30(40):13409-18. 2010
3. Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, Takashima A., Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. *FEBS Lett.*584(14):3227-32. 2010
4. Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, et al. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res.*106(11):1692-702. 2010
5. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and

- toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.
6. Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.
 7. Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.
 8. Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.
 9. Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.
 10. Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.
 11. Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181
 12. The production ratios of AICD ϵ 51 and A β 42 by intramembrane proteolysis of β APP do not always change in parallel. Kohji Mori, Masayasu Okochi, Shinji Tagami, Taisuke

- Nakayama, Kanta Yanagida, Takashi S. Kodama, Shin-ichi Tatsumi, Kana Fujii, Hitoshi Tanimukai, Ryota Hashimoto, Takashi Morihara, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara, Masatoshi Takeda *Psychogeriatrics* 10:117-123, 2010
13. The impact of a genome-wide supported psychosis variant in the ZNF804A gene on memory function in schizophrenia. Hashimoto R, Ohi K, Yasuda Y, Fukumoto M, Iwase M, Iike N, Azechi M, Ikezawa K, Takaya M, Takahashi H, Yamamori H, Okochi T, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Kazui H, Iwata N, Takeda M. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 153B(8):1459-64, 2010
14. KIBRA Genetic Polymorphism Influences Episodic Memory in Alzheimer's Disease, but Does Not Show Association with Disease in a Japanese Cohort. Hayashi N, Kazui H, Kamino K, Tokunaga H, Takaya M, Yokokoji M, Kimura R, Kito Y, Wada T, Nomura K, Sugiyama H, Yamamoto D, Yoshida T, Currais A, Soriano S, Hamasaki T, Yamamoto M, Yasuda Y, Hashimoto R, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Morihara T, Takeda M. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 25;30(4):302-308. 2010
15. Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, and Imaizumi K *J Bone Miner Metab* 28:131-138, 2010
16. Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice. Yasuhisa Oida, Junya Hamanaka, Kana Hyakkoku, Masamitsu Shimazawa, Takashi Kudo, Kazunori Imaizumi, Tadashi Yasuda, Hideaki Hara *Neurosci Let* 484: 43-46,2010
17. Restraint-Induced Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes in the Mouse Brain. Mitsue Ishisaka, Takashi Kudo, Masamitsu Shimazawa, Kenichi Kakefuda, Atsushi Oyagi, Kana Hyakkoku, Kazuhiro Tsuruma, Hideaki Hara *Pharmacology & Pharmacy*, 2(1): 10-16, 2011
- G. 健康危険情報
特記すべきことなし。

重合核導入によりタウ凝集体を形成する新規細胞モデルの構築

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：野中隆¹⁾

¹⁾ 東京都精神医学総合研究所 分子神経生物学研究チーム

研究要旨

神経変性疾患は、症状、病態が時間経過に伴って悪化する「進行性」であるがその意味についてはこれまでほとんど議論されてこなかった。細胞内に蓄積するタウ線維はアミロイドと同じクロスβ構造をとるが、そのモデルとして「重合核依存性タンパク質重合モデル」が提唱され、実験的な証拠も累積している。タウを発現する培養細胞に遺伝子導入試薬を用いてタウ線維を導入することにより、患者脳で見られるものと同様の異常タウの凝集体を形成するモデルを構築した。このモデルはこれまでのもとは全く異なるモデルであり、ADの進行機序の解明、治療に大きく役立つと考えられる。

A.研究目的

神経変性疾患は、その症状、病態が時間経過に伴って悪化する「進行性」であるがその意味についてはこれまでほとんど議論されてこなかった。治療を考える場合、病気が進行する原因を解明し、病状が進行しないように抑制することが重要である。アルツハイマー病(AD)において、変性する部位の細胞内にタウの蓄積病変が観察され、その蓄積タウの脳内分布と臨床症状が密接に相関することが示されている。細胞内に蓄積するタウは、細胞外に蓄積するAβやプリオンと同じ「アミロイド」に特徴的なクロスβシート構造とすることが明らかにされているが、そのモデルとして、最初に重合核(シード)が形成され、重合核に正常分子が結合することによって伸長反応が進行する「重合核依存性タンパク質重合モデル」が提唱されている。我々は細胞に大きなダメージを与えることなく、タンパク質重合核を細胞内に導入する画期的方法により、細胞外から加えた重合体を核として細胞内のタンパク質が凝集することを世界ではじめて証明した。そのモデルをタウに応用して細胞内タウ蓄積を起こす細胞モデルを開発した。

B.研究方法

大腸菌に発現し、精製した3リピート(3R)タウ、4リピート(4R)タウをヘパリン存在下でインキュベートすることにより線維化したタウを作製した。それを超音波処理することにより、細かな線維にした後、遺伝子導入と同じようにリポフェクタミンを用いて培養細胞内に導入した。対照としては線維化しない可溶性タウを用いる。また細胞はあらかじめヒト3Rタウ、あるいは4Rタウを発現させたSH-SY5Y細胞、あるいは何も強制発現しない細胞を用いた。培養3日後に細胞を固定し、リン酸化タウを特異的に認識する抗体などを用いて、蛍光抗体法によるタウの免疫染色を行って、その局在、凝集を観察すると共に、界面活性剤を用いた段階的抽出を行い、イムノプロット法による生化学解析を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関する申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。

C.研究結果

1. 培養細胞内へのタウ線維の導入

SH-SY5Y 細胞にヒト 3R タウ、あるいは 4R タウを過剰発現しても、明らかなタウの凝集体形成、蓄積は観察されない。また生化学的にもサルコシル不溶性画分に異常リン酸化タウは検出できない。そこで、この細胞に、予め試験管内で線維化したタウを導入することを考えた。様々な試行錯誤の結果、遺伝子導入試薬として市販されているリポフェクタミンを用いることで、線維化した異常タンパク質を効率よく細胞内に導入することができることを見いだした。4R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入するとリン酸化タウ陽性の凝集体形成が観察された。細胞の外から導入したタウ線維と細胞内に発現したタウを区別するため、GFP タグを付加したタウを細胞内に発現する実験も行ったが、外から導入したものを核として細胞内に発現するタウが凝集することが確認された。また興味深いことに、4R タウを発現する細胞に 3R タウの線維を導入しても 4R タウの凝集が起こらないことも判明した。逆に 3R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入しても凝集がおこらず、3R タウ線維を導入すると凝集体形成が観察された。すなわち同種のタンパク質の線維が導入された場合に限って凝集が進むことが判明した。

2. 生化学解析と不溶性線維の観察

細胞内に形成されたタウ陽性凝集体が患者脳に蓄積するタウと同様の性質を有しているかどうか確認するため、界面活性剤等を含む緩衝液で細胞内の蛋白質を段階的抽出し、タウ抗体を用いたイムノブロット解析を行った。その結果、細胞内に発現した正常タウのほとんどは Triton 可溶画分までに回収され、その不溶性画分にバンドが検出されないのに対し、重合核シードを導入した細胞では、Triton 不溶性画分に抗 pS396 抗体、AT100 陽性のバンドが検出された。また、患者脳の異常タウ線維の調製に用いられる界面活性剤 Sarkosyl を用いて細胞を可溶化し、そ

の不溶性画分に回収される線維を免疫電顕によって観察したところ、抗 pS396 抗体、あるいは AT100 抗体陽性のタウ線維が観察された。

D.考察

細胞内にアミロイド様分子が形成されるまでは何十年もかかると推定されるが、細胞が死ぬとそれは細胞外に放出される。今回の結果から、線維化したタウなどのアミロイド様分子は条件を整えば比較的簡単に細胞内に取り込まれ、それがシードとして作用して、プリオンのように正常分子を異常分子に変換して線維化することが明らかとなった。Braak らにより、タウ病変が病気の進行に伴って広がること、さらにその広がりが病気の症状と強く相関することが示されているが、このタウ病変の広がりが、異常タウのプリオン様性質で説明できる可能性がでてきた。細胞の外にあるものは簡単に中には入らないというのが一般的な考え方であるが、発想を転換すると細胞内異常分子の広がりや病気の進行を容易に説明することが可能になる。

E.結論

線維化したタウ重合核を細胞外から導入する方法を見だし、予めタウを発現した細胞にタウ線維を導入することで、タウの凝集体を形成するモデルを構築した。4R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を、3R タウを発現する細胞に 3R タウ線維を導入すると凝集がおこるが、異なる分子種の重合核を導入しても凝集が起こらないことが判明し、プリオンと同じように、線維化した分子が同じ種類の正常分子と相互作用することで、正常分子を異常型に変換し、凝集が進むことが示された。神経変性疾患における病理、病態を異常タンパク質分子自体が決定している可能性が示唆された。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1). Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem.* 285: 34885-98, 2010.
- 2). Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.
- 3). Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.
- 4). Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.
- 5). Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.
- 6). Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.
- 7). Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaka M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative

disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol.* 30:170-181

2. 学会発表

- 1). Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]
- 2). Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA[2010/10/06]
- 3). Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/03]
- 4). Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]
- 5). 長谷川成人. ALS の分子病態解明と治療に向けて. 日本神経治療学会, 神経治療学のブレイクスルー:神経疾患の新規治療, 横浜 [2010/07/21]
- 6). 長谷川成人. 生化学的方法と神経病理. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会, [神経病理の更なる発展に向けて②], 東京 [2010/04/24]
- 7). 長谷川成人. TDP-43 の発見から動物モデルまで. 第 51 回日本神経学会総会, 「筋萎縮性側索硬化症の病因 TDP-43 および FUS/TLS 研究の最前線」, 東京 [2010/05/22]

H.知的所有権の取得状況 (予定を含む)

- 1.特許取得 特になし
- 2.実用新案登録 特になし
- 3.その他 特になし

顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

研究分担者氏名 高島 明彦¹⁾

1) 所属（理化学研究所 脳科学総合研究センター、アルツハイマー病研究チーム）

研究要旨

タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになった。これらタウ凝集阻害を示す化合物を理研化合物バンク 6600 から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約100化合物を得た。これらの化合物を P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、100nM 以下で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察される化合物が得られた。

キーワード：タウ、顆粒状凝集体、認知症治療、化合物

A.研究目的

世界で認知症患者数は現在約3560万人と推定され介護費用に年間6億400万ドルが費やされている。認知症患者数の増大により2050年までに介護費用が倍増予想されている。認知症の中で最も多い原因疾患であるアルツハイマー病の予防法、根本的治療法は現在まで確立されていない。1991年βアミロイド仮説が提唱されて以来今日までβアミロイドを減少させる療法が試みられてきたが、いずれもアルツハイマー病と診断された患者において顕著な認知機能低下を阻止することが出来ていない。本研究では認知機能低下と相関する神経原線維変化の構成要素であるタウに注目してアルツハイマー病における認知機能低下機構、及びその阻止について研究を行い、認知機能低下進行を阻止する薬剤の開発を行う。

これまでの研究からタウは老化因子、またはβアミロイドによって過剰リン酸化され、これら

が細胞質で互いに会合し可溶性タウオリゴマーを形成する。オリゴマーが40分子のタウで形成されβシート構造を持つようになると不溶性の顆粒状構造物となり、これらが互いに結合することでタウ線維を形成し、神経原線維変化となる。これらタウ凝集体と神経変性の関係はタウトランスジェニックマウスの解析から明らかにされ、可溶性タウオリゴマー形成はシナプス消失に、顆粒状凝集体形成は神経細胞脱落に関与することが示されている。この課題ではこれらタウ凝集を標的としたタウ凝集阻害剤の検索を目的とする。

B.研究方法

化合物マイクロアレイとリコンビナントヒトタウ溶液をインキュベートし洗浄後、抗タウ抗体によってマイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得る。得られた化合物は試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定する。更にどの段階での凝集

阻害であるかを原子間力顕微鏡を用いて決定する。

化合物は P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を細胞レベルで検討する。

C.研究結果

理研化合物バンク 6600 から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPR によって親和性の高い化合物約 100 種類が得られた。これらの化合物を P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、100nM 以下で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察される化合物が得られた。

D.考察

100 種類のタウ結合化合物はさらに試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光でタウ凝集阻害活性を調べ、さらに原子間力顕微鏡を用いてその中から顆粒状凝集体形成阻害化合物をスクリーニングした。さらに細胞レベルで 100nM 以下で凝集阻害効果を示す化合物が得られた。この化合物は細胞レベルで効果を示すため膜透過性を有する化合物であることが示唆される。今後、血液脳関門透過性及び生体での効果を検討する予定である。

E.結論

6600 から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約 100 化合物を得た。さらに細胞レベルで 100nM 以下で凝集阻害効果を示す化合物が得られた。

F.健康危険情報

G.研究発表

1.論文発表

Kimura T, Fukuda T, Sahara N, Yamashita S, Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Lee B, Sotiropoulos I, Maeda S, **Takashima A**, Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss. J. Biol Chem. 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]

Peethumnongsin E, Yang L, Kallhoff-Muñoz V, Hu L, **Takashima A**, Pautler RG, Zheng H. Convergence of presenilin- and tau-mediated pathways on axonal trafficking and neuronal function. J Neurosci. 30(40):13409-18. 2010

Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, **Takashima A**, Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. FEBS Lett.584(14):3227-32. 2010

Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, **Takashima A**, et al. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. Circ Res.106(11):1692-702. 2010

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

- 1.特許取得
- 2.実用新案登録
- 3.その他

小胞体ストレスモデルマウスに対するシャペロン誘導剤の効果に関する研究

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: 昨年我々は分子シャペロン BiP を誘導する薬剤 BIX を開発し、その小胞体(ER)ストレスに対する効果について報告した。しかし、昨年度の報告は ER ストレス負荷前のシャペロン誘導剤投与であり、今年度はより臨床的意義があるストレス負荷後投与について検討した。BIX は脳虚血による ER ストレス負荷後投与でも効果があることが示された。

キーワード: ER ストレス、シャペロン、脳虚血

A. 研究目的

小胞体(ER)ストレスはアルツハイマー病(AD)をはじめとする神経変性疾患の病理過程に関与するとされている。従って ER ストレスからの離脱を図る方法は AD の治療法につながる可能性があり、AD 脳におけるタウ凝集を防ぐ可能性がある。

ER ストレスに対し細胞には、①蛋白の翻訳を抑制してさらなる折りたたみ不整蛋白の蓄積を防ぐこと、②分子シャペロンを誘導して折りたたみ不整蛋白の折りたたみを是正すること、③不整蛋白をユビキチン化しプロテアソームで分解することで、恒常性を保つ。これらの生存経路が破綻を来すことで、アポトーシスが起き、ER ストレスによる細胞死が発生する。もし、人為的にこれらの生存経路を活性化してやれば、ER ストレスによる細胞死を抑止する方策が得られるかもしれない。そこで、我々は分子シャペロン誘導剤 BIX を開発し、薬物療法の検討を開始している。

前年度、我々は ER で代表的なシャペロンである BiP を誘導する BIX を発見し、ER ストレスに対する効果を *in vitro* および *in vivo* で検証した。*In vivo* では、マウスの中大脳

動脈を閉塞した脳虚血モデルを用いて、BIX を事前に投与したときの効果について検討した。実際の臨床では、ER ストレス後の効果を検討する必要がある、本年度の実験とした。

B. 研究方法

26–32g の ddY マウスの麻酔し、左総頸動脈から栓子を挿入して中大脳動脈の起始部を閉塞して脳虚血モデルを作成した。

昨年度報告した BIX を 10%DMSO で溶解し、5 μ g あるいは 20 μ g を脳室内に虚血後 5 分、3 時間、6 時間に投与した。

虚血 24 時間後に神経学的症状を検討した後、断頭し脳切片を作成した。梗塞巣は TTC 染色により検討した。

C. 研究結果

TTC 染色を用いた梗塞巣の面積を検討したところ、虚血後 5 分後に 20 μ g を投与した群では有意に虚血巣が縮小していた。TUNEL 染色でアポトーシスを検討すると、虚血後 BIX 投与群では梗塞周辺部 (penumbra) における TUNEL 陽性細胞は減少していた。

虚血 24 時間後の神経学的評価は、0 点：全く症状なし、1 点：障害側の前足伸展異常、

2点：障害側に逆回りの回転運動、3点：全く動かないの4段階で検討したところ、20 μ g を虚血5分後投与した群では vehicle 投与群に対して、神経所見の点数が改善していた。

虚血後の投与時間であるが、5分後と3時間後 BIX 投与が、有意に虚血巣を検証させ、脳浮腫も軽減することができた。

D. 考察

本年度の検討より、BIX は ER ストレス負荷後においても脳虚血モデルでは効果がある事が示された。しかし、20 μ g を3時間までに投与した場合に有意な効果が見られ、高容量の早期投与が必要であることも示されている。

ER ストレス前投与の時と同様に、BIX は脳梗塞のコアの部分ではなく penembra に効果がある事が示され、penembra における ER ストレスによるアポトーシスを抑止して、梗塞巣の広がりを阻止したと考えられる。

今回の検討も脳室投与によるものであり、実際の臨床応用のためには、より末梢の投与方法を試す必要がある。脳虚血モデルは in vivo の ER ストレスモデルとして汎用性が高いので用いたが、今後は AD モデルマウスを用いて、タウの蓄積に対する BIX の効果を検討する必要がある。

E. 結論

BIX は脳虚血による ER ストレス負荷後投与でも効果があることが示された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a

murine model for osteoporosis. Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, Kudo T, Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, and Imaizumi K J Bone Miner Metab 28:131-138, 2010

2. Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice. Yasuhisa Oida, Junya Hamanaka, Kana Hyakkoku, Masamitsu Shimazawa, Takashi Kudo, Kazunori Imaizumi, Tadashi Yasuda, Hideaki Hara Neurosci Let 484: 43-46, 2010
3. Restraint-Induced Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes in the Mouse Brain. Mitsue Ishisaka, Takashi Kudo, Masamitsu Shimazawa, Kenichi Kakefuda, Atsushi Oyagi, Kana Hyakkoku, Kazuhiro Tsuruma, Hideaki Hara Pharmacology & Pharmacy, 2(1): 10-16, 2011

2. 学会発表

1. Endoplasmic reticulum stress increases tau level Sakagami Y, Kudo T, Mitsuda T, Horiguchi K, Tanimukai H, Tasumi S, Ohkochi M, Imaizumi K, Takeda M 13rd International Conference on Alzheimer's Disease, Hawaii, 2010

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

認知症対策総合研究事業 分担研究報告書

分担研究課題名：タウの重合過程に関する研究

分担研究者 田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

分担研究協力者 Golam Sadik、加藤希世子 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

神経原線維変化はタウオパチーの神経病理学的な特徴であり、タウ蛋白はその主要構成成分であるがタウ蛋白の分解過程については不明な点が多い。FTDP-17 (Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17) はタウ遺伝子変異によって引き起こされる認知症であるが、どのようなメカニズムで神経変性が生じるかに関しては未解明な部分が多い。そこで、野生型および FTDP-17 変異型タウ蛋白を用いて、14-3-3 蛋白との結合親和性および自己重合の誘導性に関して検討をおこなった。結果として、1) リン酸化を伴わない場合、タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性は FTDP-17 変異により 3-4 倍増強していた。そしてタウ蛋白をリン酸化することにより、この結合親和性はさらに亢進したが、その場合解離乗数は野生型タウ蛋白も変異型タウ蛋白も同程度の値を示した。2) リン酸化を伴わない場合、14-3-3 蛋白によるタウ蛋白重合の誘導については、P301L、delK280、R406W 変異によって亢進した。しかし、リン酸化することにより野生型および変異型タウ蛋白全てにおいて重合は抑制された。以上のことから、Ser214 部位をリン酸化する酵素を活性化することは、細胞内でのタウ蛋白の凝集を抑制し、治療に応用される可能性が考えられた。

キーワード：アルツハイマー病、タウ蛋白、リン酸化、

A. 研究目的

アルツハイマー病の神経細胞内には神経原線維変化として異常なリン酸化および重合をしたタウ蛋白の存在が知られているが、それ以外の一次変性認知症疾患、例えば前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症においてもグリア細胞内におけるタウ蛋白異常蓄積が知られており、また、このタウ蛋白の遺伝子変異により認知症が引き起こされる FTDP-17 (Front Temporal Dementia with Parkinsonism, linked to chromosome-17) という家族性疾患も報告され、これらの病態におけるタウ蛋白の異常重合の重要性が言われている。このように、神経細胞内およびグリア細胞内にタウ蛋白の蓄積する疾患をタウオパチーと総括されてより、タウ蛋白の神経変性に対する重要な関与は確立されたといえる。しかし、変異によって生じたタウ蛋白上のアミノ酸置換や、タウ蛋白のアイソフォーム比率の変化がどのように神経変性に結びつくかに関しては未解明のままであり、タウ蛋白の神経変性や神経細胞死過程における役割とメカニズムは不明である。

タウ蛋白はもともと微小管附随蛋白のひとつであり、微小管重合を促進する機能を有している。また、

AD 脳内のタウ蛋白は異常なリン酸化を受けていることが知られている。タウ蛋白のリン酸化はタウ蛋白の微小管重合能を阻害やプロテアーゼ抵抗性の増大を起し、細胞内での蓄積化から神経細胞死を誘導する一つのステップと考えられている。このタウ蛋白は微小管への結合能以外にもさまざまな物質と結合することが報告されており、例えばプロリンイソメラーゼ Pin 1 は Thr231 部位のリン酸化されたタウ蛋白と結合して神経変性の過程に関わる可能性や、Glycosaminoglycans、Free fatty acids および 14-3-3 蛋白はその結合によりタウ蛋白の自己重合を促進することが指摘されている。通常のタウ蛋白は可溶性であり微小管に附随しているのだが、タウオパチー病脳におけるタウ蛋白は高度にリン酸化を受け線維形成をしている。タウ蛋白は単独でも自己重合して線維を形成することができるが、何らかの結合因子と結合する方が自己重合に至る臨界濃度も低く、生体内では起こりうる可能性が高い。そして、前述の結合因子の中で細胞内に局在する可能性が高いのは 14-3-3 蛋白であろうと推測される。14-3-3 蛋白は脳内可溶性蛋白の 1% を占める発現量の多い蛋白であり、アポトーシスに関連する BAD 蛋白がリン酸化されて 14-3-3 蛋白と

結合することによりアポトーシスが抑制されること、および protein kinase C や cdc25 といった細胞内情報伝達や細胞周期に重要な蛋白がリン酸化されて 14-3-3 蛋白と結合することによりその機能制御を受けることなどが今までに知られている。

タウ蛋白と 14-3-3 蛋白の結合に関して、我々は今までに、以下のことを明らかにしてきた。1) タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合には 2 つの様式があり、リン酸化に依存しない様式では微小管結合領域に結合し、リン酸化を介した結合様式ではリン酸化した Ser214 部位に結合する。2) 微小管結合ドメインを介する結合のみが自己重合促進的でありリン酸化した Ser214 部位に結合は抑制的になる。そこで、今回は FTDP-17 変異によるタウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性およびタウ蛋白自己重合能への影響の検討をおこなうことにした。

B. 研究方法

FTDP-17 変異タウ蛋白の作成

野生型タウ (4 リピート最長型) コンストラクトをもとに、Quick Change Kit (Stratagen) をもちいた PCR 法によって、delK280、P301L、V337M、R406W の 4 種類の FTDP-17 変異を導入した。

タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性の定量化

蛋白間の結合性に関しては、pull-down assay および表面プラズモン共鳴法を用いて検討をおこなった。前者の pull-down assay ではニッケルビーズに (His)₆-tag を連結した蛋白と他の蛋白を混ぜ、遠心してビーズをバッファーで洗浄した後の沈査をウエスタンブロット法にて検討した。後者の表面プラズモン共鳴法では Biacore2000 (Biacore Inc., Sweden) を用い、一方をフローセル上に不動化し、リガンド蛋白を注入して Response Unit を測定した。

大腸菌よりリコンビナントのタウ蛋白および 14-3-3 蛋白を精製し、タウ蛋白は Protein Kinase A でリン酸化した。そしてこれらの結合親和性を定量化し、リン酸化していないタウ蛋白とリン酸化されたタウ蛋白との 14-3-3 蛋白への結合親和性を比較検討した。

タウ蛋白の 14-3-3 蛋白との結合によるタウ蛋白自己重合能への影響の検討

タウ蛋白の Ser214 部位のリン酸化によって 14-3-3 蛋白を介する機能がどのように変化するかを知るために、*in vitro* の自己重合 (線維形成) 実験をおこなった。チオフラビン S (5 μ M) を添加して、430nm の

励起波長・520nm の蛍光検出によって蛍光学的にモニターした。また、結果として形成されたタウ蛋白フィラメントを、ネガティブ染色によって電子顕微鏡によって観察した。

C. 研究結果

まず、タウ蛋白 (野生型および変異型) と 14-3-3 蛋白との解離定数を Biacore により測定した。14-3-3 蛋白に対する野生型タウ蛋白の解離定数は $3.25 \pm 0.44 \times 10^7$ M であるの対し、delK280、P301L、V337M、R406W 変異タウ蛋白の解離定数はそれぞれ、 $7.81 \pm 1.97 \times 10^8$ M、 $7.69 \pm 1.09 \times 10^8$ M、 $6.56 \pm 1.60 \times 10^8$ M、 $1.15 \pm 0.19 \times 10^7$ M となり、結合親和性は 3-4 倍増強していた。しかし、野生型および変異型タウ蛋白を PKA によってリン酸化し、リン酸化状態にて解離定数を測定したところ、解離乗数は $2.6 \sim 3.0 \times 10^8$ M となり、全てリン酸化によって同定度にまで結合親和性が亢進した。

次に、*in vitro* の自己重合 (線維形成) 実験をおこなったところ、P301L 変異タウ蛋白は最も重合傾向が強く、delK280、R406W 変異タウ蛋白も野生型タウ蛋白より重合傾向が強かった。しかし、これらのタウ蛋白を PKA によってリン酸化し、リン酸化状態にて自己重合実験をおこなったところ、野生型および変異型タウ蛋白全てにおいて重合は抑制された。また、ネガティブ染色をおこない電子顕微鏡によって観察したところ、非リン酸化タウ蛋白 (野生型および変異型) は 14-3-3 蛋白とのインキュベーションにより、自己重合によるフィラメントが観察されたが、PKA によってリン酸化されたタウ蛋白ではこれが観察されなかった。

D. 考察と結論

今までタウ蛋白の自己重合実験は主にヘパラン硫酸によって誘導される条件下でおこなわれてきた。ヘパラン硫酸は脳内に存在する物質であるが、主に細胞外に局在し、細胞内に局在するタウ蛋白の自己重合メカニズムを明らかにするという意味では不十分な側面があった。そこで、細胞内に豊富に存在する 14-3-3 蛋白を用いて、我々は今までに以下のことを明らかにしてきた。1) タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合には 2 つの様式があり、リン酸化に依存しない様式では微小管結合領域に結合し、リン酸化を介した結合様式ではリン酸化した Ser214 部位に結合する。2) 微小管結合ドメインを介する結合のみが自己重合促進的であり

リン酸化した Ser214 部位に結合は抑制的になる。そこで、FTDP-17 変異によるタウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性およびタウ蛋白自己重合能への影響の検討をおこなった。

今回、14-3-3 蛋白と FTDP-17 変異タウ蛋白との関係を解析し、以下の結果を得た。1) リン酸化を伴わない場合、タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合親和性については FTDP-17 変異により 3-4 倍増強していた。そしてタウ蛋白をリン酸化することにより、この結合親和性はさらに亢進したが、その場合は解離乗数は野生型タウ蛋白も変異型タウ蛋白も同程度の値を示した。2) リン酸化を伴わない場合、14-3-3 蛋白によるタウ蛋白重合の誘導については、P301L、delK280、R406W 変異によって重合は亢進した。しかし、リン酸化することにより野生型および変異型タウ蛋白全てにおいて重合は抑制された。FTDP-17 変異により結合親和性が亢進したことは、おそらくアミノ酸変異によりコンフォメーションの変化が生じたものと考えられる。タウ蛋白と微小管との解離乗数は約 1.6×10^{-7} M であるので、野生型タウ蛋白は 14-3-3 蛋白よりも微小管の方が親和性が高いが、変異があるとタウ蛋白は微小管よりも 14-3-3 蛋白の方が親和性が高いことになる。よって、変異によって病的状態にシフトしてゆく可能性が考えられる。しかし、PKA によってリン酸化されると、結合親和性がはるかに亢進するものの、重合が抑制されているということは、リン酸化によってタウ蛋白に全く別のコンフォメーション変化を引き起こしている可能性が考えられる。これらのことから、Ser214 部位をリン酸化する酵素 (PKA または PKB など) を活性化することは、細胞内でのタウ蛋白の凝集を抑制し、治療に応用される可能性が考えられる。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mori K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Yanagida K, Kodama TS, Tatsumi S, Fujii K, Tanimukai H, Hashimoto R, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Funamoto S, Ihara Y, Takeda M. The production ratios of AICDe51 and A842 by intramembrane proteolysis of β APP do not always change in parallel. *Psychogeriatrics*. 10(3):117-123,

2010.

- 2) Hayashi N, Kazui H, Kamino K, Tokunaga H, Takaya M, Yokokoji M, Kimura R, Kito Y, Wada T, Nomura K, Sugiyama H, Yamamoto D, Yoshida T, Currais A, Soriano S, Hamasaki T, Yamamoto M, Yasuda Y, Hashimoto R, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Morihara T, Takeda M. KIBRA genetic polymorphism influences episodic memory in Alzheimer's disease, but does not show association with disease in a Japanese cohort. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 30(4):302-308, 2010.
- 3) Takeda M, Martínez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M, Tagami S, Morihara T, Hashimoto R, Cacabelos R. Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings. *Psychiatry Clin Neurosci*. 64(6):592-607, 2010.
- 4) 田中稔久, 武田雅俊 「特集 認知症治療の今後を予測する 5. タウオパシーの治療の今後 ~近未来に向けて解決すべき治療・予防戦略 ~」 *医薬ジャーナル* 46:1387-11394, 2010.
- 5) 田中稔久, 武田雅俊 認知症の発症にかかわる遺伝子 タウ 老年精神医学雑誌 21; 532-541, 2010.
- 6) 田中稔久, 武田雅俊 「特集 アルツハイマー病(AD)への新たな挑戦 -AD 治療薬登場後の 10 年と今後- 11. 開発中の AD 治療薬 5) タウタンパクを標的とした治療」 *Progress in Medicine* 30:2153-2155, 2010.
- 7) Currais A, Kato K, Canuet L, Ishii R, Tanaka T, Takeda M, Soriano S. Caffeine Modulates Tau Phosphorylation and Affects Akt Signaling in Postmitotic Neurons. *J Mol Neurosci*. 43(3):326-332, 2011.

2. 学会発表

- 1) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Fukusyo E, Tanimukai H, Tagami S, Okochi M, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Identification of a gene which controls Abeta accumulation using App Tg mice with mixed genetic background The 13th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul,10-15,2010, Hawaii, U.S.A.
- 2) 加藤希世子、田中稔久、Golam Sadik、Antonio Currais、柳健太郎、馬場都、丸山大輔、武田雅俊 アポトーシス阻害蛋白 XIAP の PKC に

よるリン酸化を介した細胞死抑性メカニズムの解析 第29回日本認知症学会 2010.11.5-7. (愛知県名古屋市)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。