

20116003A

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 23 年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 24 年 (2012 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. 線維化阻害剤とペプチドワクチンによるタウ蓄積の制御……………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. 脳虚血スナネズミを用いたシャペロン誘導剤の効果の検討……………16
工藤 喬
4. タウの分解・重合過程に関する研究……………18
田中 稔久
5. アルツハイマー病患者と経度認知障害患者の精神行動障害……………22
数井 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……………24
武田 雅俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………27

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………30

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既存薬 X1 が得られ、P301L タウ発現マウスに投与したところ、神経障害の抑止が認められた。また、小胞体(ER)ストレスによりタウに結合する CHIP の低下が見られ、タウの分解が遅延することを確認し、ER ストレスの抑止がタウ凝集阻害に繋がる可能性が示された。さらに、タウ発現マウスにリン酸化タウペプチドを用いたワクチンを投与したところ、タウの蓄積の現象が観察された。分解促進の観点からは、シャペロン誘導剤 BIX はスナネズミの脳虚血モデルに起こる遅発性神経細胞死にも効果がある事が示された。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としては、精神行動障害に注目すべき事を指摘した。

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 国立長寿医療研究センター・分子基盤研究部長

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

A.研究目的

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顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

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。その中から IC50 が 100nM 以下で阻害効果を示す化合物を選択する。

②線維化阻害剤とペプチドワクチンによるタウ蓄積の制御

P301L 変異タウを発現するトランスジェニックマウスの hemi 接合体の雌マウス(12 週齢)に、ポリフェノール化合物の exifone, gossypetin, フェノチアジン化合物として lacmoid, ポルフィリン化合物として hematin をそれぞれ、

粉餌に 0.05 か 1%の濃度で混合し、32 週齢まで経口投与した。その後、マウスの運動機能障害をロタロッド試験で、脳、脊髄に蓄積するリン酸化タウを免疫組織科学、及びウエスタンブロットにて解析した。

ワクチンの検討は、2 種類のリン酸化 タ ウ ペ プ チ ド RENA KAKTDHGAEIVYKSPVVS GDT SPRHL(pS396/404),

STGSIDMVDS PQLATLADE(pS422) を、16 週齢から 34 週齢まで、2 週-4 週おきに合計 6 回、免疫した。5 ヶ月齢の時点で採血し、免疫した抗原に対する抗体価の上昇を ELISA 法で測定した。

③ER ストレスによる神経細胞内タウ凝集の検討

HEK293 細胞にタウの ORF ベクターをリポフェクションでトランスフェクションし、24 時間静置する。培地中のグルコース除去を行った後、24 時間後に細胞を RIPA バッファーで回収する。TAU-5 抗体による免疫沈降を行い、抗 CHIP 抗体などによるウエスタンブロットを行った。

④脳虚血スナネズミを用いたシャペロン誘導剤の効果の検討

60-80g のスナネズミを 2.5% isoflurane および 70%笑気で麻酔し、両側総頸動脈を露出する。両側総頸動脈は Sugita No.51 動脈瘤クリップを用いて 10 分間血流遮断を行った。手術中、ヒーティングパッドを用いてネズミの体温は 36.5-37.0°C に保持した。BIX は 10%DMSO で溶解し、10 μ g あるいは 40 μ g を脳室内に虚血 30 分前

に投与した。一過性脳虚血7日後、4% paraformaldehyde で灌流固定し、cresyl violet、NeuN、TUNEL 染色を行った。

⑤AD患者と軽度認知障害(MCI)患者の精神行動障害の評価

Tauopathy は精神行動障害と関連するとの知見があり、ADとMCIの精神行動障害について検討した。大阪大学医学部附属病院神経科精神科神経心理専門外来を受診し、以下のADとMCIの診断基準を満たす患者に対して Neuropsychiatric Inventory (NPI)で精神行動障害の評価を行った。ADの診断基準は NINCDS-ADRDA の probable AD の診断基準を満たす患者とした。また MCI の診断基準は Petersen の基準で、物忘れを自覚、または他覚しているが、日常生活は自立している、Mini Mental State Examination (MMSE) > 23、Clinical Dementia Rating が 0.5、Wechsler Memory Scale- Revised の論理的記憶検査で健常者の平均点から 1.5SD 以上低いこととした。また頭部 Magnetic Resonance Imaging や脳血流 Single Photon Emission Computed Tomography の結果も診断の参考とした。

C.研究結果

①顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

理研化合物バンク 6600 から得られた既存薬 X1 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。X1 は 100nM 以下で SDS 不

溶性タウ形成阻害が観察されることが示された。そこで、P301L 変異タウを発現するモデルマウス 19ヶ月令を用いて3ヶ月間経口で X1 を投与した。非投与群と比べ投与群では脳各部位でのサルコシル不溶性タウ量は有為に 25%-50%低下を示した。神経細胞数を脳各部位で計測したところ P301L では non-Tg 群と比べて 15-25%の有為な神経細胞脱落観察されるが、X1 投与群では non-Tg マウスと同程度の細胞数を示し、タウ凝集による神経細胞脱落を阻止していることが示された。Mn-enhanced MRI 法はマウスなど小動物の行動課題中の神経活動をモニターする方法である。P301L マウスと non-Tg を比較すると場所記憶時に prelimbic で P301L マウスの神経活動の低下が観察される。X1 投与群ではこの活動低下は抑制され、non-Tg と同様の神経活動を示すようになる。P301L マウスの神経活動低下と X1 によるその抑制を確認するためオープンフィールドを利用した行動実験を行った。全体の行動量で変化は見られなかったが P301L マウスは最初の1分間で有為な行動低下を示す。これは P301L マウスでは prelimbic の関与する恐怖抑制機能が低下していることを示す。X1 投与群では最初の1分間での行動は non-Tg と同程度であり、恐怖抑制機能が正常に作用することを示した。

②線維化阻害剤とペプチドワクチンによるタウ蓄積の制御

薬剤を投与しない対照マウスに比

較して、1% exifone 投与マウスにおいて顕著なリン酸化タウ陽性構造物の減少が観察された。P301L タウ Tg マウスでは 12 週齢頃から脊髄にリン酸化タウの蓄積が認められ、神経細胞の変性や機能障害を起こすことが報告されている。そこで薬剤投与終了後に、マウスから脊髄を取り出し、サルコシル不溶性画分を pS396 抗体でウエスタンブロット解析した。その結果、個体間のばらつきはあるものの、1% exifone 投与群で約 50%程度、0.1% lacmoid で約 75%程度のリン酸化タウ蓄積量の減少を認めた。

これまでに P301L タウ Tg マウスのタウ蓄積の減少効果が報告されているタウのリン酸化ペプチド (pS396/404)に加え、最 C 末端のリン酸化部位 pS422 を含むリン酸化ペプチドを免疫し、抗体価の上昇、タウ蓄積への効果を解析した。その結果、いずれの抗原を投与したマウスにおいても、免疫したペプチドに対する抗体価の上昇が観察された。タウ蓄積への効果については、pS396/pS404 のリン酸化ペプチドを免疫したマウスにおいては不溶性タウの減少は観察されなかったが、pS422 を免疫した群では不溶性タウの減少傾向が観察された。

③ER 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。

24 時間グルコース除去を行う事により、eIF2 α のリン酸化が生じ、ER ストレスが付加されたことが確認さ

れた。このような ER ストレス条件下で抗タウ抗体 (Tau-5) によって免疫沈降された CHIP は減少していた。すなわち、ER ストレス下ではタウに結合する CHIP が減少しており、タウのユビキチン化およびプロテアソームにおける分解が遅延することが示唆された。

④脳虚血スナネズミを用いたシヤペロン誘導剤の効果の検討

我々は、一過性脳虚血/再灌流を施されたスナネズミにおける脳室内投与した BIX の効果について検討した。一過性脳虚血/再灌流後のスナネズミの海馬 CA1 領域は遅発性神経細胞死と呼ばれる現象が有名である。cresyl viole 染色によれば、vihcle 投与で見られた虚血 7 日後の神経細胞の欠落が観察されたが、40 μ g BIX 投与群では有意に神経細胞の存続が認められ、10 μ g BIX 投与群にもその傾向が観察された。また NeuN 染色によれば、10 μ g および 40 μ g BIX とともに、7 日後の遅発性神経細胞死を有意に抑制していた。虚血 7 日後の CA1 領域の TUNEL 染色では、10 μ g および 40 μ g BIX とともに TUNEL 陽性錐体細胞の出現を有意に抑制していた。

⑤AD 患者と軽度認知障害 (MCI) 患者の精神行動障害の評価

対象となった AD は 50 例であった。平均年齢は 73.0 \pm 8.7 歳、MMSE の合計点の平均は 17.2 \pm 5.6 点であった。NPI で評価した 12 の精神行動障害を有する患者の率は、多い順に、無為 (44%)、興奮 (42%)、不安 (32%)、

妄想 (30%)、うつ (30%)、異常行動 (19%)、易刺激性 (17%)、食行動異常 (12%)、睡眠障害 (9%)、脱抑制 (8%)、幻覚 (4%)、多幸 (0%)であった。

対象となった MCI は 16 例であった。平均年齢は 74.1 ± 9.5 歳、MMSE の合計点の平均は 25.9 ± 1.6 点であった。NPI で評価した 12 の精神行動障害を有する患者の率は、多い順に、無為 (63%)、興奮 (38%)、不安 (25%)、うつ (19%)、妄想 (13%)、睡眠障害 (6%)、易刺激性 (6%)、異常行動 (0%)、食行動異常 (0%)、脱抑制 (0%)、幻覚 (0%)、多幸 (0%)であった。

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 セ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えられている。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。

近年、AD をはじめとする神経変性疾患の病態過程に ER ストレスが関与する

とした知見が多く報告されている。そこで本研究では、tauopathy すなわち神経細胞におけるタウの凝集と ER ストレスの関係について検討している。前年度までの検討では、ER ストレスはタウの分解を遅延させ、タウ蛋白の蓄積を生じることを明らかにし、その原因としてタウの E3 ライゲースである CHIP の減少を指摘した。本年度のさらなる検討では、タウに結合している CHIP の減少を確認し、タウのユビチン化が減少し、タウの分解遅延が起こる事が明らかとなった。ER ストレスによってタウに結合する CHIP が減少するメカニズムは今後の検討課題であるが、ER ストレスを軽減する薬剤、例えば本研究で取り組んでいるシャペロン誘導剤などが、tauopathy に効果をもたらすことが示されている。

このシャペロン誘導剤 BIX は、ER ストレスにおけるシャペロンである BiP を選択的に誘導する薬物である事が確認され、ER ストレスによる神経細胞死に効果を持つことを示してきた。スナネズミの虚血モデルにおける遅発性神経細胞死は、神経変性過程に類似した病理過程であり、この病態にも BIX が効果を持つことが示されたことは、脳梗塞巣周辺領域のペネンブラに効果を持つことも勘案すると、BIX は神経変性過程の抑止することで、タウ凝集を防止できるかもしれない。

本研究では、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た。その中で既存薬である X1 が得られ、P301L タウ発現マウスの、不溶性タウの形成阻

害と行動異常の阻止が観察されている。この X1 は既存薬であり、毒性の問題などは比較的容易にクリアできる可能性があり、早期の臨床応用が期待される。

本研究では、アミロイドの治療として有名となったワクチン療法をタウに応用した。実際に2種類のタウリン酸化ペプチドをマウスに免疫すると、タウに対する抗体価の上昇が観察され、タウ蓄積の減少傾向が観察された。また、プレリミナリーな結果であるが、今後のタウワクチンの開発が期待された。

Tauopathy は AD の精神行動障害に関与しているといわれるため、tauopathy の治療を評価する上で、精神行動異常は重要である。本年の検討で、MCIにおいてもAD患者と同様の頻度と重症度の精神行動障害を呈しうることが明らかになった。従って、tauopathy に対する治療薬開発は、MCIの段階も考慮したものにならなければならない。

E. 結論

Tauopathy に対する薬物の候補として、既存薬 X1、タウワクチン、シヤペロン誘導剤 BIX、さらに ER ストレスに効く薬物が上げられた。

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. Tsuji H, et al (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116–121.
3. Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 415(3):519-525.
4. Oida Y, Izuta H., Oyagi A., Shimazawa M., Kudo T, Imaizumi K., and Hara H, Induction of BiP, ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil, *Brain Res.* 2008; 1208: 217-224.
5. Kazui H, Yoshida T, et al. Different characteristics of cognitive impairment in elderly schizophrenia and Alzheimer's

disease in the mild cognitive
impairment stage. Dement
Geriatr Cogn Disord Extra
1:20-30, 2011.

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

線維化阻害剤とペプチドワクチンによるタウ蓄積の制御

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：鈴掛雅美¹⁾

¹⁾ 東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室

研究要旨

タウ線維凝集阻害物質の検索と治療への応用について検討した。P301L 変異タウ発現マウスに、タウ線維化阻害剤をモデルマウスに経口投与してタウの蓄積を観察した。その結果、いくつかの化合物でタウの蓄積の減少が観察された。また 2 種類のリン酸化タウペプチド (Ser396、Ser422 のリン酸化) をタウ発現マウスにワクチン投与し、凝集体形成を抑制する効果があるかどうか継続して観察した。顕著な効果は観察されなかったが、ワクチン投与群で抗体価の上昇認められ、タウ蓄積の減少傾向が観察された。

キーワード：タウ, 低分子化合物, ワクチン, リン酸化, 伝播

A.研究目的

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。タウの蓄積を抑えることができれば、AD の進行を止めることができる可能性が本研究では試験管内タウ線維化評価系で効果の認められたいくつかの化合物を、P301L 変異タウを発現するトランスジェニックマウスに経口投与し、その効果を解析した。また 2 種類のタウのリン酸化ペプチドをワクチンとして投与し、その効果について検討した。

B.研究方法

P301L 変異タウを発現するトランスジェニックマウスの hemi 接合体の雌マウス(12 週齢)に、ポリフェノール化合物の exifone, gossypetin, フェノチアジン化合物として lacmoid, ポルフィリン化合物として hematin をそれぞれ、粉餌に 0.05 か 1% の濃度で混合し、32 週齢まで経口投与した。その後、マウスの運動機能障害をロタロッド試験で、脳、脊髄に

蓄積するリン酸化タウを免疫組織科学、及びウエスタンブロットにて解析した。

ワクチンの検討は、2 種類のリン酸化タウペプチド(RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHL: pS396/404), STGSIDMVDSPLATLADE: pS422)を、16 週齢から 34 週齢まで、2 週-4 週おきに合計 6 回、免疫した。5 ヶ月齢の時点で採血し、免疫した抗原に対する抗体価の上昇を ELISA 法で測定した。

(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. 線維化阻害剤の効果

マウス脊髄に蓄積する異常リン酸化タウについて、AT8(pS202/pT205)、pS396 抗体を用いて免疫組織学的観察を行った。その結果、薬剤を投与

しない対照マウスに比較して、1% exifone 投与マウスにおいて顕著なリン酸化タウ陽性構造物の減少が観察された。P301L タウ Tg マウスでは 12 週齢頃から脊髄にリン酸化タウの蓄積が認められ、神経細胞の変性や機能障害を起こすことが報告されている。そこで薬剤投与終了後に、マウスから脊髄を取り出し、サルコシル不溶性画分を pS396 抗体でウェスタンブロット解析した。その結果、個体間のばらつきはあるものの、1% exifone 投与群で約 50%程度、0.1% lacmoid で約 75%程度のリン酸化タウ蓄積量の減少を認めた。一方、1% lacmoid, 1% hematin, 1% gossipetin も投与群では対照群とほぼ同程度の量のタウ蓄積が観察された。

2. ペプチドワクチンによるタウ蓄積の制御

これまでに P301L タウ Tg マウスのタウ蓄積の減少効果が報告されているタウのリン酸化ペプチド(pS396/404)に加え、最 C 末端のリン酸化部位 pS422 を含むリン酸化ペプチドを免疫し、抗体価の上昇、タウ蓄積への効果を解析した。その結果、いずれの抗原を投与したマウスにおいても、免疫したペプチドに対する抗体価の上昇が観察され、用いたリン酸化ペプチドが抗原性を有しており、抗体産生に有効であることが確認された。タウ蓄積への効果については、pS396/pS404 のリン酸化ペプチドを免疫したマウスにおいては不溶性タウの減少は観察されなかったが、pS422 を免疫した群では不溶性タウの減少傾向が観察された。N 数が少ないので傾向としかいえないが、リン酸化 Se422 のワクチン療法によってリン酸化タウが減少する可能性が示唆された。

D. 考察

試験管モデルでタウの線維化を抑制する化合物が、本解析により、P301L タウ Tg マウスにおいても、経口投与により、リン酸化タウの蓄積、さらにはタウ蓄積による運動機能低下に

有効である可能性が示唆された。p301L タウ Tg マウスにおけるタウの蓄積が個体間でのばらつきが比較的大きいことから、今後一群の個体数を増やして検討する必要がある。lacmoid は 0.1%をえさに混ぜて投与した群では有為にタウ蓄積の減少が観察されたが、1% 投与群ではあまり効果が認められなかった。この理由は不明であるが、lacmoid を 1%濃度で粉餌に混合した場合、濃度が高すぎて餌を食べなかった可能性が考えられる。

ワクチン療法については、これまでの報告のあった pS396/404 リン酸化ペプチドよりも、最 C 末端に位置するリン酸化部位である pS422 のリン酸化を含むペプチドの方がより効果が強い可能性が示唆された。こちらにも一群の引数を増やして検討を行う必要があるが、ペプチドワクチンが細胞内のタウの蓄積に大しても有効である可能性が示唆されたことは意味深いと思われる。

E. 結論

タウの線維化を抑制する低分子化合物を P301L タウ Tg マウスに経口投与し、その運動機能低下、脊髄におけるリン酸化タウの蓄積量について解析した結果、ポリフェノール化合物の exifone, フェノチアジン化合物の lacmoid において、タウの蓄積を抑え、運動機能障害を低減する可能性が示唆された。またリン酸化タウペプチドを免疫するタウのペプチドワクチンについてもタウ蓄積、およびその蓄積による機能障害を改善する効果が示唆される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tsuji H, et al (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of

protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116–121.

2. Foulds PG, et al (2011) Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25: 4127-37.

3. Foulds PG, et al (2012) Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45:188-95.

4. Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485

5. Nonaka T and *Hasegawa M (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases. *Commun & Integ Biol* 4, 501-502.

6. Meyerowitz J, et al (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol Neurodegener* 6:57.

2. 学会発表

1. Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, 2011. 8. 2, Melbourne.

2. Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M,

Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H: TDP-43 in Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. 2011. 2. 22, Tokyo.

3. Yamashita M, Nonaka T, Akiyama H, Hasegawa M. C-terminal TDP-43 inclusion suppress proliferation mediated by transcriptional dysregulation. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11), 2011.07. Paris, France.

4. Suzukake M, Watanabe S, Suzuki N, Hisanaga S, Hasegawa M. Evaluation of the tau aggregation inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

5. Nonaka T, Watanabe S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Cellular models of seeded aggregation of alpha-synuclein and tau. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

Ⅲ. 知的所有権の取得状況 (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

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（国立長寿医療研究センター、分子基盤研究部）

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 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 X1 が得られた。X1 を P301L tau を発現するマウスモデルに投与するとタウ凝集、それに伴う神経脱落、学習行動中の神経機能低下と行動異常の阻止が観察された。X1 は既存薬であるため安全性は担保されており、早期の臨床試験開始が期待される。

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。その中から IC50 が 100nM 以下で阻害効果を示す化合物を選択する。

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。これらの化合物から試験管内タウ凝集系を用いて神経毒性を示すタウ凝集阻害を示す 3 化合物が選択された。その内 2 化合物は共通の骨格を有しており、この骨格を持つ既存薬でタウ凝集阻害効果を検討したところ全てでタウ凝集阻害が確認された。この骨格を持ち細胞膜透過性を有する X1 を第一の候補とし 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。X1 は 100nM 以下で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察されることが示された。そこで、P301L 変異タウを発現するモデルマウス 19ヶ月令を用いて3ヶ月間経口で X1 を投与した。非投与群と較べ投与群では脳各部位でのサルコシル不溶性タウ量は有為に 25%-50%低下を示した。神経細胞数を脳各部位で計測したところ P301L では non-Tg 群と比べて 15-25%の有為な神経細胞脱落が観察されるが、X1 投与群では non-Tg マウスと同程度の細胞数を示し、タウ凝集による神経細胞脱落を阻止していることが示された。Mn-enhanced MRI 法はマウスなど小動物の行動課題中の神経活動をモニターする方法である。P301L マウスと non-Tg を比較すると場所記憶時に prelimbic で P301L マウスの神経活動の低下が観察される。X1 投与群ではこの活動低下は抑制され、non-Tg と同様の神経

活動を示すようになる。P301L マウスの神経活動低下と X1 によるその抑制を確認するためオープンフィールドを利用した行動実験を行った。全体の行動量で変化は見られなかったが P301L マウスは最初の 1 分間で有為な行動低下を示す。これは P301L マウスでは prelimbic の関与する恐怖抑制機能が低下していることを示す。X1 投与群では最初の 1 分間での行動は non-Tg と同程度であり、恐怖抑制機能が正常に作用することを示した。

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。マウスに経口投与を行った検討においてもタウ凝集を阻害したことから脳血液関門を投下する化合物であると考えられる。化合物 X1 の動物実験ではタウ凝集抑制と共に神経脱落、神経機能低下、行動異常の抑制が観察された。このことから、アルツハイマー病などで観察される神経脱落、認知症がタウ凝集を起因として生じ、これを阻害することによって治療が可能であることが考えられた。

E.結論

タウ凝集阻害剤 X1 は既存薬であり、モデル動物を用いた実験でタウ凝集抑制と共に神経脱落、神経機能低下、行動異常の抑制を示した。このことから X1 がアルツハイマー病を含むタウオパチーの有効な治療薬となる可能性が示された。

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
- Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M. Phenolic Compounds Prevent Amyloid β -Protein Oligomerization and Synaptic Dysfunction by Site-specific Binding. *J Biol Chem*. 2012 Apr 27;287(18):14631-43.
- Ferree A, Guillily M, Li H, Smith K, Takashima A, Squillace R, Weigle M, Collins JJ, Wolozin B. Regulation of Physiologic Actions of LRRK2: Focus on Autophagy. *Neurodegener Dis*. 2012;10(1-4):238-41.
- Yoshiike Y, Yamashita S, Mizoroki T, Maeda S, Murayama M, Kimura T, Sahara N, Soeda Y, Takashima A. Adaptive responses to alloxan-induced mild oxidative stress ameliorate certain tauopathy phenotypes. *Aging Cell*. 2012 Feb;11(1):51-62.
- Mutsuga M, Chambers JK, Uchida K, Tei M, Makibuchi T, Mizorogi T, Takashima A, Nakayama H. Binding of curcumin to senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in the aged brain of various animals and to neurofibrillary tangles in Alzheimer's brain. *J Vet Med Sci*. 2012 Jan;74(1):51-7.
- Takasaki J, Ono K, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- β in vitro. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(2):271-80.
- 6: Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF. Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J Neurosci*. 2011 May 25;31(21):7840-7.
- 7: Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N. Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the

nucleus accumbens in tauopathy model mice. **Neurobiol Dis.** 2011 Jun;42(3):404-14.

3. 著書、Chapters

Akihiko Takashima

Tauopathy and Brain Aging, (Cytoskeleton of the Nervous System. R.A. Nixon and A. Yuan eds) *Advances in Neurobiology* vol 3, Chapter5, 133-150, Springer, 2011

Akihiko Takashima

Animal Models of Amyloid/PS1 Pathology (Animal Models for Neurodegenerative Disease, J. Avila, J.J. Lucas, and F. Hernandez eds) *RSC Drug Discovery* Chapter 2, 15-38 RSC Publishing, 2011

Yuji Yoshiike and Akihiko Takashima

Presenilin-Based Transgenic models of Alzheimer's disease (Animal models of Dementia (P.P. De Deyn and D Van Dam eds) *Neuro methods* 48, Part4, Chapter 21, 415-438 Springer Protocols, 2011

高島明彦： β アミロイドとタウ、どちらがアルツハイマー病治療薬の標的としてふさわしいのだろうか？

御子柴克彦編、*実験医学増刊、in vivo 実験医学によるひと疾患解明の最前線*、p211-217、2012

高島明彦：アルツハイマー病、山村研一、若菜茂晴編、中山書店、*疾患モデルマウス表現型解析指南*、p58-64、2011

高島明彦：タウオパチーモデルマウス、三品

昌美編、*脳、神経疾患-疾患モデルの作成と利用* LICp138-144,2011

学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

高島明彦

第39回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「アルツハイマー病治療薬-対症療法から根本治療へ」2011年10月19日、東京

国際学会発表

1 Takashima A

Role of tau and GSK-3 β in synaptic plasticity connecting to tauopathy. Tau workshop in UCSF. San Francisco, March27-30, 2011.

2 Takashima A

Physiological role of tau in synaptic plasticity, synaptic function affect on NFT formation, Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York, June 16, 2011

3 Takashima A

Role of tau aggregation in neurodegenerative disease. New York state university Albany symposium, Dialogue. June 15, 2011

4 Takashima A

The relations of Tau and β amyloid, Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris France, July16-21, 2011

5 Takashima A

Relationship between tau aggregation and synapse loss, and neuronal loss

3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, Melbourne, Australia, July31-August4, 2011

T6 akashima A

Pathological and physiological function

of tau; how tau is involved in neurodegeneration.

International Symposium of neurodegenerative disease
Nantong, P. R. China, 9 October

7 Takashima A

Pathological and physiological function of tau; how tau is involved in neurodegeneration. Wuhan medical school, P. R. China, October 13, 2011

8 Takashima A

General overview on Tau, Advances in Neuroscience for Medical Innovation, Saint-Jean Cap Ferrat, France, November 17-19, 2011

9 Takashima A

Tau and GSK-3 β are required for maintaining brain function at old age. AACL (Asian Aging Core for Longevity), Nagasaki, Nov. 21-22, 2011

10 Takashima A

The biology and pathology of Tau and its role in tauopathies II

8-9 January 2012

Robinson College Cambridge, UK

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

発明者 : 高島明彦、添田義行、長田裕之

発明の名称 : タウ凝集阻害剤

出願年月日 : 国内出願 平成 23 年 10 月 3 日

国際出願 平成 16 年 12 月 1 日

出願番号 : 特願 2011-219059 (国内)

出願人 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財

2.実用新案登録

3.その他

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

分担研究報告

脳虚血スナネズミを用いたシャペロン誘導剤の効果の検討

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: 一昨年度、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。昨年度はマウスモデルを用いて、臨床的意義がある ER ストレス負荷後投与について検討し、効果を確認できた。本年度は、動物種をスナネズミに変えて、BIX の ER ストレスに対する効果を検討し、スナネズミにおける遅発性神経細胞死にもマウスと同様な効果を発現することが確認できた。

キーワード: ER ストレス、シャペロン、脳虚血、スナネズミ

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。昨年度、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 ER ストレス後に投与したときの効果について検討した。本年度は、動物種をスナネズミに変えて、BIX の ER ストレスに対する効果を検討し、BIX の臨床応用の可能性について考察する。

B. 研究方法

60–80g のスナネズミを 2.5% isoflurane および 70% 笑気で麻酔し、両側総頸動脈を露出する。両側総頸動脈は Sugita No.51 動脈瘤クリップを用いて 10 分間血流遮断を行った。手術中、ヒーティングパッドを用いてネズミの体温は 36.5–37.0°C に保持した。

BIX は 10%DMSO で溶解し、10 μg あるいは 40 μg を脳室内に虚血 30 分前に投与した。

一過性脳虚血 7 日後、4 % paraformaldehyde で灌流固定し、cresyl violet、NeuN、TUNEL 染色を行った。

C. 研究結果

我々は、一過性脳虚血/再灌流を施されたスナネズミにおける脳室内投与した BIX の

効果について検討した。

一過性脳虚血/再灌流後のスナネズミの海馬 CA1 領域は遅発性神経細胞死と呼ばれる現象が有名である。cresyl viole 染色によれば、vehicle 投与で見られた虚血 7 日後の神経細胞の欠落が観察されたが、40 μ g BIX 投与群では有意に神経細胞の存続が認められ、10 μ g BIX 投与群にもその傾向が観察された。また NeuN 染色によれば、10 μ g および 40 μ g BIX とともに、7 日後の遅発性神経細胞死を有意に抑制していた。

虚血 7 日後の CA1 領域の TUNEL 染色では、10 μ g および 40 μ g BIX とともに TUNEL 陽性錐体細胞の出現を有意に抑制していた。

D. 考察

スナネズミの一過性脳虚血/再灌流モデルでは、海馬 CA1 領域に虚血 3-4 日後に遅発性神経細胞死がおきる。この現象は、脳梗塞後の神経細胞障害のモデルとして注目されているが、この CA1 領域では、早期に ER ストレス反応が起きることが示されており、遅発性神経細胞死に対する ER ストレスの関与が興味深い。

今回の検討では、スナネズミに生じる遅発性神経細胞死に対し、BIX が一定の効果を示すことを証明した。昨年、一昨年の検討では、マウスの脳梗塞モデルで梗塞周囲のペネンブラ領域に BIX が効果をもたらすことを示している。ペネンブラ領域の拡大および遅発性神経細胞死は、進行性の神経細胞障害のモデルであり、BIX が双方に効果

をもたらすことは、神経変性過程への効果も期待できると考えられる。

また、マウスばかりではなく種が違うスナネズミにも BIX は効果を示すことから、ヒトへの臨床応用が期待される。

E. 結論

BIX はスナネズミの遅発性神経細胞死脳虚血に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. Oida Y., Izuta H., Oyagi A., Shimazawa M., Kudo T., Imaizumi K., and Hara H, Induction of BiP, ER-resident protein, prevents the neuronal death induced by transient forebrain ischemia in gerbil, Brain Res. 2008; 1208: 217-224.
2. Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, Kudo T., Takeda M. Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress. Biochem Biophys Res Commun. 2011; 415(3):519-525.

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：タウの分解・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 丸山大輔、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、タウ蛋白の代謝分解過程および自己重合過程の詳細は明らかではない。タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合に関するリン酸化の影響に関して検討から、タウ蛋白と 14-3-3 蛋白とのリン酸化を介した結合では、リン酸化した Ser214 部位に結合することが知られており、このリン酸化はタウ蛋白の自己重合に抑制的に働いている。そこで、Ser214 部位のリン酸化が不可能な S214A 変異タウ蛋白を導入し、培養細胞内におけるタウ蛋白の分解を解析することにした。パルスチェイス法によって分解過程を追跡したところ、タウ蛋白の分解速度は野生型タウよりも S214A 変異タウの方が亢進していた。分解速度の差に関しては、タウ蛋白と 14-3-3 との強固な複合体形成が関与する可能性と、蛋白自体のリン酸化によるプロテアーゼ耐性が亢進している可能性が考えられた。タウの Ser214 部位のリン酸化を制御することにより、細胞内でのタウ蛋白の分解を促進する可能性が示唆された。

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

神経原線維変化の構成成分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。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ており、神経変性におけるタウ蛋白の重要性が言われている。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、タウ蛋白の分解される過程および重合・蓄積する過程の統一的理解を得るために、Ser214 部位を Ala に置換したタウコンストラクトを作成し、細胞内における分解の過程と、細胞内局在の変化などに関して検討をおこなうこ