

投与した。

C. 研究結果

SK-N-SH 細胞に BIX を投与したところ、濃度依存性に BiP を誘導することが示された。また、BIX は calreticulin などのシャペロンを若干誘導するものの、ほぼ選択的に BiP を誘導し、他の ER ストレス反応の分子への影響は認められなかった。

SK-N-SH に 5 μ M の BIX を 12 時間投与し、tunicamycin で ER ストレスをかけたところ、36、48 時間後のアポトーシスが抑制される。

マウスの中大脳動脈を閉塞した脳梗塞モデルに BIX を脳室内投与した。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ペネンブラにおける 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。

スナネズミを用いた一過性脳虚血では、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

AD を初めとする神経変性疾患の病態過程に ER ストレスが関与していることが最近の研究で明らかになってきている。ER ストレスに対し、生体にはそれから生じる細胞障害を抑止する 3 つの ER ストレス反応が存在するが、これらの反応を人為的に補助することが治療法開発に繋がると考えられる。そこで今回、ER ストレス反応の 1 つであるシャペロンを誘導する薬物開発に取り組んだ。

ER シャペロンである BiP のプロモーターを用いたアッセイ系で選択した BIX は BiP を選択的に誘導し、他の ER ストレス反応の分子を変化させないことが分かり、シャペロン誘導剤として臨床使用できる最低限の条件をクリアしている。

マウスを用いた中大脳動脈閉塞モデルでは、脳室内投与した BIX が脳梗塞周辺部位ペネンブラで ER ストレスによるアポトーシスを抑止することが示された。また、スナネズミを用いた一過性脳虚血モデルでは、虚血後におこる遅発性神経細胞死を BIX が抑止することが示されている。ペネンブラにおける神経細胞死や遅発性神経細胞死は脳虚血負荷後に起きる進行性の神経細胞死であり、神経変性過程と類似点が多い。従って、これらの進行性病変に BIX が効果を示したことは、この薬剤が神経変性抑制の効果を持つ可能性を示唆している。

しかしながら、今回用いたモデルは脳虚血であり、今後 AD モデルあるいは神経変性

モデル動物での検討が必要である。また、BIX の投与方法も腹腔内投与や経口投与が検討されるべきである。

E. 結論

BIX は進行性の神経細胞死抑制効果があり、AD あるいは神経変性疾患への臨床応用が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oida Y, Izuta H, Oyagi A, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, 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. 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, Imaizumi K, 1. Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2010; 28:131-138.
3. Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Yasuda T, Hara H, Post-treatment of

a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett* 2010; 484: 43-46.

4. Ishisaka M, Kudo T, Shimazawa M, Kakefuda K, Oyagi A, Hyakkoku K, Tsuruma K, Hara H, Restraint-Induced Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes in the Mouse Brain. *Pharmacology & Pharmacy*, 2011; 2(1): 10-16.
5. 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.

2. 学会発表

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。

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 Golam Sadik、柳健太郎、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である。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。また、野生型タウおよび変異型タウを強制発現させた培養細胞を用いて、タウ蛋白の変化に関して解析をおこなった。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。パルスチェイス法を用いてタウ蛋白の分解過程を検討したところ、野生型タウに比べて FTDP-17 変異型タウの有意な分解遅延が認められた。さらに、リン酸化レベルについてリン酸化特異抗体を用いて検討をおこなったところ、V337M 変異型タウにおいて Thr231 のリン酸化が、R406W 変異型タウにおいて Ser396 および Ser409 のリン酸化が有意に亢進していた。そこで、このリン酸化の亢進が分解遅延の原因である可能性が示唆された。Ser214 部位のリン酸化が不可能な S214A 変異タウ蛋白を導入して解析したところ、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。以上より、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・重合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

アルツハイマー病 (AD) 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性疾患、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おり、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、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こし、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。前述の結合因子の中で 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、アポトーシス関連 BAD 蛋白、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。また、FTDP-17 変異によるタウ蛋白の分解についても検討をおこなうことにした。さらに、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とにした。

B. 研究方法

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。また、同様に S214A 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。

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

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。

野生型および S214A 変異型タウの細胞への導入

COS-7 細胞を 5% FCS を含む D-MEM (Gibco BRL) にて培養し、Lipofectamine2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて、野生型および変異型タウをトランスフェクションした。トランスフェクションをおこなった 24 時間後および 48 時間後、この細胞を RIPA バッファー (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium dodecylsulphate, Protease inhibitor cocktail (Sigma) 0.5 μ l/ml, 10nM Okadaic acid) にて溶解した lysates を 4°C、40K x G にて遠心し、その supernatant を得た。この supernatant を電気泳動し、さらに抗タウ蛋白ポリクローナル抗体 H150 (Santa Cruz, CA, USA) をもちいたウエスタンブロットによってタウ蛋白の発現レベルを解析した。

パルスチェイス法によって分解過程の解析

トランスフェクションをおこなった 24 時間後、Met-free medium (GIBCO) にて 1 時間培養し、その 3 時間後に EXPRE35S 35S Protein Labeling Mix (Perkin Elmer Japan, Kanagawa, Japan) を用いた 40 μ Ci の [³⁵S]Met を含むメEDIUM にて培養し、PBS にて細胞を洗浄したのちに、0 時間後および 24 時間後の細胞を RIPA バッファーにて回収した。そして同様の処理にて supernatant を回収したのちに、抗タウ蛋白モノクローナル抗体 Tau-5 ((Calbiochem, San Diego, CA, USA) および Protein G-Sepharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) をもちいた免疫沈降をおこない、ラベルされたタウ蛋白を回収した。このサンプルを用いて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーを行って、タウ蛋白の分解過程を検討した。

細胞内局在の検討

タウ蛋白の細胞内における局在を検討するために、ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) を用いて、細胞分画処理をおこなった。トランスフェクションをおこなった 24 時間後、細胞を洗浄液にて洗浄し、buffer I を添加し 4°C で 10 分間溶出させ、500 x G にて 10 分間遠心し、supernatant を fraction I とした。同様の処理を

buffer II および buffer III にておこない、それぞれ supernatant を fraction II および III とした。ここで、fraction I、II および III は、それぞれ、細胞質分画、膜/オルガネラ分画、核分画に対応している。これらを抗タウ蛋白ポリクローナル抗体 H150 を用いたウエスタンブロットによって解析した。

細胞内タウ蛋白リン酸化レベルの検討

野生型および変異型タウを COS-7 細胞に強制発現させたものからライセートを抽出し、抗タウ蛋白リン酸化特異抗体(リン酸化 Thr231、リン酸化 Ser396、リン酸化 Ser409)を用いたウエスタンブロットにより、タウ蛋白のそれぞれのリン酸化の程度を検討した。

C. 研究結果

FTDP-17 変異による 14-3-3 蛋白との結合への影響

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 により測定したところ、野生型タウ蛋白の解離定数は $3.25 \pm 0.44 \times 10^{-7}$ M であるのに対し、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程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。

FTDP-17 変異によるタウ蛋白分解過程への影響

FTDP-17 において報告された変異型タウおよび野生型タウを COS-7 細胞に強制発現させて、 $^{35}\text{S-Met}$ を用いたパルスチェイス法のもとで検討したところ、ラベルから 48 時間後において野生型タウと比較して FTDP-17 変異型タウの有意な分解遅延が認められた。そして分解遅延の原因を探索するため、タウ蛋白の細胞内局在の関係を細胞分画法によって検討したところ、タウ蛋白は細胞質内に局在しており、FTDP-17 変異によるタウ蛋白の局在の変化は特に認められなかった。

さらに、FTDP-17 変異型タウのリン酸化レベルについてリン酸化特異抗体を用いたウエスタンブロットにより検討をおこなったところ、V337M 変異型タウにおいて Thr231 のリン酸化が、R406W 変異型タウにおいて Ser396 および Ser409 のリン酸化が有意に亢進していた。

S214A 変異によるタウ蛋白分解過程への影響

S214A 変異型タウおよび野生型タウを COS-7 細胞に強制発現させて、 $^{35}\text{S-Met}$ を用いたパルスチェイス法(24 時間)のもとで検討したところ、タウ蛋白の残存率は 0 時間を 100%として、野生型タウでは 57.8%であるのに対し、S214A タウでは 25.8%と残存率は少なかった。そして分解速度の変化の原因を探索するため、タウ蛋白の細胞内局在の関係を細胞分画法によって検討したところ、タウ蛋白の局在の差は確認できなかった。

D. 考察

タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合への影響について、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。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た。

タウ蛋白の分解過程については、カルパイン、カテプシン、プロテアソーム、カスパーゼなどの蛋白分解酵素 (エンドプロテアーゼ) が *in vitro* でタウ蛋白を分解することが知られている。遺伝性認知症 FTDP-17 の原因遺伝子と考えられるタウ遺伝子の変異の影響をパルスチェイス法のもとで検討したが、ラベルから 48 時間後において野生型 タウ と比較して FTDP-17 変異型タウの有意な分解遅延が認められた。この分解遅延の原因を調べるために、プロテアーゼ耐性を惹起する可能性が知られているリン酸化に関して検討をおこなったところ、FTDP-17 変異型タウのリン酸化レベルに関しては、V337M 変異型タウにおいて Thr231 のリン酸化が、R406W 変異型タウにおいて Ser396 および Ser409 のリン酸化が有意に亢進していた。このことより、FTDP-17 変異型タウの分解遅延の原因としてこのリン酸化の亢進が示唆された。

タウ蛋白と 14-3-3 蛋白との結合に対して Ser214 部位のリン酸化が重要であることから、この部位のリン酸化がタウ蛋白の分解過程にどのように影響を与えているかを検討した。Ser214 部位を Ala に置換した変異タウを導入したところ、タウ蛋白の分解は野生型タウよりも S214A 変異タウの方が速いというものであった。この結果は、2つの可能性を示唆している。ひとつは、Ser214 がリン酸化されると 14-3-3 蛋白との結合親和性が亢進し、細胞内での強い結合が予測されることから、2つの蛋白が複合体を形成することでプロテアーゼに対する分解耐性が亢進するという可能性である。もうひとつは、リン酸化そのものが蛋白の分解耐性を亢進させる可能性である。どちらの可能性がより大きな意味を持つかは不明であるが、詳細をするためにはさらに *in vitro* の検討が必要であると考えられる。

E. 結論

タウ蛋白の 14-3-3 蛋白を介する重合過程および細胞内における分解過程について検討を行った。

14-3-3 蛋白と FTDP-17 変異タウ蛋白との関係では、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 変異タウ蛋白の細胞内分解過程については、分解速度は遅延していた。野生型タウ蛋白と変異型タウ蛋白はともに細胞質に局在し、変化はなかった。しかし、V337M 変異型タウにおいて Thr231 のリン酸化が、R406W 変異型タウにおいて Ser396 および Ser409 のリン酸化が有意に亢進していた。このことより、FTDP-17 変異型タウの分解遅延の原因としてこのリン酸化の亢進が示唆された。

Ser214 部位のリン酸化が不可能な S214A 変異タウ蛋白を導入して解析したところ、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。以上より、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・重合を促進する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sadik G, Tanaka T., Kato K, Yanagi K, Morihara T, Takeda M Phosphorylation of tau at Ser214 mediates its interaction with 14-3-3 protein: Implications for the mechanism of tau aggregation. J Neurochem 108:33-43,2009.
- 2) Sadik G, Tanaka T., Kato K, Yanagi K, Kudo T, Takeda M Differential interaction and aggregation of 3-repeat and 4-repeat tau isoforms with 14-3-3zeta protein. Biochem Biophys Res Commun 383(1):37-41,2009.
- 3) Yanagi K, Tanaka T, Kato K, Sadik G., Morihara T, Kudo T, Takeda M Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in proteolysis of tau protein in cultured cells, and attenuated proteolysis

- of FTDP-17 mutant tau. *Psychogeriatrics* 9:157-166, 2009.
- 4) Kazui H, Ishii R, Yoshida T, Ikezawa K, Takaya M, Tokunaga H, Tanaka T, Takeda M. Neuroimaging studies in patients with Charles Bonnet Syndrome. *Psychogeriatrics*. 9:77-84,2009.
 - 5) Tanimukai H, Kudo T, Tanaka T, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disease. *Psychogeriatrics*. 9:103-109, 2009.
 - 6) Itoh N, Okochi M, Tagami S, Nishitomi K, Nakayama T, Yanagida K, Fukumori A, Jiang J, Mori K, Hosono M, Kikuchi J, Nakano Y, Takinami Y, Dohi K, Nishigaki A, Takemoto H, Minagawa K, Katoh T, Willem M, Haass C, Morihara T, Tanaka T, Kudo T, Hasegawa H, Nishimura M, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M. Destruxin E Decreases Beta-Amyloid Generation by Reducing Colocalization of Beta-Amyloid-Cleaving Enzyme 1 and Beta-Amyloid Protein Precursor. *Neurodegener Dis*. 6:230-239. 2009.
 - 7) Tanaka T, Kazui H, Sadik G, Tanimukai H, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Kudo K, Takeda M. Prevention of psychiatric illness in the elderly I -Path to Prevention of Dementia- *Psychogeriatrics* 9:111-115, 2009.
 - 8) Yanagida K, Okochi M, Tagami S, Nakayama T, Kodama T, Nishitomi K, Jiang J, Mori K, Tatsumi S, Arai T, Ikeuchi T, Kasuga K, Tokuda T, Kondo M, Ikeda M, Deguchi K, Kazui H, Tanaka T, Morihara T, Hashimoto R, Kudo T, Steiner H, Haass C, Tsuchiya K, Akiyama H, Kuwano R, Takeda M. The 28-amino acid form of an APLP1-derived A β -like peptide is a surrogate marker for A β 42 production in the central nervous system. *EMBO Molecular Medicine*, 1:223-235, 2009.
 - 9) 田中稔久、武田雅俊 タウオパチーと前方型認知症 タウオパチーとは *Clinical Neuroscience* 27:258-261,2009
 - 10) 田中稔久、武田雅俊 薬の使い方シリーズ Quetiapine を使いこなす 第9回「高齢者への投与」 *臨床精神薬理学雑誌* 12:523-529,2009.
 - 11) 武田雅俊、田中稔久 アルツハイマー病のバイオマーカー 総論 *Cognition and Dementia* 8:263-269,2009.
 - 12) 田中稔久、武田雅俊 タウおよびリン酸化を含む修飾関連蛋白 *Cognition and Dementia* 8:276-282,2009.
 - 13) 田中稔久 特別企画—認知症研究への貢献と到達点 —故西村健先生を偲んで— タウの病理 *Cognition and Dementia* 8:349-353,2009.
 - 14) 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 AICD ϵ 51 and A β 42 by intramembrane proteolysis of β APP do not always change in parallel. *Psychogeriatrics*. 10(3):117-123, 2010.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 田中稔久、武田雅俊 「特集 認知症治療の今後を予測する 5. タウオパチーの治療の今後～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.

- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Kato K, Tanaka T, Sadik G, Baba M, Maruyama D, Yanagida K, Kodama T, Morihara T, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M. Protein kinase C stabilizes X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) through phosphorylation at Ser87 to suppress apoptotic cell death. *Psychogeriatrics* 11:90-97,2011.
- 22) Takeda M, Tanaka T, Okochi M. New drugs for Alzheimer's disease in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci.* (査読有) 65(5):399-404. 2011.
- 23) Kazui H, Yoshida T, Takaya M, Sugiyama H, Yamamoto D, Kito Y, Wada T, Nomura K, Yasuda Y, Yamamori H, Ohi K, Fukumoto M, Iike N, Iwase M, Morihara T, Tagami S, Shimosegawa E, Hatazawa J, Ikeda Y, Uchida E, Tanaka T, Kudo T, Hashimoto R, Takeda M. Different characteristics of cognitive impairment in elderly schizophrenia and Alzheimer's disease in the mild cognitive impairment stage. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra.* 1(1):20-30,2011.
- 24) 田中稔久、武田雅俊 主観的認知機能障害(SCI)から軽度認知機能障害(MCI)へ 老年精神医学雑誌 22;Supple1; 45-52,2011.
- 25) 田中稔久、武田雅俊 神経変性と TDP43、プログラニューリン、タウ *Cognition and Dementia* 10; 10-16,2011.
- 26) 田中稔久、武田雅俊 Rivastigmine の薬理作用 —Dual action への期待— *臨床精神薬理* 14:1137-1142,2011.
- 27) 田中稔久、武田雅俊 リバスタグミンの基礎と臨床 a. 基礎 *精神科* 19(3):252-258,2011.
- 28) 田中稔久、武田雅俊 特集：アルツハイマー病、開発中の治療薬—disease modifying therapy *最新医学* 66(9):2259-2276,2011.
- 29) 武田雅俊、ラモン・カカベロス、工藤喬、田中稔久、田上真次、大河内正康、森原剛史、橋本亮太 アポリポ蛋白 E と精神神経疾患 *精神神経学雑誌* 113:773-781,2011
2. 学会発表
- 1) 田中稔久 タウ蛋白とその他の生化学マーカー「ADの診断を中心に」、シンポジウム 認知症の診断 —この10年とこれから— アルツハイマー病研究会 第10回学術シンポジウム 2009,04,18 グランドプリンスホテル新高輪(東京)
- 2) Tanaka T, Sadik G, Kato K, Yanagi K, Takeda M 14-3-3 protein differentially interacts with 3-repeat and 4-repeat tau The 12th International Conference on Alzheimer Disease and related disorders Jul,11-16,2009, Vienna, Austria.
- 3) Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Sadik G, Takeda M Attenuated proteolysis of FTDP-17 mutant tau in cultured cells and involvement of increased phosphorylation of tau The 14th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Sept.1-5, 2009 Montreal, Canada.
- 4) 田中稔久、加藤希世子、馬場都、武田雅俊 生薬成分 berberine によるタウ蛋白リン酸化亢進の抑制 第16回日本未病システム学会学術総会 2009.10.31-11.1. (大阪府吹田市、千里ライフサイエンスセンター)
- 5) 田中稔久、柳健太郎、Golam Sadik, 加藤希世子、武田雅俊 培養細胞におけるタウ蛋白の分解における puromycin 感受性アミノペプチダーゼの関与 第28回日本認知症学会 2009.11.20-21. (宮城県仙台市)
- 6) 田中稔久、柳健太郎、Golam Sadik, 加藤希世子、馬場都、武田雅俊 FTDP-17 タウ変異によるタウ蛋白代謝過程の変化 日本老年医学会：

- 第20回近畿地方会 2009.12.1、新大阪チサンホテル (大阪)
- 7) 山本大介、杉山博通、上甲統子、野村慶子、和田民樹、高屋雅彦、木藤友実子、数井裕光、田中稔久、武田雅俊 失語症が急速に進行した認知症の一例 日本老年医学会：第20回近畿地方会 2009.12.1、新大阪チサンホテル (大阪)
- 8) 田中稔久 タウの病理—運動ニューロン疾患を呈する前頭側頭型認知症の分子病態 第19回神経科学の基礎と臨床 2009.12.19、千里ライフサイエンスセンター (大阪)
- 9) 田中稔久 アルツハイマー病の分子メカニズムと治療薬開発 熊本大学精神医学教室 2010.2.19、熊本大学 (熊本)
- 10) 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.
- 11) 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)
- 12) Tanaka T, Kato K, Yanagi K, Maruyama D, Takeda M Involvement of protein kinase C in neuronal cell apoptosis by phosphorylation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) at Ser87. The 10th World Congress of Biological Psychiatry. May 29 – June 2, 2011, Prague, Czech Republic.
- 13) Morihara T, Hayashi N, Yokokoji M, Akatsu H, Saito Y, Suzuki T, Takamura A, Katayama T, Ito N, Nishitomi K, Kimura N, Kazui H, Yanagida K, Kato K, Yatsumi S, Kodama T, 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: Splicing variant specific-effect of Kinesin Light Chain 1 (Klc1). Alzheimer's Association International Conference (AAIC2011) ,Parris, France, July 16-27, 2011.
- 14) Tanaka T, Sadik G, Yanagi K, Kato K, Takeda M Accumulation and aggregation of tau protein in tauopathies. The 3rd World Congress of Asian Psychiatry, Jul 31 – Aug 4, 2011, Melbourne, Australia.
- 15) Tanaka T, Yanagi K, Maruyama D, Takeda M Involvement of puromycin-sensitive aminopeptidase in metabolism of tau protein in cultured cells. The 15th Congress of the International Psychogeriatrics Association, Sept.6-9, 2011, Den Haag, Holland.
- 16) 田中稔久 神経化学カレッジ 「アルツハイマー病」 第54回日本神経化学学会大会 2011,09,25 山代温泉 (石川県)
- 17) 田中稔久 ランチョンセミナー 「タウの分子病態と神経変性」 第54回日本神経化学学会大会 2011,09,28 山代温泉 (石川県)
- 18) 林紀行、横小路美貴子、森原剛史、田上真次、大河内正康、田中稔久、工藤喬、武田雅俊 A beta 蓄積修飾遺伝子 KLC1 splicing variant の同定 (1) APP Tg マウスを用いた網羅的解析 第30回日本認知症学会 2011.11.11-13. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)
- 19) 横小路美貴子、森原剛史、林紀行、木村展之、赤津裕康、高村明孝、片山泰一、斎藤有紀、鈴木利治、加藤希世子、辰巳真一、柳田寛太、児玉高志、田中稔久、武田雅俊 背景遺伝子が異なる APP Tg マウスの網羅的解析により同定された A beta 蓄積修飾遺伝子 KLC1 splicing variant の同定 (2) ヒトの脳、末梢リンパ球での発現解析 第30回日本認知症学会 2011.11.11-13. タワーホール船堀 (東京都江戸川区)
- H. 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。

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
分担研究報告書

タウオパチーとしてのアルツハイマー病患者の精神行動評価について

分担研究者 数井裕光（大阪大学大学院医学系研究科精神医学）

研究要旨

大阪大学病院外来患者において、アルツハイマー病（AD）の臨床症状の評価項目を検討したところ、MMSE、ADASは治験の評価項目として使用しやすいことがわかった。ADの精神行動異常には神経原線維変化が関与することが示唆されていることから、タウをターゲットとした治療薬の効果は精神行動障害の観点から見ることも重要である。さらにタウをターゲットとした治療薬は疾患初期から投与されることが望ましいため、ADの前段階と考えられる軽度認知障害（MCI）の段階から投与開始となることもあり得る。そこでAD患者50例と、MCI患者16例を対象にNPIを用いて精神行動障害を評価したところ、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。この知見は、精神行動障害の評価尺度としてのNPIの有用性を示唆するものとも考えられた。

A. 研究目的

ADの神経原線維変化はタウオパチーであり、これをターゲットとした薬物開発には、如何なる臨床評価が適しているかを検討する必要がある。特に、ADの精神行動異常には神経原線維変化が関与しているとの報告もあり、如何に精神行動障害を評価するかが重要であると考えられる。

これらの点について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受診した患者を用いて検討した。

B. 研究方法

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。

（倫理面への配慮）

個人情報について厳重に管理し、データの解析は匿名化して行った。

C. 研究結果

1. ADの認知機能評価

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が有用であると考えられた。

2. ADの精神行動障害

対象となったADは50例であった。平均年齢は73.0±8.7歳、MMSEの合計点の平均は17.2±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。

3. MCIの精神行動障害

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

ADの病理学的変化は老人斑と神経原線維変化であるが、精神症状の発現には神経原線維変化との関係があることが指摘されている。Farberらは109名のAD患者のフォローアップと死後の剖検の検討の結果、精神症状を呈した患者の新皮質の神経原線維変化量は、精神症状がなかった患者の2.3倍であったと報告している。(Farber, N.B., et al., Arch Gen Psychiatry, 57: 1165-1173, 2000)。一方、Tekinらは31名のAD患者の生前NPIと剖検脳の分析の結果、興奮や異常行動といった症状が眼窩前頭皮質の神経原線維変化量と関連し、無為と前帯状回の神経原線維量と関連することを報告している。(Tekin, S., et al., Ann Neurol, 49: 355-361, 2001)このように、ADのタウオパチーである神経原線維変化と精神行動異常の相関が示唆されており、この点を踏まえた臨床評価が必要である。

今回の研究でMCIの段階でも多彩な精神行動障害を呈することが明らかになった。従って、タウをターゲットとした治療薬は疾患初期から投与されることが望ましく、それにはNPIのような精神行動障害の評価尺度が重要であることが示された。

E. 結論

タウをターゲットとした治療薬は疾患初期から投与されることが望ましく、それにはNPIのような精神行動障害の評価尺度が重要であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文・書籍発表

1. 武田雅俊、数井裕光、Ⅲ. 精神疾患における前頭葉の構造と機能 認知症 専門医のための精神科リュミエール 21 前頭葉でわかる精神疾患の臨床 92-100、

2010

2. 数井裕光、その他の認知症、新老年学第3版、1216-1225、2010

3. 木藤友実子、数井裕光、吉田哲彦、久保嘉彦、高屋雅彦、徳永博正、武田雅俊、経時的に詳細な言語機能評価をした運動ニューロン評価を伴う意味性認知症の1例、Cognition and Dementia 9:32-36, 2010

4. 和田民樹、数井裕光、武田雅俊、軽度認知症スクリーニングテストとしてのリバーミード行動記録検査、老年精神医学雑誌 21: 177-182、2010

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.

2. 学会発表

1. Nomura K, Kazui K, et al. Classification of delusions in Alzheimer's disease. International Psychogeriatric Association 15th International Congress, The Hague, The Netherlands, 6-9 September 2011.

2. Nomura K, Kazui K, et al. Classification of delusions in Alzheimer's disease and the neural correlate. Korean Association for Geriatric Psychiatry annual meeting 2011 exchange program with Japan, Seoul, 2011. 11. 18.

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。

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

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

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: 小胞体(ER)ストレスを負荷した神経細胞ではタウ蛋白量の上昇が観測される。しかし、ER ストレスは、タウの mRNA を上昇させず、タウの転写レベルには影響を及ぼさないことが示された。また、ER ストレスによるタウの翻訳への影響を調べるために、5'UTR の有無でタウ発現を比較したが、タウの上昇は観察されず、翻訳への影響もないことが示された。一方、タウをパルスチェイスでラベルしたところ、ER ストレス下でのタウの分解は遅延することが確認された。さらにタウ E3 ライゲースである CHIP は、ER ストレス下で減少することが観察され、タウのユビキチン化が低下し、プロテアソームでの分解が遅延する可能性が示唆された。これらのことより、ER ストレスを是正することで、神経細胞内のタウの凝集を抑制する可能性が考えられる。

キーワード: タウ、ER ストレス、CHIP、プロテアソーム、ユビキチン

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。AD の神経細胞に観察されるタウの凝集はその産生と分解のバランスの破綻とも考えられる。本研究では、神経変性過程に広く関与するとされる ER ストレスのタウの産生および分解への関与について検討し、ER ストレスを介したタウ凝集阻害法について考察する。

B. 研究方法

SH-SY5Y 細胞に、グルコース除去、tunicamycin、thapsigargin、あるいは DTT で、ER ストレスを付加する。一定の時間後に、細胞を回収してウエスタンブロット法にてタウ蛋白およびリン酸化 eIF2 α (ER ストレスのモニター) の動向を解析した。

ER ストレスがタウの転写に及ぼす影

響を検討する目的で、ER ストレス下でのタウ mRNA の推移を RT-PCR で検討した。

また、ER ストレスがタウ翻訳に及ぼす影響を検討する目的で、タウのコーディング領域に 5'UTR を持つコンストラクトと持たないコンストラクトを構築し、HEK293 に導入してイーあるストレスをかけ、タウの動向について検討した。

タウの分解を検討する目的で、パルスチェイスにてタウをラベルして、ER ストレス下における分解について検討した。また、タウのユビキチン化 E3 ライゲースである CHIP について、ER ストレス下での動向を検討した。

C. 研究結果

グルコース除去、tunicamycin、thapsigargin、あるいは DTT のいずれの ER ストレス負荷によっても、タウ蛋白が上昇することが観察された。

しかし、ER ストレス下でのタウの mRNA の変化は全く観察されず、タウの転写過程は影響を受けないことが示唆された。また、タウのコーディング領域と 5'UTR を持つコンストラクトが導入された細胞と、5'UTR が無い細胞のタウ蛋白を比較すると、24-48 時間のグルコース除去による ER ストレスではタウ蛋白量の差は認められなかった。これは、グルコース除去による ER ストレスでは、タウの翻訳に影響を及ぼさないことを示している。

パルスチェイスでラベルしたタウの分解は、ER ストレス負荷で遅延することが観察され、タウの分解が ER ストレスにより抑制されることが示唆された。さらに、ER ストレス下で抗タウ抗体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、タウのコヒ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。

D. 考察

アミロイドカスケード仮説は AD の病態仮説として広く受け入れられてきた。これを基盤とした Disease-Modifying Therapy として、アミロイドワクチンや γ セクレターゼ阻害薬などの開発が現在精力的に行われている。しかし残念なことに、これらの多くの臨床試験結果は芳しいものではない。従って、アミロイド仮説に替わる病態仮説を基盤とした AD の治療法開発が模索されるようになってきている。

AD 脳では神経原線維変化が観察され

るように、タウ特にリン酸化タウが神経細胞内に凝集するという tauopathy の側面を持つ。近年、タウのノックアウトマウスではアミロイドが沈着しても神経細胞障害が起きない事が示され (Roberson, et al. Science, 2007)、tauopathy すなわちタウの凝集が治療ターゲットとして注目されるようになってきている。Tauopathy を呈する変性疾患は AD ばかりではなく、ピック病や進行性核上麻痺など多岐に及ぶが、ほとんどのケースが孤発性であり、タウ凝集のメカニズムについては不明である。

一方、AD をはじめとする変性性の認知症の病態過程に ER ストレスが関与しているという知見が、我々の検討 (Katayama, -,Kudo, et al. Nature Cell Biology, 1999) (Katayama, -, Kudo, et al. J Biol Chem 2001) (Yasuda, Kudo, et al. Biochem Biophys Res Commun 2002) が端緒となり積み重ねられてきている。Tauopathy と ER ストレスに関しては、Hoozemans らのグループが、リン酸化タウの凝集に先立ち ER ストレスが生じていることを AD ばかりではなくピック病などの病理標本を用いて示唆している (Hoozemans, et al. Am J Pathol 2009) (Nijholt, et al. J Pathol 2012)。

本研究は ER ストレスが tauopathy をもたらすメカニズムについて検討を行った。グルコース除去、tunicamycin、thapsigargin、DTT で ER ストレスを神経細胞にかけると全てでタウ蛋白の上昇が観察された。

転写レベルでの検討として、タウの mRNA を検討したが、ER ストレスによ

る変化は認められなかった。

ER ストレス下では、ストレス反応として大部分の蛋白の翻訳が抑制されるが、ATF4 などの一部の蛋白はそれらの 5'UTR の特殊な構造により逆に翻訳が上昇するものもある (Harding, et.al., Mol. Cell, 2000)。そこで、タウの 5'UTR の有無により ER ストレス下でのタウ発現について比較検討した。24 時間あるいは 48 時間のグルコース除去による影響では、5'UTR の有無によるタウ蛋白発現の差は認められなかった。このことより、ER ストレス下に見られるタウ蛋白の上昇は翻訳の影響ではないことが示唆された。

タウをユビキチン化する E3 ライゲースとして GHIP が報告されている (Petrucci, et al Hum Mol Gen 2004)。そこで、ER ストレス下における CHIP 変化について検討したところ、実際にタウに結合している CHIP が減少していた。すなわち、ER ストレスにより CHIP が減少し、タウのユビキチン化およびプロテアソームでの分解が遅延してタウ蛋白の上昇に繋がったと考えられた。

以上より、ER ストレスは主にタウの分解過程に変化をもたらし、タウ蛋白の上昇を引き起こすと考えられ、ER ストレスに対する治療は tauopathy の治療になり得る事が示された。

E. 結論

ER ストレスによりタウに結合する CHIP は減少し、ユビキチン化およびプロテアソームにおける分解の遅延によりタウ蛋白が上昇する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inokuchi Y., Nakajima Y., Shimazawa M., Kurita T., Kubo M., Saito A., Sajiki H., Kudo T., Aihara M., Imaizumi K., Araie M., and Hara H., Effect of an Inducer of BiP, a Molecular Chaperone, on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Retinal Cell Death, Invest.Ophthalmol.Vis.Sci. 2009; 50: 334-344.
2. Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Yasuda T, Hara H Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice Neurosci Lett. 2010; 484: 43-46.
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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Inokuchi Y., Nakajima Y., Shimazawa M., Kurita T., Kubo M., Saito A., Sajiki H., Kudo T., Aihara M., Imaizumi K., Araie M., and Hara H.	Effect of an Inducer of BiP, a Molecular Chaperone, on Endoplasmic Reticulum (ER) Stress-Induced Retinal Cell Death	Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.	50	334-344	2009
Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, <u>Kudo T</u> , Imaizumi K, Yasuda T, Hara H	Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice	Neurosci Lett.	484	43-46	2010
Mitsuda T, Omi T, Tanimukai H, Sakagami Y, Tagami S, Okochi M, <u>Kudo T</u> , Takeda M	Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2 α /ATF4 pathway and execute protective function in ER stress.	Biochem Biophys Res Commun.	415(3)	519-525	2011
Hino S-I, Kondo S, Yoshinaga K, Saito A, Murakami T, Kanemoto S, Sekiya H, Chihara K, Aikawa Y, Hara H, <u>Kudo T</u> , Sekimoto T, Funamoto T, Chosa E, Imaizumi K.	Regulation of ER molecular chaperone prevents bone loss in a murine model for osteoporosis.	J Bone Miner Metab	28	131-138	2010
Ishisaka M, <u>Kudo T</u> , Shimazawa M, Kakefuda K, Oyagi A, Hyakkoku K, Tsuruma K, Hara H,	Restraint-Induced Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Genes in the Mouse Brain.	Pharmacology & Pharmacy	2(1)	10-16	2011
Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, <u>Hasegawa M</u> .	Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-DU are recapitulated in SH-SY5Y cells.	FEBS Lett	583	394-400	2009

Arai T Mackenzie IR, <u>Hasegawa M</u> , Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H,	Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies	Acta Neuropathol	120	55-66	2010
Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y.	Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease.	Acta Neuropathol	117	151-158	2009
Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, <u>Hasegawa M</u> .	Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43.	Biochem Biophys Res Commun	382	405-9	2009
Nonaka T, <u>Hasegawa M</u> .	A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. Biochemistry	Biochemistry	48	8014-22	2009
Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, <u>Hasegawa M</u> .	Methylene blue and dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models.	FEBS Lett	583	2419-24	2009
Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, <u>Hasegawa M</u>	Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43.	Hum Mol Genet	18	3353-3364	2009
Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, <u>Hasegawa M</u> . Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM	TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing.	Acta Neuropathol	118	359-69	2009
Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, <u>Hasegawa M</u> .	Conversion of wild-type alpha -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant.	J Biol Chem	284	7940-7950	2010

Masuda M, <u>Hasegawa M</u> , Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M.	Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies.	FEBS Lett	583	787-791	2010
Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, <u>Hasegawa M</u> .	Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases.	J Biol Chem.	285	34885-98	2010
Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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
Yokota O, Davidson Y, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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
Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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
Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, <u>Hasegawa M</u> , 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	2012
Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, <u>Hasegawa M</u> .	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	2012

Arai T, <u>Hasegawa M</u> , Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaya M, Fujishiro H, Akiyama H	Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy.	Neuropathol	30	170-181	2011
Tsuji H, Nonaka T, Yamashita M, Masuda-Suzukake M, Kametani F, Akiyama H, Mann DM, Tamaoka A, <u>Hasegawa M</u> .	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	2012
Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, <u>Hasegawa M</u> , Taylor M, Mann D, Allsop D.	Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease.	FASEB J	25	4127-37	2011
Foulds P.G. Foulds O., Yokota O, A. Thurston A, Y. Davidson Y, Ahmed Z., J. Holton, J.C. Thompson Holton , Akiyama H, Arai T , <u>M. Hasegawa</u> , Gerhard A, Allsop D, Mann D.M.A.	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.	2011
<u>Hasegawa M</u> , Nonaka T, Tsuji H, Tamaoka A, Yamashita M, Kametani F, Yoshida M, Arai T, Akiyama H.	Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies.	J Mol Neurosci	45	480-485	2011
Nonaka T and <u>Hasegawa M</u>	In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases.	Commun & Integ Biol	4	501-502	2012

Meyerowitz Parker S, Vella L, Ng D, Price K, Liddell J, Caragounis A, Li Q, Masters C, Nonaka T, Masato Hasegawa, et al	C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress.	Mol Neurodegener	6	57	2012
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.	287 (18):14	631-43.	2012
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.	11(1)	51-62.	2011
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.	74(1)	51-7	2011
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.	27(2)	271-80.	2011
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.	31 (21)	7840-7.	2011
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.	42(3)	404-14.	2011

<p><u>Kazui H</u>, Yoshida T, Takaya M, Sugiyama H, Yamamoto D, Kito Y, Wada T, Nomura K, et al</p>	<p>Different characteristics of cognitive impairment in elderly schizophrenia and Alzheimer's disease in the mild cognitive impairment stage.</p>	<p>Dement Geriatr Cogn Disord Extra</p>	<p>1(1)</p>	<p>20-30</p>	<p>2011</p>
---	---	---	-------------	--------------	-------------