

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

「孤発性タウオパチー形成の機序解明とモデル動物の開発」（26-27）

主任研究者 木村 哲也 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

「孤発性タウオパチー形成の機序解明」では、野生型マウスにおいてもシナプス抑圧刺激を与えることで、加齢依存的にタウオリゴマーの形成がなされることを発見し、さらにこのオリゴマー形成およびその代謝はオートファジーの形成およびその成熟過程と強い関連があることを見出した。さらに、高齢脳シナプスを調べることで、シナプスの長期抑圧に必要なAMPA受容体の代謝過程は若齢期ではプロテオソーム経路に依存しているが、加齢するとオートファジー経路に依存するようになることも発見し、高齢脳の神経細胞ではAMPA受容体の細胞内過程とタウオリゴマー形成/代謝過程が密接に関わっていることを世界に先駆けて確認し、シナプス制御系とタウとの直接的関係のを明らかにした。今後、研究を進めることで、高齢脳におけるタウ凝集体形成とシナプス障害との関係を解明できるものと期待される。

さらに「汎用化合物スクリーニング系の開発」では上述したシナプス抑圧によるタウオリゴマー形成現象の可視化を目指したシステム構成を行った。まず、使用する神経系標本として海馬組織培養系を立ち上げ、培養ネットワークにおけるAMPA受容体のトラフィックを解析するためのイメージング手法を開発した。さらに、本実験系を用いて、シナプスの抑圧刺激の1つであるNMDA作用機序を調べることで、タウ欠損はGluR2を含むAMPA受容体の細胞内分布を就職し、そのNMDA応答を減弱していること、GluR2を含まないAMPA受容体のトラフィックには大きな影響をあたえないことが新たに示された、このことは、タウの生理機能の解明という意味でも興味深い。本研究で目指すスクリーニング系の基盤として組織培養海馬ネットワークが十分機能することが確認できたことも大きな成果と考えられる。

「孤発性タウオパチー形成現象におけるリン酸化タウの役割の解明」ではアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いたタウの強制発現システムの構築と最適化に成功した。また、「高齢動物の脳活動の特徴の解明と特徴形成へのタウの寄与解明」では、加齢した海馬神経の受容野を情報論的に解析することで、高齢海馬神経ではスパイクあたりの情報量が大幅に減衰するものの、神経活動の増大させることで時間あたりの平均情報量を若齢時レベルに維持していることが明らかになった。すなわち、スパイクタイミングによる情報コードからスパイク頻度による情報コードへの切り替えが行われていることが示唆された。これは入力情報の劣化を補う補償的变化と考えられ、背景には加齢依存的なシナプス特性の積極的な変更が予想された。

主任研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 室長
分担研究者
吉田 裕宏 国立長寿医療研究センター 室長 (平成26年度のみ)
古舘 宏之 独立大学法人埼玉大学 助教

研究期間 平成26年4月1日～平成27年3月31日

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の多くは孤発性であり、その病理形成機序は不明のままと言える。認知障害と深い関わりがあるとされるタウ病理形成の生理的機序の解明は認知症の予防と治療に重要な意味をもつ。これまでに、我々はタウの生理機能を解明し、孤発性タウオパチーの発生機序の糸口を見いだそうと努力してきた。その結果、タウが神経可塑性の1つ NMDA誘導型シナプスの長期抑圧(LTD)の形成に必須なタンパクであることを見出した(Kimura et al.2013, Philo. Trans. B)。この研究によって長期抑圧を誘導することでタウの積極的なリン酸化が起こることも報告し、リン酸化タウの形成する生理機構の1つと考えられた。

さらに、昨年度、LTDを誘導する低頻度頻回電気刺激を海馬に与えることで、海馬神経細胞にリン酸化タウが形成されるだけでなく、サルコシルに不溶化したタウの形成も誘導されることを、生化学的、免疫組織化学的手法によって発見した。

本研究では、LTD刺激により誘導され生理状況におけるタウ重合体形成の生理学的背景やリン酸化修飾などの関与を実験的に検証することで、ADにおける病的タウ凝集体形成メカニズムを明らかにし、新たな創薬研究の方向性を提案する。一方で、得られた知見に基づいた創薬をサポートする化合物スクリーニングシステムの開発を並行して行いつつ、マウス脳ネットワークの加齢変化の特徴をシステムレベルで解析し、新たな加齢脳の提案に挑戦する。

B. 研究方法

「孤発性タウオパチー形成の機序解明と、これを応用した汎用化合物スクリーニング系の開発」

【実験動物】

実験動物として基本的にはC57BL/6マウスを用いた。高齢C57BL/6マウス(20ヶ月齢-25ヶ月齢)は主に国立長寿医療研究センター実験動物管理棟のエージングファームより供給された。また、用いたタウ欠損マウスはC57BL/6マウスをバックグラウンドとし、同じ実験動物管理棟で飼育したものをを用いた。

【刺激誘導性タウオリゴマーの検出】

○ In-vivo 標本におけるLTD誘導刺激：様々な月齢のマウスを用いた。マウスは3%イソフラレン～空気混合ガスにより急性麻酔を施し、脳固定装置に定位した。その後、1-1.5%イソフラレン～空気混合ガスにより、麻酔状態を長期的に維持した。マウス

が十分に深い催眠状態になったことを確認した後、頭皮を切開することで頭骨を露出しBregma -1.7mm, lateral 1.7mmの位置にドリルで穴を開け脳を露出し、3本の電極よりなる組電極(0.5k ohmタングステン電極を多くの場合用いたがと先端を金メッキしたエナメル電極を用いた場合もあった)。電気刺激はパルスジェネレータMaster8により駆動しアイソレータを介して、3本の電極の内2本を用いて行った。同時に刺激電極より約200 μ mの位置に配置した電位記録用電極より局所場電位を記録し、ADコンバータ(Digidata 1310)を介してコンピュータ上に保存した。また、電極の深度は、多くの場合、脳表より1.4mm程度であったが、記録された電位波形を元に微調整を行い、海馬CA1部位のStriatum Radiatum(CA3シャップアー分枝の投射部位)に確実に挿入した。電極挿入後、すぐにテスト刺激(刺激頻度0.033Hz、パルス幅100 μ m)を開始した。刺激強度は最大のシナプス後場電位(fEPSP)の40%のfEPSPが得られるように調整した。LTDの誘導は1Hzの繰り返し刺激(程頻度頻回刺激、LFS)を1800回与えることで行った。また、シャムコントロールではLFSを与える以外の全ての手続きを行った。なお、これらの作業中は腸内体温は36.5度に保持された。

- 薬剤投与：必要に応じて刺激と同側の側脳室に挿入したマイクロカニューラ(太さ38gage)により各種阻害剤を投与した。溶剤の押出はシリンジポンプを用い0.5 μ l/minの流速で行った。
- 海馬標本の摘出：LFSを提示後、動物は麻酔をしたまま一定時間保持された。所定の時間が経過した後、挿入した電極を脱着し、麻酔状態のまま頸椎脱臼、断頭、脳摘出を速やかに行った。全ての脳摘出作業は氷温のグルタミン酸受容体阻害剤(0.013%キヌレン酸)を含んだ人工脳脊髄液(aCSF)中で行い、解剖時に神経に与えるダメージを最小化した。脳摘出後左右の海馬を個別に摘出しドライアイスで冷却したアルミブロック上で急速冷却し、サンプルチューブに移し、-80度で保存した。
- 生化学解析用サンプリング：凍結保存した海馬標本は室重量の20倍の容量のバッファー中(Hepes mM, ---, PH7.4, 4 $^{\circ}$ C)中でホモジナイズされ、1kG遠心後、上澄み(S1)を得た。S1の半量溶液に20%サルコシルを適宜加え1%サルコシル溶液とし室温で2時間振盪したのち、500kGにて遠心分離することでサルコシル不溶性ペレットを得た。一方残りのS1を11kGにて遠心分離することで、シナプスを豊富に含む膜分画(P2)と細胞質分画(S2)を得た。それぞれの分画はウェスタンブロット法を用いて解析した。
- 免疫沈降：必要に応じて、各分画中のタウオリゴマーの生成をタウオリゴマー抗体(anti-tau(T22), Millipore)を用いた免疫沈降法によって行った。方法はThermo direct IP kitに指定された方法に準拠した。本手法では抗体はビーズに共有結合するため、溶出液には抗体は溶出しないが、さらに、溶出液をproteinG結合ビーズにより洗浄することでIgGフリーとした。

【急性スライス海馬標本の作成とfEPSP計測】

- 急性スライス標本作成：動物をイソフラレン雰囲気中で麻酔、断頭後、氷温aCSF(気中にリン酸を含む)中で脳標本を摘出した。摘出した脳は、約2分氷温aCSFに放置され、その後ピブラトーム(Lica VT1200S)に固定、350 μ mの厚さに裁断された。裁断後海馬と周辺皮質を取り除き、通常のaCSFでよく洗い、8 μ mポアサイズのメンブレンに載せた。標本はメンブレン上でaCSFの気水面に保たれ、95%酸素5%二酸化炭素混合ガス中にさらされた。

- 急性スライス標本におけるfEPSP計測：メンブレン上で数時間室温にてリカバリーし後に、神経活動計測用のチャンバー（水温32度）に移し、aCSF還流条件（流速10ml/min）で各種計測を行った。刺激電極は双極のタングステン電極を用い、記録にはaCSFを重点したガラスピペットを用い、in-vivo標本と同様にfEPSPを記録し、LFS刺激を行った。

【長期器官培養海馬標本の作成と各種計測】

- 長期器官培養海馬標本の作成：生後5-7日の動物を断頭後、氷温aCSF(キヌレン酸を含む)中で脳標本を摘出した。摘出した海馬標本は氷温aCSFで冷却し、その後チョッパーを用いて、400 μ mの厚さに裁断した。裁断後海馬スライスを通常のaCSFでよく洗い、0.4 μ mポアサイズのメンブレンに載せた。標本はメンブレン上で培養液(MEM:ERSS:正常馬血清=2:2:1)の気水面に保もち、95%酸素5%二酸化炭素混合ガス中で保持した。
- 長期器官培養海馬標本におけるfEPSP計測：3週間程度培養し安定した海馬器官培養標本を用いて各種計測を行った。fEPSP計測は、メンブレンと共に標本を神経活動計測用の64チャンネルの電極を底面に持つ多電極チャンバー(MEMsystems)に移動することで行った。標本を電極面に接着するように配置し、最も効率よくfEPSPを誘導できる電極を検索して、以降これを刺激電極として用い、最も大きなfEPSPを発生した電極を記録電極として用いた。aCSF還流条件(流速1ml/min)で各種計測を行い、水温は34度であった。
- 長期器官培養海馬標本における樹状突起形状と樹状突起内GluR動態の計測：器官培養海馬標本において、様々な状態でのAMPA受容体の分布を調べるために、NMDA刺激前後の色々なタイミングで4%パラホルムアルデヒドにて組織固定を行い、幾つかの神経を蛍光色素(ルシファーイエローなど)を細胞内注入することで可視化した。さらにAMPA受容体の分布を免疫蛍光法により可視化した。蛍光分布の獲得はZeiss製共焦点顕微鏡(共同利用推進室所有)を用いて行い、撮像はxyz軸ともに100nmピッチで行った。得られた画像データは、Matlab上で展開され、細胞内注入した蛍光色素のシグナルを手がかりに樹状突起空間を定め、定めた樹状突起空間中のGluR蛍光の強度と分布を得た。
- 樹状突起空間決定方法：組織固定後に細胞内に注入された蛍光色素を手がかりに樹状突起内の空間を切り分けるためのソフトを独自開発した。自作ソフトは指定した樹状突起の長軸に直行した断面(60 μ m四方)を定義し、断面中での突起部分を前の断面との連続性と定義した断面ごとの輝度分布を手がかりに定められた閾値によって定められる高輝度領域として定義された。細胞内注入法は注入部位からの距離で染色性が変化するが本方法では動的に閾値が設定されるため、長い距離で安定な樹状突起検出を行うことが可能となっている。また、顕微鏡の空間分解能の論理的限界を考慮し、突起内部空間としては実際に定められた空間のエッジより重心方向に約0.2 μ m縮小した空間を用いた。

「孤発性タウオパチー形成現象におけるリン酸化タウの役割の解明」

培養細胞を用いたAAVを用いたリン酸化タウ過剰発現系の開発を行った。詳しい内容は分担研究枠に示した。

「高齢動物の脳活動の特徴の解明と特徴形成へのタウの寄与解明」

埋め込み電極法を用いて、特定環境におけるマウスの神経の場所受容野を解析した。本年度は、システムの立ち上げと解析ソフトの開発を行い、さらに野生型動物よりのスパイク信号の記録と解析を行った。タウノックアウトの記録も一部行った。詳しい方法は分担研究枠に記載した。

(倫理面への配慮)

DNA組換え動物の使用に関する事項について：本研究で使用するタウノックアウトマウスは国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験倫理委員会の承認のもとに、逃亡拡散を防ぐためP1A飼育室で厳重な管理のもとに飼育する。新たな形質転換体を入手する場合は、法的な手続きおよびセンター規定を遵守する。

遺伝子導入実験について：本研究で使用するAAVDNA作製とマウスへの導入は、国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験倫理委員会の承認のもとに、法的な手続きおよびセンター規定を遵守して行う。

C. 研究結果

1. 「孤発性タウオリゴマー形成の機序解明と、これを応用した汎用化合物スクリーニング系の開発」

【シナプスの長期抑圧形成 (LTD) にともなうタウオリゴマー形成】

最近、神経細胞にシナプスの長期増強を誘導する刺激を与えると、タウのリン酸化が起こることが報告され、タウそのものがLTDの形成に必要なタンパクであることが示された(例えばKimura et al 2013, Philo. Trans. B)。本研究ではLFS形成とともにタウオリゴマー形成が成される可能性を検討した。

標本は麻酔した加齢した野生型マウス(20-24ヶ月齢)を用い、海馬に低頻度頻回刺激(LFS)を与え、刺激終了直後、30分後、60分後に刺激した海馬と反対側の海馬を採取し、サルコシル不溶ペレット中のタウ量を調べたところ、サルコシルに不溶化したタウが刺激側の海馬で顕著に増大していることが判った(図1a)。このような刺激部位依存的なサルコシル不溶タウの増大は、LFSを行わない以外は同様な処置を施したシャムコントロールでは起きなかったため、LFSにより誘導された現象であることが示された(図1b、図は刺激された同側と反対側海馬との量比で示してあり、シャムコントロールはほぼ1)。さらに、得られたペレット中のタウ抗体陽性物の形態を電子顕微鏡で調べたところ、ペレット中には繊維状の構造体はなく、いくつかのタウ抗体のクラスターが散在しており(図1c)、タウオリゴマーが形成されていたものと考えられた。さらに刺激した組織の免疫電子顕微鏡像においても同様なタウクラスターが樹状突起中で観察され(図1d)、樹状突起内でタウオリゴマーが形成されていることが明らかになった。さらに、繊維状タウ凝集体に選択性が低くタウオリゴマーに選択性の高いとされるタウ抗体(T22)を用いた免疫沈降実験をP2フラクションで行い、T22により認識されるタウオリゴマーも刺激に依存して増量していることも確認した(図1e)。次に、若齢の動物で同様の実験を行い、LFSによるサルコシル不溶性タウオリゴマーの形成効果は加齢

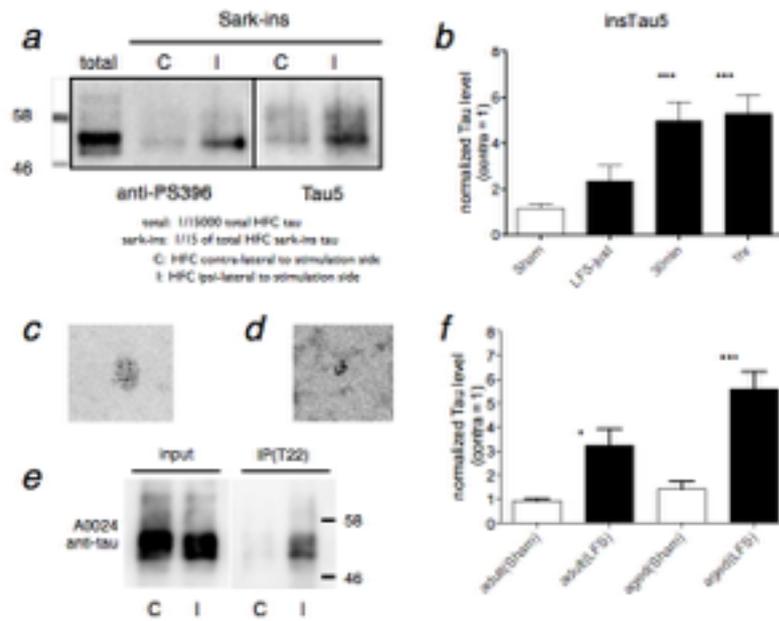


図1. 詳しい内容は本文参照。

に従って増強することが明らかになった(図1f)。

【LTD形成機序の加齢変化】

次に、LFS誘導型LTDそのものの加齢依存性を調べた。ラットで報告されているNMDA受容体依存LTD、すなわちLFSで誘導されるLTDの加齢依存的減衰はスライス標本in-vivo標本共にマウスでは観察されなかった(図2PTX参照)。また、若齢期のマウスで報告されているLTDにおけるプロテオソーム阻害剤(MG132)感受性は、若齢期では確認された

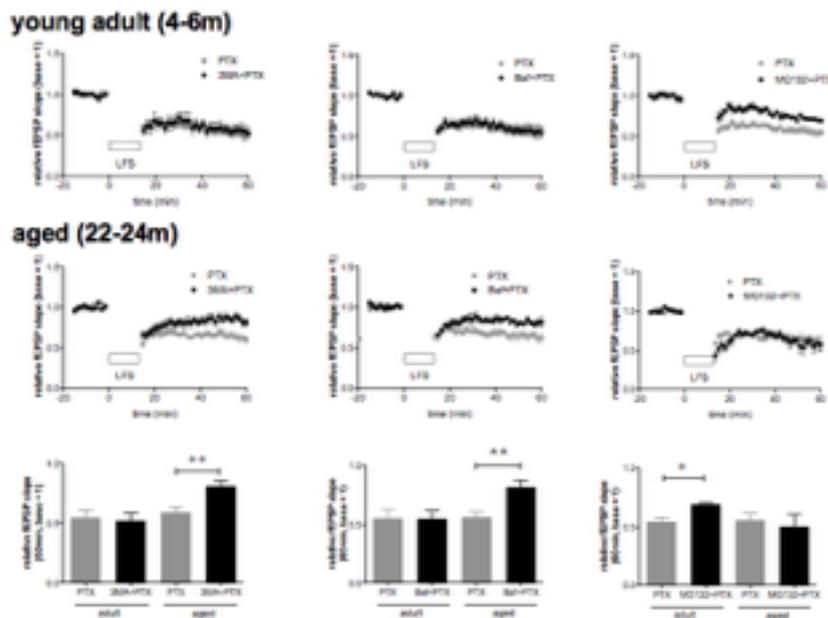


図2. LFSにより誘導されるLTDにおける各種代謝阻害剤の効果。若齢期(上段)ではプロテオソーム阻害剤(MG-132)のみがLTDを障害する。老年期(中段)では2つのオートファジー阻害剤(3-MA, Bafirolicine)はLTDを障害するが、Mg-132の効果はなくなる。下段は60分での相対シナプス電位の違いを比較したグラフ。

が（図2右列上、MG132）加齢依存的に失われることが明らかになった（図2右列下、MG132）。一方で、もう1つの重要なタンパク質分解系であるオートファジーを3-MAおよびバフィロマイシンを用いて抑制したところ、両者ともに、若齢期では顕著な影響を示さなかったが、高齢期において強いLTDの抑制を誘導することが判った（図2左列下および中列下）。これらのことよりLTDにおけるAMPA型グルタミン酸受容体（AMPA受容体）の代謝経路は加齢と共にプロテオソーム経路からオートファジー経路に移行していることが明らかになった。

【LFS誘導型タウオリゴマー形成のオートファジー依存性】

LTDに付随するAMPA受容体代謝経路の加齢依存的変化と同様にLTDに付随するタウオリゴマー形成現象との関係を調べる目的で、オートファジー抑制効果を調べた。実験には比較的毒性が低い3-MAを用い、これを脳室内に投与したところ、既に報告されているようなリン酸化タウの蓄積がP2分画で観察され、それは刺激依存的であった。さらに、サルコシル不溶性タウを調べたところ、驚くべきことに、LFS誘導性のタウオリゴマーの形成が阻害されていたことが明らかになった。これらのことからオートファジーはリン酸化タウ量を調節する機能を持ち、これを実行する過程でタウがオリゴマー化していると予想された。

また、LFSに伴って刺激側のLC3 typeII/typeI比が反対側のそれと比べて有意に高い傾向を示し、LFSはオートファジー経路を活性化する刺激であることも確かめられた。これまでのところ、LC3の活性化に関しては加齢依存性は認められていない。

【海馬器官培養系を用いたAMPA受容体の動態解析】

これまで紹介した研究と並行して器官培養海馬を用いた研究プラットフォームの開発を開始した。将来的には、先に示した研究で得られるタウオリゴマー形成の為の生理条件を標本上に実現し、イメージング手法によるタウオリゴマー形成現象をターゲットと

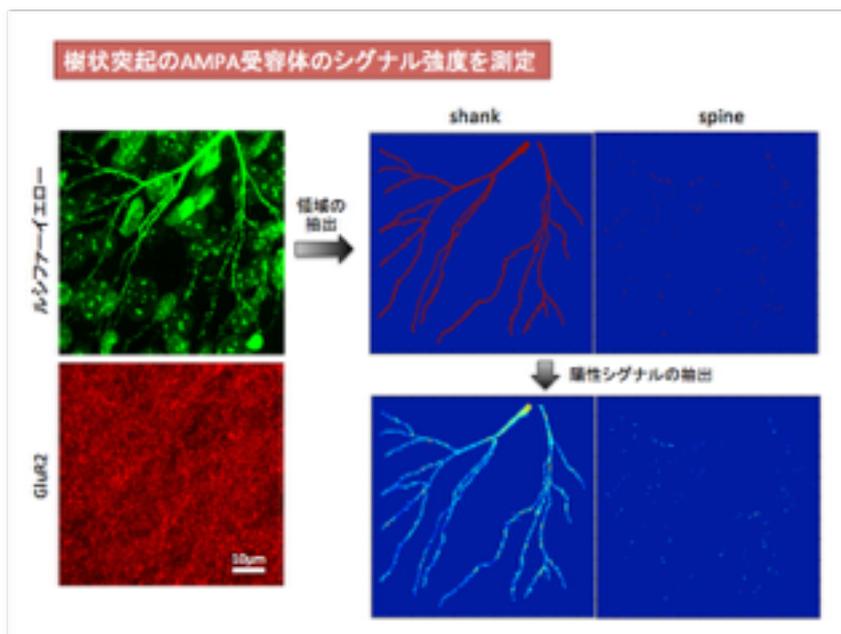


図3. 作成した樹状突起切り出しソフトの動作を示すパネル。詳しくは本文と方法参照

した創薬スクリーニングシステムの開発につなげていく予定である。

これまでに電気生理的手法によって、NMDA刺激によるLTD誘導可能な標本であることを確認し、スパイン形状や各種受容体発現量の生化学的解析を行うことで実験に適切な培養期間（4週から8週）を定めた。さらに、上述したようにタウあるいはタウオリゴマーはAMPA受容体の代謝系に影響をあたえている可能性があり、直接細胞内のAMPA受容体の分布を調べる為のイメージング手法の開発を行った（手法の詳細は方法を参照）。作成したソフトウェアは染色した神経の樹状突起を有効に切り出し、並行して免疫染色した受容体の突起内分布を明らかにした（図3参照）。

本手法を用いてLTD誘導時のAMPA受容体の動態を解析する為に、代表的な2つのサブユニット（GluR1, GluR2）の分布をNMDA刺激後20分および60分に固定した標本を用いて調べた。その結果、野生型より作成した培養標本では、LTD形成直後は突起内GluR1, 2シグナルとも増大するが、その後、GluR1シグナルは刺激前のレベルにもどり、GluR2シグナルは高いレベルで維持されることが判った。

次に、タウノックアウトマウスより作成した培養標本で同様な検討を行った。タウノックアウト標本ではGluR1シグナルに関しては野生型と酷似した変化を示したが、GluR2シグナルにおいては野生型で観察されたシグナルの増大は観察されなかった。タウはNMDAで活性化される全ての反応経路ではなくGluR2のトラフィックに限定に作用していることを示す。さらに興味深いことに、刺激前のシグナルレベルはGluR1においては野生型とノックアウトで大きな違いは無かったが、GluR2では有意な違いが検出された。これらのことから、タウはLTD反応経路に限定することなく、細胞内のGluR2含有AMPA受容体の分布や量の制御に帰依する機能タンパクであることが明らかになった。これらの結果は、新たなタウの生理機能を明らかにしただけでなく、海馬器官培養系のタウ研究プラットフォームとしての有効性を示している。

2. 「孤発性タウオパチー形成現象におけるリン酸化タウの役割の解明」

リン酸化部位変異タウの過剰発現系を個体脳や器官培養ネットワークで発現し、リン酸化の病態生理学的意義とタウオリゴマー形成への寄与を明らかにすることを最終目標として、本年度はタウを発現するAAVベクターの作成と最適化を行った。詳しい内容は分担研究枠に記述した。

3. 「高齢動物の脳活動の特徴の解明と特徴形成へのタウの寄与解明」

自由行動下での高齢マウスの海馬神経活動を計測することで加齢いた脳活動の情報理論的特徴を明らかにし、さらにタウノックアウトのそれと比較することで脳の加齢におけるタウまたはタウオリゴマーの寄与を明らかにすることを目的とする。

本年度はベースとなる加齢野生型マウスの海馬神経活動の特徴をシャノンの情報理論に基づいて解析した。若齢期海馬CA1より計測された場所受容野を持つ神経活動の多くは「スパイクあたりの情報量」(bit/spike)が高いスパイクタイミングコーディングを採用した神経活動であった。一方で、高齢海馬では、スパイクタイミングコーディングを採用した神経活動は殆ど記録されず、「時間あたりの情報量」(spike/sec)が高いスパイク頻度コーディングを採用したスパイク活動により環境情報を表現していると考えられた。これらのことより、加齢によって、海馬における情報のコーディング方法

が変化していることが明らかになった。

D. 考察と結論

本研究によってタウのオリゴマー形成が単純なタウ～タウ相互作用だけによる受動的過程によるものでなく、脳神経系の老化メカニズムとシナプス可塑性メカニズムに根ざした積極的な過程であることが理解された。ヒトの海馬周辺皮質では加齢に伴い非常に高い頻度でタウの凝集が観察されることが知られている。ネズミのperirhinal/entorhinal皮質におけるLTD形成は「感覚入力内の新奇個物の発見」に重要な役割を担うとされる。従って、海馬周辺皮質の主要な機能にリンクした生理過程に伴ったタウの蓄積は十分に考えられ、本研究が明らかにしたLTD誘導性タウオリゴマー形成機序は老化初期の自律的タウ蓄積メカニズムの重要な1つと想定される。

さらに、本研究で明らかになった重要な事実として、加齢した神経細胞ではシナプスの情報伝達で重要な役割を果たすAMPA受容体の代謝経路がリン酸化タウの代謝経路と共有されていることが上げられる。具体的メカニズムの詳細は明らかになっていないが、AMPA代謝系との共有化がオートファジー経路でのタウオリゴマー形成を促したように、タウあるいはタウオリゴマーの蓄積がAMPA受容体の細胞内動態に大域的に影響する可能性がある。従って、オートファジー-AMPA受容体-タウ代謝経路は新たなタウオパチー型認知症治療のターゲットとなりうる。

【シナプスにおけるオートファジーの関与と加齢依存的変化】

1次培養神経細胞や神経様培養細胞を用いた研究により、リン酸化タウの駆除にNDP-52を介在したオートファジー経路が重要な役割を担ってことが報告された (Jo et al. 2013, Nature communi.)。本研究において、高齢期においてもオートファジーの抑制がリン酸化タウの増量をもたらすことを示した。従って、リン酸化タウの除去というオートファジー機能は加齢に依存することのない神経系特有の機能と言える。

Shehata et al (2012, J Neurosci)はLTDを誘導するNMDA刺激によってもオートファジー経路が活性化し、スパイン近傍にLC3シグナルが蓄積するということが既に報告している。本研究においても、LFSによって誘導されるLTD形成にも付帯してtypeII LC3の増量がみられることからオートファジーの活性化が起こっていることが示唆された。一方で、我々も含めた複数の研究室より、NMDA誘導型LTDの形成に伴ってPHF 1 サイト (ps396およびps404) のリン酸化がおこることが報告されている。これらの実験事実を考え合わせると、LTDに付帯して活性化されるオートファジーの本来的役割の1つとして誘導されたリン酸化タウの除去あることが考えられる。

一方で、本研究は高齢期にはLTDの形成にオートファジー経路が重要な役割を果たしていることを発見しただけでなく、プロテオソーム系の役割が加齢とともに消失していることも示した。これはLTDの形成に必要なAMPA受容体代謝経路の切り替えが起きていることを示しており、これまでに報告されていない新しい脳神経系の加齢様式と言える。Keller等 (2000, Neurosci)はラット中枢神経系のプロテオソーム活性を調べ、加齢とともに大きく減少することを報告しており、AMPA代謝経路の切り替えはこのグローバルな変化に付随した補償的变化という可能性もある。

【タウの集積/重合とオートファジー】

オートファジーの形成が重合したタンパクの除去に重要な役割をしていることは繰り返し報告されている。例えば、Clucken等 (2012, Autophagy) はバフォマイシンによる後期オートファゴゾーム形成の阻害は α シネクリン重合体を増量する一方で α シネクレイン由来の細胞毒性を低減すると報告している。今回詳しく報告しなかったが、同様にバフィロマイシンによってオートファジー経路の後期過程を阻害するとタウオリゴマーが増量することを確認しており、タンパク重合体の制御におけるオートファジー経路の重要性に関しては高い一般性があると考えている。

一方で、オートファジーがタンパクの重合に重要な役割を持つとの報告もある。ドイツマックスプランク研究所のMandelkowとその共同研究者らはそれ自身で非常に重合性の高い変異タウ (Tau_{RD} Δ K) の細胞内重合制御機構を調べて、シャペロン介在オートファジー経路を介してリソソーム表面で濃縮/重合することを見出した (例えばWang等 2012, Autophagy参照)。この場合、マクロオートファジー形成を3-MAで抑制した場合Tau_{RD} Δ K重合体は増量する。我々は野生型のマウスタウが一過性に重合体を形成する場合を調べ、3-MA感受性のあるマクロオートファジーが重合体形成に重要な役割を果たしている可能性を示した。両者は用いたタウ種が大きく違い、さらにLTD形成といった特別な細胞環境を想定しているか否かも全く異なる。それにも関わらず2つの研究は非常に重要な結論を導く。すなわち、細胞内で起こるタウ重合の少なくとも初期過程は何らかの積極的タンパク集積過程を介在してなされるということである。タウオパチーには多くの形態のタウ封入体が報告されているが、そのバリエーションは使用されるタンパク集積メカニズムの違いを反映しているのかもしれない。

埋め込み電極法を用いLFSを繰り返すと、頻度は低いものの高度にリン酸化されガリアス陽性を示すタウオパチー様タウ封入体を形成した細胞が海馬に観察されることは既に報告した。従って、LFSにより形成されたタウオリゴマーはタウオパチーのシードと成りうるタウ種と言える。

【タウの生理機能】

先に、高齢期にタウまたはタウオリゴマーがオートファジーを介してAMPA受容体の細胞内動態に影響する可能性を示した。木村等 (2007, EMBOJ) は野生型ヒトタウを過剰発現するマウスが加齢するとentorhinal皮質でリン酸化タウの蓄積とシナプス障害が発症することを報告した。このシナプス障害のメカニズムは未だに明らかにされていないが、リン酸化タウの増量はオートファジーを介してAMPA受容体の細胞内動態に強く影響することを示す事例とも考えられる。

一方で、我々は、タウノックアウトマウスの海馬ではLTDが障害されていることも既に報告した。最近の報告によると、タウのPHF1サイトのリン酸化を抑制することでも同様なLTD障害が誘導されるので、タウのリン酸化がLTD形成に重要な役割を持つことも示された。このLTD形成におけるタウの貢献は上述のオートファジーを介した作用と区別される。何故なら、今回の報告では詳しく示さなかったが、LTD形成におけるタウノックアウト効果には加齢依存性が認められず、オートファジー経路の修飾作用とは区別される為である。

本報告書において、器官培養されたタウノックアウト海馬神経細胞においてもNMDA誘導LTDにおける細胞質内GluR2含有AMPA受容体の増量 (シナプスからの受容体移動) が起こらないこと、定常時のGluR2含有AMPA受容体の細胞質内分布が野生型に比べて強いこと、さらには、これらのノックアウト効果はGluR1含有AMPA受容体では不明確なことを

示した。GluR2含有AMPA受容体とGluA2非含有AMPA受容体ではLTD形成時の細胞内トラフィックが異なっていることが知られており、タウはNMDAで特定のトラフィックに作用する機能タンパクであることが理解された。

これまで示してきたようにタウはリン酸化され、あるいは、オリゴマー化されそれぞれ特異な方法でAMPA受容体の動態に影響する神経機能並びにその障害を考える上で極めて重要なタンパクであると言える。

【今後の展望】

脳ネットワークにおいてシナプスはその機能の中心を担う重要な部位であり、多くの努力にも関わらず、タウ病理形成とシナプス機能不全の直接的関係を示す知見はこれまでに示されることはなかった。ところが、本研究で明らかにしたように加齢したシナプスではLTDの形成にともなうAMPA受容体の代謝系が変化することで、LTDに伴うタウオリゴマーの形成が強化されることが明らかになってきた。上での議論したように、3-MAに感受性のあるオートファジー過程におけるAMPA受容体代謝経路とタウのオリゴマー形成/代謝経路のカップリングはタウに誘導されるシナプス病態の謎をとく手がかりとなりうるので、今後もこれに注力する。

これまでの計画ではタウノックアウト標本にAAVを用いてリン酸化に関連した変異タウを発現し、その効果を計測する予定であったが、オリゴマー形成に重要な役割をもつSS結合をブロックする変異タウを導入し、これの影響をしらべることでタウのオリゴマー化がAMPA受容体のトラフィックに与える影響を明らかにするという新たな可能性を検討している。

また、本文では触れなかったものの、オリゴマーに特異性をもつタウ抗体 (T22) に陽性を用いて免疫沈降したタウオリゴマーにはNDP52と呼ばれるファゴソームとのブリッジタンパクが含まれていることを見出しており、タウオリゴマーはこれを介してファゴソームと接続していることを予想している。今後、AD患者あるいは健常高齢者脳のタウ封入体にNDP52が含まれているのか否かを調べることで、ヒトの老化あるいは病理と本研究成果との関係が明らかにしたい。

本研究ではマウス脳で得られた知見を随時反映させることで構築する「器官培養系を用いた薬物スクリーニングシステムの開発」を並行して行っている。これまでのところ、形成されたシナプスではタウ依存性LTDが誘導されていることが示されており、今後タウの分布やAMPAの分布の変化など多くの知見が得られるものと期待している。さらにマウス脳の研究で新たな高齢シナプスの特性が明らかになってきたので、培養システムでオートファジー依存性LTDを再現することで擬似高齢ネットワークを作成する予定である。

この病態生理学的に作成されたモデルネットワークはタウ凝集体の生成から代謝までの多くのプロセスを含んでおり、病態形成のカスケード全域に渡った多様な化合物スクリーニングを可能にするであろう。今回開発した培養標本における細胞内染色法によるスパイン/GluR2動態の解析法によって、モデル培養回路の最適化は可能であると考えている。擬似老化ネットワークの作成に成功した場合、タウ凝集体蛍光マーカーおよびオートファジー蛍光マーカーを利用したライブイメージング手法を開発し、実用性のある多チャンネル並列スクリーニングシステムの開発を行う予定である。

一方で、加齢マウスの神経活動解析は場所細胞の情報コーディング様式が加齢依存的に変更されていることを示唆した。上で議論したように、この変更にはシナプス可塑性

の特性が伴うことが予想され、さらにその変更はタウ依存的である。これまでに、タウが1部のAMPA受容体の細胞内トラフィッキングに影響することを見出してきたが、今後NMDA受容体サブタイプのトラフィッキングへの影響を調べることでこの問題に対応していきたい。

これまでに示してきたように、脳の加齢は様々な加齢要因（代謝の減衰や感覚の減衰など）とそれに対する補償的变化によって構成される複雑なイベントである。本研究が示してきたあるいは示しつつある重要な点は、その補償的变化の重要な位置にタウがあることであろう。今後、この生理的タウの役割が、病的と呼ばれるタウ種の発生でどのように変化するのかを調べることで、高齢脳におけるシナプス/機能障害の発生とタウの関係を厳密に求めることが可能と考えている。その上で、作成した擬似高齢神経ネットワークにより明確な生物学的基盤に基づいた化合物スクリーニングが実現可能であることを示し、創薬研究に繋げる架け橋を構成したい。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

平成26年度

- 1) Contribution of the nucleus accumbens core (AcbC) on behavior control during a leaned resting period: introduction of a novel task and lesion experiments. C. Sato, M. Hoshino, N. Ikumi, K. Oba, O. Shouno, T. Sekiguchi, T. Kobayashi, T. Machida, G. Matsumoto, H. Furudate, T. Kimura (責任著者), PloS ONE, 9(4):e95941 (2014)
- 2) Female hippocampus vulnerability to environmental stress as precipitating factor in tau aggregation pathology. I. Sotiropoulos, J. Silva, T. Kimura, A. J. Rodrigues, P. Costa, O.F.X. Almeida, N. Sousa, A. Takashima, J. Alz. Des. 43(3): 767-774, (2015)

2. 学会発表

平成26年度

- 1) 鈴木真美子, 木村哲也「シナプス可塑性におけるタウの役割」第37回日本神経科学大会, 2014年9月11-13日、横浜
- 2) Yoshida H. Identification and characterization of extracellular tau. The Society for Neuroscience Annual Meeting 2014, Washington, D.C., U.S.A., November 19, 2014
- 3) 吉田裕孝「細胞外タウの生化学的解析」第33回日本認知症学会学術集会、2014年11月30日、横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし