

タウ病理形成伝播機構の解明に関する研究（26-32）

主任研究者 吉田 裕孝 国立長寿医療研究センター
NC・企業連携共同研究部（エーザイ）（薬理学研究室室長）

研究要旨

タウオパチーはタウ線維を構造単位とする細胞内封入体の脳内蓄積を病理学的特徴とする。アルツハイマー病（AD）における異常タウと神経原線維変化の進展ステージ分類からタウ病理伝播のプリオン仮説が提唱され、これを検証する実験結果が動物モデルを用いて報告されている。病原性タンパク伝播により病理変化が周辺組織へ拡大するという本仮説は新たな病態パラダイムとして興味深く、タウ病理伝播抑制による新規認知症治療法の開発が期待されるが、その機序については未知の点が多く、以下の疑問点があげられる。

- ①最初の病原性タンパク質（凝集核）が細胞内でつくられる機序について不明。
- ②モデル実験系ではタウオパチー患者あるいは動物モデル脳から調整した凝集核を必要とする。これをマウス脳に接種し接種部位の周囲に病理像が伝播するが（一次伝播）、続く被伝播細胞における二次的伝播を誘導する病原性タンパクの存在と性質が不明。
- ③Braakらの観察にみられる神経回路に従う病理伝播様式について詳細な解析はない。
- ④タウ病理が伝播する経路あるいは周辺領域における神経活動の変化は不明。

特に臨床的に認知症を呈する本疾患においてタウ病理形成と拡散が神経活動に与える影響の解析（未報告）は、本疾患発症機序の解明と治療法を開発する上で重要である。

本研究では、タウオパチーにみられるタウ病理形成機構ならびにその発症機構を解明するめざし、プリオン説を検証するため培養細胞系ならびに動物モデル系をもちいてこれまで未解明である細胞外に放出されるタウの同定とその解析、細胞外放出に影響を与えるタウ分子内領域ならびにコンフォメーションについての解析、タウの細胞外放出を調節する化合物の検索を行なった。培養細胞系による解析からタウ分子内領域の欠損あるいは欠損などによるそのコンフォメーション変化がタウの細胞外放出に影響を与えることを見いだした。そしてイオンチャンネル作用物質、細胞内輸送作用物質などの中にタウの細胞外放出を調節するものがあることを見いだした。野生型マウスならびにヒト P301S 変異タウを発現するタウオパチー・モデルマウス（PS19）の脳微量透析回収液中にタウを同定し、オリゴマー上で存在することを見いだしたが量的有意差はみられなかった。さらに、麻酔下のマウス海馬 CA1 に低頻度で電気パルスを持続的に与えることにより、神経細胞内にサル

コシル不溶性タウが形成されること、この現象がオートファジー阻害剤により抑制されることを見いだした。

主任研究者

吉田 裕孝 国立長寿医療研究センター
NC・企業連携共同研究部（エーザイ）（薬理学研究室室長）

分担研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター
分子基盤研究部（病態モデル動物解析室長）

A. 研究目的

タウ病理のプリオン様脳内伝播説（プリオン説）が提唱され、これを検証する実験が動物モデルを用いて報告されているがその機構は不明であり、患者脳内にみられる病理伝播様式との違いも指摘されている。本研究計画では、この問題点の解明も含めプリオン説を検証し、本疾患進行過程におけるタウ病理形成伝播の機構、ならびにタウ病理形成伝播が神経活動に与える影響を明らかにするため、培養細胞およびマウスを用いてタウ病理伝播に関与すると予想される細胞外タウの同定と解析を行うこと、細胞外タウ放出を調節する化合物をスクリーニングし、その作用点の解析からタウの細胞外放出機構を解明すること、そして電気生理学的手法により神経活動依存的タウ病理形成機構について明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

タウ画分の調整、検出ならびに定量

培養細胞からのタウの精製は、タウがホスホセルロース（P11）に結合する性質を利用する。タウを発現するSHSY5Y細胞あるいはHEK293細胞株を作製し、その培養上清からP11カラムを用いてタウを分画精製する。培養細胞内タウは細胞抽出液を調整し、これを試料として用いた。

タウの検出は抗タウ抗体をもちいたSDS電気泳動後イムノブロット法、定量は同法によってえられたイメージ解析からの定量（ImageJ software）、あるいは抗タウ抗体もちいたELISA法によりおこなった。タウの細胞外放出を調節する化合物を検索する実験では、3日間培養したタウを発現するSHSY 5 Y細胞に適宜希釈したイオンチャンネル作用物質あるいは細胞内輸送作用物質などの化合物を24時間暴露後、細胞培養液および細胞を回収し、同様にSDS電気泳動後、イムノブロット後上記のとおり定量をおこなった。

オリゴマー状タウの解析はNative電気泳動後、イムノブロット法によりタウの検出後、Native電気泳動用分子量マーカー (invitrogen)によりオリゴマーの分子量を測定、比較によりおこなった。

実験動物および動物実験

タウオパチー・モデルマウス (PS19) はジャクソン研究所 (日本チャールズリバー) から購入し、B6C3F1 (日本SLC) と交配し得た次世代のマウス (3-6ヶ月齢) を実験に使用した。ヒトタウ遺伝子の有無によりPS19+およびPS19-に分類し、後者の遺伝子型をもつ同腹個体を野生型マウスとして対照に用いた。マウス脳マイクロダイアリシス法はエイコム社製のシステムをもちいて行なった。マウス脳海馬領域 (B: -3.1mm; L: -2.5mm; D: -0.7mm) にカニューレを挿入し、術後3日目にペプチド用プローブ (1,000kDa cut off; 膜長3mm) を挿入し、挿入後3時間後から4-8時間回収液を採取し上記と同様に分析に用いた。

電気生理学実験

マウス脳より海馬を摘出しスライス標本を作製後、autophagy 阻害剤 3-MA 存在あるいは非存在下で局所場電位法をもちいてCA1 領域からシナプス後電位を計測しつつ、低頻度頻回刺激を与えてLTDを誘導した。上記脳スライス標本を用いた実験を麻酔下マウスの脳に直接電極を挿入し in vivo において同様の実験を行なう。

(倫理面への配慮)

独立行政法人国立長寿医療研究センター倫理規定に従って研究を遂行した。

DNA 組換え動物の使用に関する事項について：

本研究で使用する遺伝子改変マウスは、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。新たな遺伝子改変マウスを入手する場合は、法的な手続きおよびセンター規定を遵守する。

組換え DNA 実験について：

本研究で遂行する大腸菌を用いた組換え DNA 実験ならびに組換え DNA を導入した大腸菌を用いたタンパク質発現等の実験は 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の承認のもとに P1A 実験設備内において拡散防止措置をとったうえで行なった。

C. 研究結果

(1) 細胞外タウの同定とその性質の解析 (担当：吉田)

A. 培養細胞系における細胞外タウに関する研究

(1) ヒトタウ (412アミノ酸アイソフォーム) を発現するHEK293およびSHSY5Y細胞株を樹立した。これらの細胞培養液 (conditioned media) を回収し、抗タウ抗体をプローブとしたイムノブロット法によりタウが検出された。つづいて、これらの培養液ならびに回収した細胞から調整した抽出液をNative電気泳動に供し、同様にイムノブロット法によりタウを検出した結果、複数のサイズからなるオリゴマー状のタウが含まれていることを見いだした。さらに、細胞培養液および細胞抽出液中に含まれるオリゴマー・タウのサイズ比を比較した結果、細胞培養液中により大きなサイズのオリゴマーが含まれることを見いだした。

(2) タウ分子内には微小管結合領域をはじめとしてその機能に關与する複数の特徴的な領域が存在する。タウのC末領域、微小管結合領域ならびにN末領域欠損、そして微小管結合領域のみの変異タウを発現するHEK293細胞株を樹立し、これらと野生型 (全長) タウを発現する細胞株を培養してえられる細胞培養液中の細胞外に放出されたタウを抗タウ抗体をプローブとしたイムノブロット法により検出し、定量をおこなった。その結果、C末端領域欠損変異タウ、微小管結合領域のみのタウがもっとも多く細胞外に放出され、これにN末端領域欠損変異タウ、野生型 (全長) タウ、微小管結合領域欠損変異タウが続いた (細胞外タウ量と細胞内タウ量の比較において)。さらに、タウ凝集を抑制する変異 (I277PとI308P) タウを発現する細胞株を樹立し同様な実験を行なった結果、タウ凝集抑制変異タウは野生型タウより細胞外に放出される割合 (細胞外タウ量と細胞内タウ量の比) が少ないことを見いだした。

(3) タウの細胞外放出を調節する化合物の検索を行なった。SHSY5Y細胞に細胞毒性を示さない濃度に化合物を調整後暴露し、24時間後培養上清を回収し、抗タウ抗体をプローブとしたイムノブロット法によりタウを検出し定量した。その結果、イオンチャンネル作用物質、細胞内輸送作用物質などの化合物の中にタウの細胞外放出を亢進あるいは抑制する化合物があることを見いだした。

B. 動物モデルにおける細胞外タウに関する研究 (担当: 吉田)

野生型マウスを用いマウス脳マイクロダイアリス法による回収液中にタウが抗タウ抗体によって検出されることを見いだした。つづいて本回収液とマウス脳抽出液を用い、両試料内に含まれるタウの性質をNative電気泳動後、抗タウ抗体をプローブとしたイムノブロット法によりタウを検出した。その結果、両試料ともタウ・モノマーおよびタウ・オリゴマーが検出されたが、マウス脳抽出液中では大きさのより小さいオリゴマーの割合が高い

ことを見いだした。さらに、野生型マウスならびにヒトP301S変異タウを発現するタウオパチー・モデルマウス (PS19) の脳マイクロダイアリス回収液中のタウを抗タウ抗体をもちいたELISA法によって定量したが量的有意差はみられなかった。

(2) タウ凝集体形成を促進する神経活動の同定 (担当: 木村)

タウ凝集体形成伝播時の神経活動の同定する目的で、野生型マウスを用いて、生理的にタウ凝集体の形成を誘導する活動パターンを同定し、薬理的にその分子メカニズムについての解析を行った。麻酔下の海馬CA1に低頻度 (1 Hz) で電気パルス (20-30 μ A) を与え続けることで、神経細胞内にサルコシルに不溶化したタウが検出された。さらに、タウの分解代謝系の1つと考えられているautophagyを3-MAにより薬理的に阻害したところ、サルコシル不溶化タウの産生が障害された。

D. 考察と結論

(1) 培養細胞ならびにマウスモデルをもちいた解析から、タウが細胞外に放出されることが示された。培養細胞系におけるタウ分子内領域欠損あるいは凝集阻害変異タウをもちいた解析から、タウのコンフォメーションならびにタウのオリゴマー状態が細胞外への放出に影響することが示された。

(2) イオンチャンネル作用物質あるいは細胞内輸送作用物質などの化合物がタウの細胞外放出に影響することから、この現象が細胞活動依存性であることが示された。

(3) 非麻酔下のマウス脳マイクロダイアリス回収液中にタウが検出されたことから、*in vivo*においてもタウが細胞外に放出されることが示された。しかしながら、本結果はこれまでの報告とは異なりタウオパチー・モデルマウスと野生型マウスにおいて脳マイクロダイアリス回収液中のタウの量に有意な差がみられなかった。このことは本機構がタウの発現量に依存せずに、タウの細胞外放出を調節する神経の活動に依存することを示唆するものである。

(4) タウの分解代謝系の1つと考えられている autophagy の特異的阻害剤である 3-MA によりサルコシル不溶化タウの産生が障害された。この結果から生理的なタウの凝集過程はオートファゴゾームの形成と密接に関わることが示唆された。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Sato C, Hoshino M, Ikumi N, Oba K, Koike A, Shouno O, Sekiguchi T, Kobayashi T, Machida T, Matsumoto G, Furudate H, Kimura T.

Contribution of the nucleus accumbens core (AcbC) on behavior control during a leaned resting period: introduction of a novel task and lesion experiments.

PloS ONE, 9(4):e95941 (2014)

2) Sotiropoulos I, Silva J, Kimura T., Rodrigues AJ, Costa P, Almeida OF, Sousa N, Takashima A.

Female hippocampus vulnerability to environmental stress as precipitating factor in tau aggregation pathology. J Alzheimers Dis. 2015;43(3):763-774.

2. 学会発表

1) Yoshida H.

Identification and characterization of extracellular tau.

The Society for Neuroscience Annual Meeting 2014, Washington, D.C., U.S.A.,

November 19, 2014

2) 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

3) 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, 横浜市, 2014年9月11-13日

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