

病理的タウ蓄積がシナプス動態に与える影響の包括的検討とこれに基づいた認知症治療薬の設計 (29-30)

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

近年の研究成果により、AD 発症とともに可溶性のタウあるいはタウオリゴマーの細胞外蓄積が起こることが示され、これらのタウ種は能動的に細胞から放出されること、ある種の細胞外タウ種はシナプスに作用し機能障害を誘導することが明らかとなり、認知症発症と相関が高いシナプス障害を誘導するメカニズムの1つと考えられるようになってきた。本研究では、細胞外タウオリゴマーに着目し、そのシナプス障害誘導メカニズムを解明し、これを制御する中・小化合物の開発を行うことで、これまでにない認知症治療薬を創出することを目的として数々の取り組みを行ってきた。その結果、細胞外タウオリゴマーによるグルタミン酸受容体シナプスの長期的抑圧現象を発見し、それを誘導する分子メカニズムを明らかにすることに成功した。さらに、これらの知見を基にした細胞ベースの創薬スクリーニングシステムの開発を行い、認知症治療薬開発の基盤を作成した。木村(哲)はシナプス障害誘導メカニズムの解明、木村(展)はエンドサイトーシスによる細胞内取り込みメカニズムの解明、河合は創薬スクリーニングシステムの開発を行った。

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

木村 展之 国立長寿医療研究センター 室長

河合 昭好 国立長寿医療研究センター 部長

A. 研究目的

認知症とは一旦発達した高次脳機能が何らかの後天的な理由により低下し社会生活に困難を呈する状態を言う。認知症の約35%がアルツハイマー病(AD)、約15%がAD脳血管性の混合型、5%が前頭葉側頭葉変性症(FTLD)であり、ADやFTLD等の神経変性疾患が多くの割合を占めている。神経変性疾患による認知症は時間をかけて進行する記憶障害及び人格変化によって特徴づけられ、認知機能の障害の程度に高い相関性がある一貫した特長は、神経原線維変化(NFT)である。

微小管結合タンパク(MAP)の1つとして知られるMAP- τ (タウ)はNFTを構成する主要素であり、ADにおける認知症の形成と深い関わりがあるタンパクとして考えられている。実際に、AD患者の死後脳の解析では、NFTの大脳皮質や海馬における分布と頻度(Braak stageとして定量化)は患者の認知能力(Mini-Mental State Examinationにより定量化)は逆相関を示すとともに、シナプス密度とも逆相関することが知られている。一方で、条件付きでタウの強制過剰発現を行なった動物実験により、神経細胞内に形成されたNFTそのものにはシナプスの抑圧/消失あるいは神経細胞死の誘導といった強いシナプ

ス毒性あるいは神経毒性は無いことが明らかとなり、タウによる NFT 形成に至るいずれかの過程でこれらの毒性が発現すると考えられている。

AD における認知症の発症はベータアミロイド (AB) ペプチドによる老人斑形成開始より 20 年程度遅延することから、AB の蓄積は認知症を誘導する重要かつ必須なパラメータであるが、そのものが直接的に強いシナプス障害などを誘導することは考え難い。従って、老人斑形成から認知症発症までの 20 年間に作用する新たな原因パラメータを検討する必要がある。その有力な候補として考えられてきた NFT は直接的な神経毒性も持たないことが動物実験により示された。一方で、最近の研究では、脳脊髄液 (CSF) 内のリン酸化タウ量あるいはタウオリゴマー量が AD 病態の進行とともに増大することが報告され、さらに、動物実験ではある種の細胞外タウオリゴマーは記憶や学習低下と大きく関係するシナプスの可塑性障害を誘導することが示された。これらのことは、細胞外に漏出したある種の細胞外のタウあるいはタウオリゴマーは AD 型認知障害と高い相関を持つ原因物質候補であることを示している。しかしながら、これまでに、これらの認知症原因物質候補を持つシナプス毒性の発現メカニズムが明らかにされたことはなかった。

本研究は、AD も含むタウ誘導型認知症の治療ターゲットとして細胞外タウオリゴマーが NMDAR を刺激することで引き起こすシナプス毒性を提案し、それらを消去する AD 治療剤又は予防剤を見出す手法を提供することを目的とする。

B. 研究方法 (木村 (哲))

NT2 細胞の維持

液体窒素にて凍結保存された NT 細胞を、解凍後、維持培養溶液 (High glucose DMEM (sigma D6429), 10% Fatal bovine serum, 100U/ml penicillin/streptomycin) 細胞接着性プラスチックシャーレ) に分散、インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で培養した。3 回/週培地交換を行い、3-4 日間でコンフルエントになり、accutase により細胞を剥離、継代培養を行った。細胞凍結は 1-2X10⁶ /tube になるように DMSO free CryScarless に懸濁して、細胞凍結箱に入り -80°C で一晩置き、次の日液体窒素タンクにて長期保存した。

NT2N 細胞分化誘導

培養維持された NT2 細胞は、1.5X10⁶-2.5X10⁶/plate 密度で、低付着 Bacteriological Petri Dishes (理科研製、star SD dish 9015 型番) に再分散して、インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で、振動機上で (100rpm) 浮遊培養し、1 日後から RA (All trans retinoic acid, abcam) を 1μM 濃度で加え細胞の分化を誘導した。振動により細胞が spheroid を形成、14 日目で形成した細胞 spheroid を PDL (5μg/ml sigma) /LAM (nippi iMatrix-511 silk) でコーティングされた 10cm dish に撒き、インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で付着培養した。次の日から 3 種類の mitosis inhibitors (10μM Uridine, 10μM Floxuridine, 1μM ARAC; Cytosine β-D-arabinofuranoside) を添加、三日目で細胞を剥離 PDL/LAM でコーティングされた 35mm のシャーレに 1.0X10⁶/Well 密度で再び撒き、3 種類の mitosis inhibitors 存在で更に四日間培養して、神経細胞分化を行った

NT2N 細胞の成熟とシナプスネットワーク形成

分化した NT2N 神経細胞をインキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で、0.2% SM1 Neuronal Supplement 含有、BrainPhys™ Neuronal Medium (STEMCELL Technologies) 内で培養させ、培地は週 3 回半交換を行い、細胞は 2-3 ヶ月まで維持させた。上述した方法で形成した細胞の多くは神経細胞マーカー MAP2 に陽性であり、これらを NT2N 細胞とした (図)。さらに培養細胞をホモジナイズし、12,000g の遠心操作 (4°C、15min) によって得られた膜分画 (ペレット) を 1% TritonX100 に溶解することで得られる 1% TritonX100 不溶性画分 (12,000g 遠心後のペレット) には PSD-95 及び GluN1 の発現が確認された。これらのこと

により、形成した NT2N が中枢の神経細胞と特徴を共有し、グルタミン酸受容体の化学シナプスを形成していることが確認された。以下、この細胞群を NT2N 細胞とする。

細胞内カルシウムにおけるタウオリゴマー応答

カルシウムインジケータの導入

タウオリゴマータウオリゴマーサンプルが細胞内カルシウム濃度に与える影響を検討するために、3-5-1 で作成した NT2N 培養細胞にカルシウムインジケータ Cal-520 (AAT Bioquest) あるいは fluo-8 (AAT Bioquest) を導入した (それぞれ AM 体を導入)。カルシウムインジケータ Cal-520 は 4 μ M の濃度で 1 ml Mg-free、0.1 μ M glycine 含有 HHBS (Hepes-buffered Hanks' balanced salt solution : 1.26mM CaCl₂, 5.33mM KCl, 0.44mM KH₂PO₄, 4.17mM NaHCO₃, 137.93mM NaCl, 0.34mM Na₂HPO₄, 5.56mM D-Glucose, 20mM Hepes, pH7.4) に溶解, 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で、NT2N 培養細胞に 2 時間取り込まれた。fluo-8 2 μ M の濃度で 1 ml Mg-free HHBS に溶解, インキュベーター内 (37°C、5%CO₂) で、NT2N 培養細胞に 30 分取り込まれた。その後、HBSS により 3 回洗浄し、タイムラプスイメージ取得装置のインキュベーター内 (37°C、5%CO₂) に 1 時間以上放置したものをカルシウム計測に使用した。

(木村 (展))
分担報告参照
(河合)
分担報告参照

C. 研究結果

(木村 (哲))

長期的シナプス抑圧 (Long-Term Depression; 以下 LTD) が NMDA 受容体依存型 LTD (NMDA-receptor-dependent LTD ; 以下 NMDAR-LTD) であるか否かを、NMDAR-LTD 障害が報告されているタウノックアウトマウス由来スライス脳を用いて検討した。また、機能的 NMDAR の発現が確認されている培養細胞を用いたカルシウムイメージングによりこれを検証した。

正常マウスにおけるシナプス受容体変化

タウオリゴマーサンプルを正常マウスより得たスライス脳に暴露し、シナプス画分 (0.1% TritonX100 可溶性膜画分 ; 分画方法は図 2 左参照) 中の AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) の量変化を生化学的に解析した。正常マウスでは、平行して実験操作された同じ脳由来のコントロールスライスに比ベータウオリゴマーに暴露されたスライスのシナプスにおける AMPAR の減少が観察された。このことはタウオリゴマータウオリゴマーサンプルにより誘導された LTD は AMPAR の減少を伴う抑圧であり、NMDAR-LTD と特徴を共有することが明らかとなった。

タウノックアウトマウスにおけるシナプス受容体変化

タウノックアウトマウス由来スライスでは同様な変化は観察されなかった (図 2 右)。従って、タウオリゴマータウオリゴマーサンプルにより細胞外誘導された LTD は細胞内タウ依存的であり、これも NMDAR-LTD と特徴と一致することが明らかとなった。

(木村 (展))

「トランフィック障害」仮説に基づいて、加齢神経系のモデル化及びを目指した各種取り組みを行った。今回はエンドソーム/リソソーム経路とタウオリゴマー拡散経路との関係を明らかにする実験の基盤を得るために細胞外タウオリゴマーの細胞内取り込みを検討した。

pH センサー標識 HT タウオリゴマーサンプルを NT2N 細胞に暴露し、十分に洗浄した前後で、蛍光顕微鏡観察を行った (In-Cell analyzer;GE を使用)。その結果、細胞体付近に強い蛍光変化が観察され、HT タウオリゴマーが細胞に付着した後、細胞内のエンドソーム/リソソーム経路に移動していることが確認された。

(河合)

各種タウ及びタウオリゴマーサンプルの作成方法の開発を行い、これを安定的に供給することに成功した。

D. 結論と考察

本研究によってある種の細胞外タウは NMDAR に直接作用し、その活性化を介してシナプスの抑圧を誘導していることが明らかとなった。このシナプス抑圧活性を示すタウの物性的特徴は十分に解明されてはいないものの、リン酸化されていること、モノマーではないこと、可溶性の比較的小型のタウ重合体 (タウオリゴマー) であること、そしてその活性発現にはタウの c 末構造が必要であることが明らかとなってきた。AD 患者の CSF よりタウオリゴマーが検出され、AD の重篤度と共に増加することが示された。そのオリゴマーは T22 タウオリゴマー抗体に陽性である比較的小型の重合体であること、少なくとも C 末構造は維持されていることが示されており、このオリゴマーが NMDAR 刺激活性を持つことは十分期待できる。

NMDAR は STDP (スパイクタイミング依存型可塑性) と呼ばれる認知機能を支えるシナプス可塑性において重要な役割を持つグルタミン酸受容体である。STDP は神経間の電気的活動の同期性を反映してシナプスを変更することで脳神経ネットワークの自己組織的かつ機能的最適化を実現する。一方で、神経活動と関連性がない NMDAR の持続的刺激はこの最適化プロセスを妨害し機能的劣化の原因となりうる。実際、NMDA あるいはグルタミン酸投与による NMDAR の持続的活性化は広範囲なシナプスの長期的抑圧を誘導し、場合によっては、細胞死を誘導することはよく知られた事実である。細胞外タウオリゴマーが神経活動を反映しない持続性がある NMDAR 刺激源であると考えた時、細胞外投与されたグルタミン酸と同様なシナプス毒性を持つと期待される。

E. 健康危険情報
なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kimura T, Suzuki M, Akagi T. Age-dependent changes in synaptic plasticity enhance tau oligomerization in the mouse hippocampus. *Acta Neuropathologica Communications* 2017; 5:67
- 2) Maekawa M, Watanabe A, Iwayama Y, Kimura T, Hamazaki K, Balance S, Oba H, Hisano Y, Nozaki Y, Onishi T, Toyoshima M, Shimamoto C, Iwamoto K, Bundo M, Osumi N, Takahashi Y, Takashima A, Yoshikawa T. Polyunsaturated fatty acid deficiency during neurodevelopment in mice models the prodromal state of schizophrenia through epigenetic changes in nuclear receptor genes. *Translational Psychiatry* 2017; 7:e1229
- 3) Umeda T, Kimura T, Yoshida K, Matsuyama S, Takao K, Sakai A, Yamashita Y, Fujita Y, Suzuki M, Miyakawa T, Takashima A, Morita T, Mori H, Tomiyama T. Mutation-induced loss of APP function causes GABAergic depletion in recessive familial Alzheimer's disease: analysis of Osaka mutation-knockin mice. *Acta Neuropathologica Communications* 2017; 5:59

- 4) Suzuki M, Kimura T. Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways. *Neuroscience Letters* 2017; 653: 276-282
- 5) Kimura N.
Type II Diabetes mellitus accelerates age-dependent A pathology in cynomolgus monkey brain. *Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer disease ? Springer* (book) In Press.
- 6) Kimura N, Yanagisawa K.
Traffic Jam Hypothesis: The Relationship Between Endocytic Dysfunction and Alzheimer's Disease. *Neurochem Int* S0197-0186(17): 30249-8 (2017).
- 7) 木村展之.
認知症研究におけるカニクイザルの有用性. 実験医学増刊 Vol.35 No.12 「認知症発症前治療のために解明すべき分病態は何か？」

2. 学会発表

1. 木村哲也. タウの生理学的・病態生理学的機能について第 59 回日本老年医学会学術集会, 教育講演, 2017 年 6 月 14 日, 名古屋市
2. Kimura N, Suzuki K, Tsuchiya Y. Concomitant disruption of retrograde trafficking induces intracellular accumulation of A β . *ConBio2017* (第 90 回日本生化学会) 2017 年 12 月 6 日 兵庫県神戸市
3. 竹内真吾, 下澤律浩, 保富康弘, 木村展之. 低グルコースに伴うオートファジーの亢進はエンドサイトーシス障害を増悪する. *Conbio2017* (第 40 回日本分子生物学会) 2017 年 12 月 6 日 兵庫県神戸市
4. 石黒亮, 野間崇志, 木村展之, 昆隆英. グアニン四重鎖の酸化は TDP-43 による mRNA 輸送機能を阻害する. *ConBio2017* (第 40 回日本分子生物学会) 2017 年 12 月 8 日 兵庫県神戸市
5. 木村展之, 鈴木恵子, 土屋由加子. 逆行性軸索輸送の包括的機能低下が A β の細胞内蓄積を誘導する. 第 36 回日本認知症学会 2017 年 11 月 24 日 石川県金沢
6. Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein dysfunction impedes retromer trafficking and concomitant disruption of retrograde trafficking is required for the alteration in APP metabolism. *Society for Neuroscience 2017*, 2017 年 11 月 11 日, Washington DC (USA)
7. Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Concomitant disruption of dynein-mediated retrograde endosome trafficking impedes APP metabolism. 第 60 回日本神経化学会 2017 年 9 月 8 日 宮城県仙台市
8. Kimura N. Age-related endocytic dysfunction is involved in Alzheimer's disease pathology. 第 60 回日本神経化学会, 招待口演, 2017 年 9 月 9 日 宮城県仙台市
9. 坂口和弥, 光森理紗, 新飯田俊平, 橋本有弘, 下田修義. DNA methylation analyses indicated changes in leukocyte composition in Alzheimer's disease patients. 第 40 回基礎老化学会合同大会, 2017 年 6 月 16 日, 名古屋市
10. Kimura N, Ueda N, Tomita T, Yanagisawa K. Retromer and Rab2-dependent trafficking mediate PS1 degradation by proteasomes in endocytic disturbance. 第 40 回日本基礎老化学会 2017 年 6 月 15 日 愛知県名古屋市
11. Kimura N, Samura E, Suzuki K, Okabayashi S, Shimozawa N, Yasutomi Y. Dynein Dysfunction Reproduces Age-Dependent Retromer Deficiency: Concomitant

Disruption of Retrograde Trafficking Alters APP Metabolism. ADPD2017, 2017
年4月1日, Vienna (Austria)

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
出願準備中。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。