

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告

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

主任研究者 木村 哲也 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部 (室長)

研究要旨

・研究の概要

神経はシナプスを形成することで互いに信号を伝達し、その重み付け分布は神経の受容特性や演算特性を定める。そして、シナプスの演算素子としての有効性は深層学習などの有効性によって十分に示されていると言える。実際、自閉症スペクトラムや統合失調症あるいは認知症患者のシナプス数は健常者と（増える場合と減る場合があるが）異なり、これらの障害の形成にはシナプス動的維持過程（いわゆる可塑性）が深く関わることは間違いない。

我々はこれまでにタウのリン酸化や凝集過程とシナプスの可塑性がどの様に関わるのかを調べ、それらはシナプスの可塑性（NMDA型グルタミン酸受容体-NMDARに依存した抑圧過程）とリンクすることで生理的に達成されることを示して来た。

さらに本研究において、シナプスの抑圧過程そのものをある種の細胞外タウオリゴマーが誘導しうること、そのシナプス抑圧過程誘導過程はNMDARの活性化によって引き起こされること、タウオリゴマーは直接NMDARに作用しカルシウム流入を誘導できること等が明らかになった。

最近、細胞外のタウオリゴマーは認知症の進行と並行して増量することが報告された。我々の研究は、この細胞外タウオリゴマーがシナプス抑圧を誘導するだけでなく、新たなタウオリゴマーの形成をも誘導することで症状の増悪化にも寄与している可能性を示している。

現在、外部の共同研究者と連携し、タウオリゴマー・NMDAR相関を制御することで、タウオリゴマーのシナプス毒性を除去するペプチドや小型化合物の探索研究を開始している。得られた薬剤はシナプス（認知）障害を抑止するだけでなく、それを誘導する担体の減弱にも有効に機能すると期待される。

尚、平成30年度より研究の成果を受けて大幅に班員の増員を行った。

・研究の進捗状況・結果

1. 発見した細胞外タウオリゴマーの新機能に関する知財化・論文化：

アルツハイマー病（AD）脳由来のタウオリゴマーがシナプス抑圧を誘導できること、リコンビナントタウより形成したタウオリゴマーも同様な性質を持つこと、細胞外タウオリゴマーの誘導するシナプス抑圧は内因性タウ依存的（NMDAR依存性シナプス抑圧カスケード依存的）であること、細胞外タウオリゴマーはAMPA型グルタミン酸受容体やNMDARの細胞内取り込みに影響するだけでなく側方移動（シナプス内外の膜上移動）にも選択的に影響しシナプス外NMDARを増量する場合があること、細胞外タウオリゴマーは直接NMDAR複合体と相互作用を持ち、NMDARを活性化しカルシウム流入を誘導できること等を明らかにしてきた。これらの細胞外タウオリゴマーの病態生理学的新機能は、タウオリゴマー・NMDAR相関制御が認知症の新たな治療ターゲットとなりうることを示しており、論文の作成に先行して特許化を進めた。（木村哲）

2. 高い膜タンパク結合性を有するタウオリゴマーのスクリーニング:
NMDAR 刺激作用を持つタウオリゴマーの特性を明らかにするために、デタージェント溶出した NMDAR を含む膜タンパク群とタウオリゴマーの直接的相互作用を *in-vitro* で評価する方法を開発した。これにより、NMDAR に相互作用するタウオリゴマーを再定義した。これらの成果は上述した特許に含まれる。(木村哲)
3. NMDAR ベース高活性タウオリゴマー検出システムの作成:
NMDAR あるいは膜タンパクを捕獲タンパクとし、高活性タウオリゴマーを定量する Elisa システムを作成した。その結果、膜タンパクには 2 つのタウオリゴマーの結合パートナーが含まれていること、NMDAR に対しては femtoM 程度で結合が可能であることを明らかにした。この検出器は極めて高感度でヒト CSF に含まれる高活性タウオリゴマーの検出も可能である。(河合、木村哲)
4. 病的タウオリゴマーを拮抗抑制するペプチドのスクリーニング:
ペプチドスクリーニングは東京大学理学部菅教授との共同研究として進める。方法は菅教授が開発した自己組織的なスクリーニング法を採用し、これに必要なタウオリゴマービーズの作成を担当した。用いたタウオリゴマーの特性評価は 2 の評価方法および Blue Native Page 法で行い、NMDAR 刺激性タウオリゴマーを精製し、これを固定したオリゴマービーズを作成した。これを用いて、現在、Raid 法 (東大菅教授) 得られたペプチドの評価は 2、3 の方法を用いて行う。
5. タウオリゴマー/NMDAR 結合の薬理的・構造論的解析:
3 で作成したタウオリゴマービーズ上でタウオリゴマー-NMDAR 複合体が形成でき、さらに作成したタウオリゴマービーズは生理条件でタウオリゴマーの切断溶出が可能な構造となっている。これを利用することで、タウオリゴマー-NMDAR 複合体を高い純度で得ることができる。こうして得られた複合体をクライオ電顕法によって解析し、タウの c 末先端部にありと想定される結合領域構造を解析することが可能となるので、これの実験準備を行っている (生理学研究所 村田准教授との共同研究)。
6. 細胞外タウオリゴマー作用の電気生理学的・細胞生物学的評価:
細胞外タウオリゴマーは極低濃度であるが、その濃度帯域で確かに NMDAR と結合しうる。NMDAR のもつ特異性より、これとの結合は極低濃度のオリゴマーに対して濃縮効果を持ち、複雑な生体反応を誘導することが予想される。本研究ではタウオリゴマーの生理濃度におけるシナプスや細胞の反応あるいは毒性を解明する目的で、NMDAR 発現培養細胞を構築を行い、NR1/NR2B 複合体を賛成する細胞を作成した。さらに形成された複合体とタウオリゴマー結合を確認した。
7. 個体レベルでの薬剤評価システムの作成:
用いたヒトタウオリゴマーは 2N4R タウで形成されており、0N4R を基調とするマウススタウとは区別可能であり、先に用いた方法(Kimura et al 2017 参照)に従ってそのオリゴマー化は解析できる。2 により使用するタウオリゴマーが確定され次第、タウオリゴマーの海馬への物理的インジェクションを行い、シナプス抑圧および再帰的タウオリゴマー増量が起こるか否かを明らかにし、さらに、3 または 4 で中小化合物薬剤が同定された場合、各薬剤のタウオリゴマーのインジェクション効果(シナプス保護、オリゴマー形成抑止など) に与える影響を評価し、行動試験も加えることでそれぞれの安全性を吟味する。ここで良好な結果が得られた場合はライセンスアウトを検討する。本実験に必要なものは加齢マウスであり、本年度は加齢タウノックアウト、加齢 hTau Tg マウス、加齢野生型マウスの準備のみを行った。来年度は、既に、毒性に問題があるもののタウオリゴマー-NMDAR 複合体の形成を阻害しうるペプチドを見出しており、これの *in vivo* 試験を開始する予定である。

主任研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部 (室長)
 分担研究者
 河合 昭好 国立長寿医療研究センター 治療薬探索研究部 (部長)
 木村 展之 国立長寿医療研究センター アルツハイマー病研究部 (室長)
 多田 敬典 国立長寿医療研究センター 統合加齢神経科学研究部 (室長)
 津田 玲生 国立長寿医療研究センター 創薬モデル動物開発室 (室長)

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD)における認知障害でもっとも重要な基盤となるシナプス障害を国風する目的で、AD発症と共に増大することが報告されている細胞外タウオリゴマーに着目し、その病態生理学的機能を明らかにするとともに、これが誘導するシナプス障害を標的とした創薬を行う。

ヒトのCSF解析で、AD発症と共にT22陽性タウオリゴマーが増量することも明らかとされた。かねてから、細胞外タウオリゴマーの毒性に関する研究は盛んに行われているものの、その作用機序が明らかにされることはなかった (表1参照)。我々のこれまでの研究成果により細胞外タウオリゴマーはNMDA型グルタミン酸受容体 (NMDAR)を直接刺激

表1. 最近の細胞外タウ種の研究 (一部)

Tau Species	Cells examined	Binding partner	Cellular response	Tau conc	References
High-MW TauO, (SEC separated)	Neurons, Neuronal Cells	Not identified	Uptake, Secretion	> 10 nM	Takeda et al. Nat. Comm. 6, 8490 (2015)
6H1-sensitive Low-n RDTauO	Neurons	Not identified	Synapse loss	>100 nM	Kanlyappa et al. Aiz. Dem. 13: 1270-1291 (2017)
T22-sensitive TauO	Neurons	Not identified	Impaired LTP, Uptake, Secretion	>100 nM	Cristen et al. Sci. Rep. 2 : 700 (2012)
Monomeric and oligomeric Tau	Non-neuronal,	Heparin	Uptake	>1 nM	Rauch et al. Sci. Rep. 8 : 6382 (2018)
Monomeric Tau	Neurons,	mAChR	Ca ²⁺ influx, Uptake	> 35 pM	Gómez-Ramos et al. Eur Neuropsychopharmacol. 19:708-17 (2009)

し、カルシウム流入、シナプスの抑圧、シナプス受容体の取り込み消失などを誘導する極めて毒性の高い物質であることがわかってきたが、これは初めてのタウオリゴマーの機能的 Binding partner の発見と言える。本年度は、この発見を創薬研究に転換すべく、タウオリゴマーとのNMDARとの相関解析をin-vitroで行い解析系を開発し、両者の関係を証明すると共に、タウオリゴマー/NMDAR相関という新たな創薬ターゲットに向けた創薬研究を開始した。

B. 研究方法

タウオリゴマーの作成および分画作成

タウオリゴマーおよびハロタグ標識タウオリゴマーの作成：大腸菌を用いてリコンビナントタウ (2N4R)を作成し、リン酸化誘導によりオリゴマーを形成した。詳しい説明は前年度報告書参照。

タウオリゴマーおよびハロタグ標識タウオリゴマーの精製：作成したタウオリゴマーおよびハロタグオリゴマー (以後単にタウオリゴマーとする) をゲル濾過カラム (SEC; HiPrep 16/60 Sephacryl S-500 HR) により分子サイズに応じて分画 (2 ml) し、得られた吸光度グラフに基づいて、High-MW TauO (大型タウオリゴマー)、Low-MW TauO (小型タウオリゴマー) およびモノマーとして画分プールを作成した。それぞれの画分プールは 100KDa,

30KDa および 10KDa のメンブレンフィルターを用いてシリアルに濃縮を行い、3つの異なるフィルター透過性をもつオリゴマーに分類された。

オリゴマー活性の In-vitro 検出

マウス脳由来膜分画の作成：18-22月齢のタウノックアウトマウスより大脳皮質を摘出し、これを5mlのHBSS（10%スクロース5%ヘパース緩衝液）中でホモジナイズし、600g遠心により細胞ゴミを取り除き（4°C, 15min）、さらに20000g遠心により細胞膜を含んだペレットを得た。得られた膜分画は一旦50mM Tris buffer 溶液（pH 8.0）（以降TB8.0）

に溶解し、再び、20000g遠心することで洗浄した。洗浄された膜分画は使用目的に応じて小容量に分けて、液体窒素にて急速凍結し、-60°Cにて保存した。

マウス脳由来細胞膜タンパクの抽出：凍結保存された膜分画より界面活性剤を用いることで4次構造を維持したタンパク集合体を得た。用いた界面活性剤はデオキシコール酸（DCA）、コール酸（CA）、DDM、MNG-3であった。それぞれの界面活性剤をTB8.0に溶解し（1%）、0.1%コレステロール（sigma）を加えた溶液を膜分画湿重量の50倍加えることでマウス脳由来膜タンパクの溶出を行なった（4°C 30min）。溶出後、膜タンパク分画を120,000gにて遠心し非可溶成分を取り除き、膜タンパク分画をえた。目的に応じて、界面活性剤を0.04%MNG-3へ置換した。

溶出膜タンパクを用いたタウオリゴマー活性計測：

1) Dot plot 法：溶出タンパク液を直接アセトニトリル膜にドットプロットし、これにタウオリゴマーを露出することで、膜タンパク結合を計測する方法。もっとも簡易であるが高濃度タウオリゴマー溶液では非特異結合が起きやすい傾向をもつ。詳しくは前報告書参考。

2) Blue-Native far-Western blot 法：溶出タンパク溶液に1%クマシーブルー溶液を加え0.01%に調整し、Blue-Native用ジェルにロード、電気泳動を行った。泳動後、ジェルに展開されたタンパク複合体をPMSD膜に電気的にトランスファーし（スタンダードなセミドライ法）、膜に付着したタンパクを再構成液（0.02%DDM in TBS pH7.4）で高次構造を再構成した。一方で、タウオリゴマー溶液を再構成液で1000-10000倍希釈し反応液を作成した。タウオリゴマーのタンパク接着能力と選択能力を調べるためには、膜タンパクを再構成した膜をタウオリゴマ希釈液に4-12時間浸し、再構成液にて十分に洗浄後、ハロタグ抗体（anti-Halotag, Promega；1:3000希釈）を用いてタウオリゴマーの付着タンパクを染色した。

3) Direct-coated ELISA 法：タウオリゴマーの膜結合能力の評価をより定量的に行うために、溶出膜タンパクを底面に固着したプレート（SUMIRON S96）を作成し、これに接着するタウオリゴマーの量をELISA法にて計測した。コーティングは0.004%MNG-3 TB8.0溶液にて50倍希釈した溶出タンパク液50μlを4°C1時間作用することで行った。30分のブロッキング（1%BSA TB8.0溶液）の後、タウオリゴマー溶液を適宜希釈し、4°C1時間作用した。繰り返し洗浄後、付着したタウ量をhalotag抗体を用いたELISA法にて定量した。

4) NMDAR-based-Sandwich ELISA 法：タウオリゴマーのNMDAR結合能力の評価をより定量的に行うために、抗NMDAR抗体をコートしたプレート（SUMIRON S96）を作成し、これによりNMDARを固相化した。NMDARと結合したタウの検出は上と同じ方法で行なった。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いた研究については、「動物の愛護及び管理に関する法律」に基づいた動物福祉規定に則り、実験動物の飼育・安楽殺・実験作業を遂行した。具体的には、動物を

飼育する場所・ケージ・管理方法に配慮し、可能な限り動物の使用数減少と被る苦痛の減退に努め、所属機関の動物実験規定を遵守して研究を行った。

C. 研究結果

1. 高い膜タンパク結合性を有するタウオリゴマーのスクリーニング

タウオリゴマーが NMDAR に生理的に作用すること、神経表面に付着したタウオリゴマーは物理的に NMDAR と相互作用を持つことをこれまでの実験結果が示している。さらに、タウオリゴマーと NMDAR との相互作用のあり方を調べる目的で、まず、細胞表面のタンパクと物理的相互作用を示すタウオリゴマー種をクルードに確定し、その後、これを手がかりにして NMDAR との相互作用を示すオリゴマーを推定することを目指した。

そのために、合成したタウオリゴマー溶液を SEC によって分画し、ピークごとの膜タンパク結合活性をクルードな膜タンパクを捕獲タンパクとしたドットプロット法で調べたところ、300-800kDa に出現するピークがもっとも強い活性を持つことがわかった。

高活性オリゴマーの精製と濃縮に最適な SEC とサイズ依存 t 透過フィルターとの組み合わせを検索した。SEC で分離した高活性タウオリゴマー含む 300-800kDa フラクシオンを 100kDa、30kDa、10kDa フィルターの組み合わせで分離し、どのフラクシオンがもっとも高い活性を示すのかを、Blue-Native far-western 法により検索した。

Blue-Native far-western 法では膜タンパクを未変性状態で分子集合体を維持したまま Blue-Native 法で電気泳動し、プロット後これを far-western 法に倣って適切なデタージェントで再構成することでより Native な状態に戻すことができる。そして、これにタウオリゴマーを作用しどのタンパクあるいはタンパク集合体に結合することができるのかを知ることが可能となる。結果としてはクルードなタウオリゴマーにおいても 1 GDa 前後の NMDAR 集合体の位置に該当する 2 つの細胞集合体を高い選択性を持って認識した。

このタウオリゴマー感受性集合体へのタウオリゴマー結合能力により、上述したフラクシオンを調べることで、高活性タウオリゴマーは 100kDa を通過し 30kDa でトラップされるフラクシオンにもっとも効率よく濃縮されることがわかった。次に、なぜタウオリゴマーが 100kDa フィルターを通過したのかという疑問に答えるために、100kDa フィルターを通過したフラクシオンと通過しなかったフラクシオン内のタウオリゴマーの状態を電子顕微鏡により確認したところ、しなかったものには大型の球状オリゴマー (>半径 20nm) が多く観察され、通過したものには短な繊維状オリゴマー (短径約 10nm) が観察され、この分画はサイズだけでなく形状に依存していることが示された。以上のことから、高い NMDAR 結合活性を持つオリゴマーはこの短繊維状オリゴマーと推察された。また、372 番目までのアミノ酸で構成された c 末欠損タウにより形成されたタウオリゴマーの NMDAR 結合を調べたところ明確な結合は検出されなかった。したがって、今年の報告と同様に NMDAR 作用の c 末依存性が確認された。(木村哲)

NMDAR ベース高活性タウオリゴマー検出システムの作成

これらの成果を受けて河合らは NMDAR ベース高活性タウオリゴマー検出 Elisa の作成を開始した。本実験の目的はタウオリゴマーと NMDAR 結合特性を定量的に調べることと、AD 患者由来の CSF に存在していると予想される高活性タウオリゴマーを検出し、新たなバイオマーカーとしての評価を行うことにある。溶出した膜タンパク全体を固相化した Direct-binding assay ではタウオリゴマーとの反応曲線は少なくとも 2 つのシグモイドで構成されていること、すなわち、2 つ以上の結合対象を持つことが示された。驚くべきことに、そのうち 1 つは femtoM 程度の濃度で結合することが可能であった。また、NMDAR を抗体によって固相化したプレートを用いて、femtoM 程度の濃度 (タウ濃度) の高活性タウオリゴマーを NMDAR は検出し結合することが明らかとなり、複数想定される膜タンパ

ク中のバインディングパートナーの1つはNMDARと推定された。今後このシステムを用いてタウオリゴマー/NMDAR結合特性を解明し、それを修飾する化合物のスクリーニングを行う予定である。(河合、木村哲)

化合物スクリーニングを目指したタウオリゴマー/NMDAR結合様式解明

これまでに高活性タウオリゴマーはNMDARをターゲットとして、それに直接結合することが示されてきた。昨年の研究結果は高活性タウオリゴマーはNMDARの構造変化を直接誘導することを示しているが、今回発見した高活性タウオリゴマーとNMDARとの結合がどのようにそのチャンネル開閉と関わるのかは明らかにされていない。これを知るためにはまず両者の結合部位を明らかにし、次に、その結合がNMDARのチャンネル構造に与える影響を明らかにする必要がある。これらのことに配慮し、クライオEMによる結合様式解明を目指して、タウオリゴマー/NMDAR複合体およびこれを構成するNMDARおよびタウオリゴマーの高純度溶出方法を検討した。

まず、高活性タウオリゴマーをビーズに結合し、さらに、溶出した膜タンパクを作用し複合体を形成した。このビーズ上で形成された複合体にアルカリンフォスターゼを作用し、強制脱リン酸化を行ったところ、タウオリゴマーに結合したNMDAR複合体のが分離・溶出することが明らかとなった。これにより、オリゴマー結合能力を持つNMDAR複合体の回収が可能となった。また、ビーズ上で形成された複合体はTEVプロテアーゼでハロタグと分離できるために、これも生理条件で回収可能である。また、溶出液のデタージェント構成を検討し、これらの複合体のSEC分離も可能となった。さらに、上の研究によって、複数ある結合様式をタウオリゴマー濃度を調整することで1つに絞り込むことが可能となり、構造解析の準備がととなった。令和元年度にEM解析を行う予定としている。

さらに、本研究成果は新たな創薬ターゲットとして細胞外に存在するフォスフォターゼの活性制御を提案する。(木村哲)

タウオリゴマー機能を拮抗抑制するペプチドのスクリーニング:

タウオリゴマー/NMDAR相関を抑制するペプチドのスクリーニングを東京大学理学部菅教授と共同で開始した。スクリーニングにはRAPIDシステムを用い、10¹¹種類のペプチドライブラリーから選択が行われる。このスクリーニングを実行するために、上述した高活性タウオリゴマーの精製濃縮方法を確立し、その機能的カウンターとしてC末の無い多タウ(tau372)を作成しオリゴマー化した。現在、スクリーニングを行なっている。

また、タウオリゴマーC末の機能と結合部位を明らかにするために、タウオリゴマーC末を認識する抗体群を作成し、これを用いてタウオリゴマーC末の機能マップを作成する作業も開始している

一方で、NMDAR側の結合部位を明らかにする目的で、NMDARで知られている結合ペプチドや化合物がタウオリゴマー/NMDAR結合に与える影響を調べている。現在までにプレリミナリーであるがタウオリゴマー/NMDAR結合を拮抗阻害するペプチドを見出し、NMDAR側の結合部位が推定されつつある。(河合)

タウオリゴマー作用機序の生理学的・細胞生物学的解析

これまでの研究により、タウオリゴマーがNMDARに極低濃度で結合することは間違いなく、これによりNMDARが活性化する可能性も高い。しかしながら、タウオリゴマー結合がNMDARのチャンネル特性に与える影響を直接調べた研究はなく、本実験ではこれを目指す。本年度はチャンネル解析に用いる機能的NMDARを発現したHEK細胞の作成と解析を行った。HEK細胞でNR1サブユニットおよびNR2Bサブユニットの発現を同時に行うことで機能的NMDAR複合体が形成されるが、NMDAR自身の毒性により短期間に制御された発現を行った。発現制御にはエクディステロイドによって誘導されるシステム

(Complete Control Inducible Mammalian Expression System, Agilent)を用いそれぞれのサブ

ユニットの同時発現を行った。結果としては、機能的 NMDAR 複合体が形成され、その膜溶出画分を用いた Blue-Native far-Western blot 法により、形成された複合体はタウオリゴマー結合能を有していることを確認した。また、解析に必要なパッチクランプ解析システムの立ち上げを行った。(木村展、多田)

個体レベルでの薬剤評価システムの作成:

用いたヒトタウオリゴマーは 2N4R タウで形成されており、0N4R を基調とするマウスと区別可能であり、先に用いた方法(Kimura et al 2017 参照)に従ってそのオリゴマー化は解析できる。2 により使用するタウオリゴマーが確定され次第、タウオリゴマーの海馬への物理的インジェクションを行い、シナプス抑圧および再帰的タウオリゴマー増量が起こるか否かを明らかにし、さらに、3 または 4 で中小化合物薬剤が同定された場合、各薬剤のタウオリゴマーのインジェクション効果(シナプス保護、オリゴマー形成抑止など)に与える影響を評価し、行動試験も加えることでそれぞれの安全性を吟味する。ここで良好な結果が得られた場合はライセンスアウトを検討する。本実験に必要なものは加齢マウスであり、本年度は加齢タウノックアウト、加齢 hTau Tg マウス、加齢野生型マウスの準備のみを行った。来年度は、既に、毒性に問題があるもののタウオリゴマー-NMDAR 複合体の形成を阻害するペプチドを見出しており、これの *in vivo* 試験を開始する予定である。(津田)

D. 考察と結論

本研究が明らかにしたことは、ある種のタウオリゴマーは細胞外より NMDAR に直接働きかけることで、NMDAR-LTD カスケードを起動し、シナプスの長期的な抑圧を起こすことである。タウの解析ではその C 末構造がこの反応に重要な役割を持ち、タウがリン酸化されていることが必要であることが明らかとなった。前年度の解析で、タウ C 末構造のリン酸化の重要性を指摘したが、本年度の実験結果はそれを支持する内容と言える。一方で NMDAR 側の結合部位解析ではプレリミナルではあるが、NMDAR のグルタミン酸結合部位がオリゴマーの認識部位である可能性が示されつつあり、これも昨年度に報告した(同じ部位の拮抗阻害剤である) AP5 のカルシウム応答抑制効果を支持する。

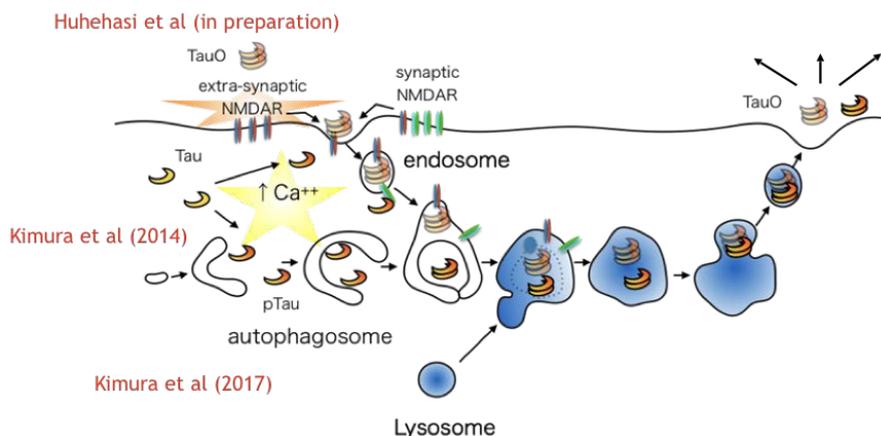
私たちが示してきた実験結果は神経ネットワークレベルからタンパクレベルまで全く同じ結論を導く。そして、その結果はこれまでに報告されてきたタウオリゴマーの研究において非常にユニークなものと言える(表 2 参照)。1 つには強制的にリン酸化しオリゴマー化を誘導するという比較的古い方法でオリゴマー生産を行ったことに他との違いが起因する。多くの実験ではヘパリン誘導タウ重合体が使われているが、最近示されたようにこの重合体は AD 由来の重合体と構造が異なる。我々は AD 由来のタウオリゴマーの機能を模倣するタウオリゴマーを生産する方法として現在の方法を選び、このヘテロなタンパク種プールを機能的に分類することで新たな病的タウ種の発見に至ったといえる。発見した新たな病的タウ種、リン酸化された小型オリゴマー、は驚くべき NMDAR 選択性と感度を示した。タウオリゴマーを用いた多くの実験が非生理濃度といえる濃度帯域を用いた結果であり、このことも我々の結果のユニークさおよび妥当性を示している。

表 2. 最近の細胞外タウ種の研究と本研究の成果

Tau Species	Cells examined	Binding partner	Cellular response	Tau conc	References
High-MW TauO, (SEC separated)	Neurons, Neuronal Cells	Not identified	Uptake, Secretion	> 10 nM	Takeda et al. Nat. Comm. 6, 8490, (2015)
6H1-sensitive, Low-n RDTauO	Neurons	Not identified	Synapse loss	>100 nM	Kanlyappa et al. Alz. Dem. 13: 1270-1291 (2017)
T22-sensitive TauO	Neurons	Not identified	Impaired LTP, Uptake, Secretion	>100 nM	Cristen et al. Sci. Rep. 2 : 700 (2012)
Monomeric and oligomeric Tau	Non-neuronal,	Heparin	Uptake	>1 nM (binding)	Rauch et al. Sci. Rep. 8 : 6382 (2018)
Monomeric Tau	Neurons,	mAChR	Ca ⁺⁺ influx, Uptake	> 35 pM	Gómez-Ramos et al. Eur Neuropsychopharmacol. 19:708-17
Low-MW pTauO	Neurons	NMDAR	Ca ⁺⁺ influx, LTD (loss of AMPARs NMDARs), Uptake	> 1 fM (binding)	This study

我々の実験結果のユニークな点は、タウオリゴマーによる NMDAR の刺激という発見そのものにある。NMDAR は脳における記憶形成保持機構の中心をなす分子機械と考えられており、神経同士の活動の同期性を検出し記憶することがその大きな機能とされる。理論的にはタウオリゴマーによる神経活動と同期しない NMDAR 活性化はそのまま記憶認識ネットワークの破綻を導くと考えられ、AD における記憶システムの混乱を直接説明する。実際、この分子機械の失調は多くの神経疾患の原因にあげられている。

さらに、我々は NMDAR-LTD カスケードの 1 部に細胞内タウが組み込まれていることを示し、さらに、カスケードの活性化はタウのリン酸化および（加齢脳では）オリゴマー形成を誘導することを示してきた。従って、細胞外タウオリゴマーはシナプスの抑圧を行いながら、新たなタウオリゴマーの形成を誘導する能力を持つことになる（図 1 参照）。最近のタウ重合体の拡散研究によって、細胞内に取り込まれたあるいは細胞内で形成されたタウ重合体の一部は細胞外に放出され細胞外タウ種となることが明らかにされており、我々が見出した細胞外タウオリゴマーによる生理的タウオリゴマー形成現象も、このタウ



重合体拡散に寄与している可能性がある。

最近になって、ヒト CSF でタウオリゴマーが AD 発症と共に増大することが報告された。残念ながら発見されたタウオリゴマー種に我々が見出した高活性オリゴマーが含まれるかどうかは結論できない。ただ、発見されたオリゴマーは C 末構造を持つことは確認されており十分な可能性が期待できる。現在、作成した NMDAR ベース ELISA システムでヒトの CSF 解析を行う準備をしている。報告ではヒト CSF におけるタウオリゴマーは AD 患者で 10pg/ml 以上検出される。本研究によると 0.1pg/ml 程度の濃度で高活性タウオリゴマーは NMDAR に結合できる。従って、高活性タウオリゴマーが CSF にあった場合、極低濃度であっても、その高いアフィニティーにより確実に NMDAR と安定に結合していると考えて良い。ところで、NMDAR のチャンネル部分には普段マグネシウムがトラップされカルシウムをゲートしているために、グルタミン酸などのリガンドが結合したとしても、NMDAR を発現する細胞自身が強く興奮（脱分極）しマグネシウムを排除しない限りカルシウムは流入ができない。従って、理論的には、細胞が（何らかの原因で）興奮するまで細胞表面の NMDAR 群にタウオリゴマーが蓄積され続けることになる。そして該当細胞が興奮した時にタウオリゴマーが作用状態にある NMDAR に（シナプス活動と無関係な）過剰なカルシウムが流入が起き、細胞にとって想定外のシナプス挙動あるいは細胞応答が誘導されるかもしれない。このように高活性タウオリゴマーと NMDAR の組み合わせは極低濃度であっても十分に作用できる可能性を持つ。重要なことに、このメカニズムはタウオリゴマー自身の集積メカニズムとなっており、これが細胞に与える影響も興味深い課題といえる。今後、パッチクランプ法や分子トラッキングの技術を用いてこの仮説を検証しつつ、極低濃度タウオリゴマーの誘導するシナプスあるいは細胞毒性の実態を明らかにする予定である。

本研究が提案するより具体的な創薬方針として以下に 3 つの方法がある。

- 1) タウオリゴマーと NMDAR との結合部位のタウ側を認識して結合を阻害する化合物の開発（東大菅先生との共同研究として実施中）。
- 2) タウオリゴマーと NMDAR との結合部位の NMDAR 側を認識して結合を阻害する化合物の開発（自主研究として実施中）。
- 3) 細胞外フォスホターゼの活性化によるタウオリゴマーの脱リン酸化を誘導する化合物の開発（新規提案）。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

論文発表（主任研究者）

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

論文発表（分担研究者）

1. Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y, Kimura N. Elevated Membrane Cholesterol Disrupts Lysosomal Degradation to Induce β -Amyloid Accumulation: The Potential Mechanism Underlying Augmentation of β -Amyloid Pathology by Type 2 Diabetes Mellitus. *Am J Pathol*, 189(2): 391-404 doi: 10.1016/j.ajpath.2018.10.011. (2019).
2. Kimura N. Type II Diabetes mellitus accelerates age-dependent A pathology in cynomolgus monkey brain. *Diabetes Mellitus: A risk factor for Alzheimer disease ? Springer (Edited by Dr. Yusaku Nakabeppu)*, 2018.
3. Kimura N, Yanagisawa K. Traffic jam hypothesis: the relationship between endocytic dysfunction and Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* 2017; S0197-0186: 30249-8
4. 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 2017; Vol.35 No.12 「認知症 発症前治療のために解明すべき分子病態は何か？」
5. Yamasaki Y, Tsuda L, Suzuki A, Yanagisawa K. Induction of ganglioside synthesis in Drosophila brain accelerates assembly of amyloid β protein. *Scientific reports* 2018; 8: 8345
6. Abe H, Jitsuki S, Nakajima W, Murata Y, Jitsuki-Takahashi A, Katsuno Y, Tada H, Sano A, Suyama K, Mochizuki N, Komori T, Masuyama H, Okuda T, Goshima Y, Higo N, Takahashi T. CRMP2-binding compound, edonergic maleate, accelerates motor function recovery from brain damage. *Science* 2018; 360: 50-57

学会発表（主任研究者）

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

学会発表（分担研究者）

1. Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y. Elevated membrane cholesterol disrupts lysosomal degradation, leading to enhanced A β accumulation: a potential mechanism underlying exacerbation of A β pathology by type 2 diabetes mellitus. ADPD2019, 2019 年 3 月 29-30 日, Lisbon (Portugal)
2. Ishiguro A, Kimura N, Noma T, Kon T. Molecular mechanisms of interaction between ALS causative proteins and an RNA G-quadruplex. 第 41 回日本分子生物学会 2018 年 11 月 28 日 神奈川県横浜市
3. Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y. Elevated membrane cholesterol aggravates endocytic disturbance, resulting in enhanced A β accumulation: a potential mechanism underlying exacerbation of A β pathology by type 2 diabetes mellitus. Society for Neuroscience 2018, 2018 年 11 月 4 日, San Diego (USA)
4. 木村展之, 竹内真吾, 上田直也, 鈴木恵子, 下澤律浩, 保富康弘. 2型糖尿病による A β 病理増悪化機構：膜コレステロール増加とエンドサイトーシス障害. 第 37 回日本認知症学会 2018 年 10 月 13 日 北海道札幌市
5. 木村展之, 竹内真吾, 上田直也, 鈴木恵子, 下澤律浩, 保富康弘. 膜コレステロールの増加はエンドサイトーシス障害を増悪化する：2型糖尿病による A β 病理増悪化メカニズ

- ムの解明. 第 91 回日本生化学会 2018 年 9 月 25 日 京都府京都市
6. Kimura N, Takeuchi S, Ueda N, Suzuki K, Shimozawa N, Yasutomi Y. Type 2 diabetes mellitus aggravates endocytic disturbance via elevated membrane cholesterol: mechanism underlying augmentation of age-dependent A β pathology. 第 61 回日本神経化学会 2018 年 9 月 7 日 兵庫県神戸市
 7. Kimura N, Endo K, Kondo H, Adachi E, Shimozawa N, Yasutomi Y, Uchihara T. Age-Related Tau Pathology in Cynomolgus Monkey brain. 第 41 回日本基礎老化学会 2018 年 6 月 1 日 東京都葛飾区
 8. 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)
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
 13. 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)
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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)
 18. Tada H. Chronic Isolation Stress Causes Social Cognitive Impairment by Altering Synaptic Plasticity in Rat Medial Prefrontal Cortex. 第 41 回日本基礎老化学会大会、2018 年 6 月 1 日(東京都)
 19. Tada H. Chronic Isolation Stress Causes Social Cognitive Impairment by Altering Synaptic Plasticity in Rat Medial Prefrontal Cortex. The Fourth ICAH-NCGG Symposium. 2018 年 5 月 10 日(Taiwan)
 20. Tsuda L. Chemical genetic approach to evaluate the toxicity of amyloid-beta using mouse and Drosophila. Asian Society for Aging Research Symposium. Republic of Korea, April 19, 2018.
 21. 津田玲生、新規モデル動物を用いたアルツハイマー病治療薬の開発. 医学生物学電子顕微鏡技術学会第 34 回学術講演会ワークショップ、東京、5 月 18 日、2018

22. Minami R, Lim Y-M, Tsuda L. Analysis of neuronal dysfunction mechanism common to dementia and senile deafness. 第 41 回日本基礎老化学会大会、5 月 31 日、2018

23. 津田玲生、Molecular commonarities between auditory hair cells and neurons in the study of age-related neuronal disorder、第 51 回日本発生物学会年会ワークショップ、東京、6 月 8 日、2018

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 河合昭好、呼和哈斯、木村哲也 「タウオパチーの治療薬または予防薬のスクリーニング方法」(特願 2018-206594)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし