

151. ヒト脳内でタウの蓄積をもたらす分子機序の解明

篠原 充

国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部

Key words : アルツハイマー病, タウ, 加齢, 剖検脳

緒言

世界的にも類をみないほどの早さで高齢化が進む日本では、2017年において500万人以上が認知症を有し、今後もその数は増大すると想定されており、その社会的対策は急務である。アルツハイマー病（AD）は認知症の半数以上を占めるが、その大部分は孤発性であり、原因は十分には分かっていない。AD患者脳内の主蓄積物質であり、原因とされるアミロイドβ（Aβ）を標的とした薬剤が臨床試験中であるが、少なくとも発症してからではあまり効果がないのではということがコンセンサスになりつつあり、もう1つの主蓄積物であるタウの役割も含め、さらなる病態の理解が求められている。

Aβとタウは、加齢に伴いそれぞれ独立して蓄積する。特にAβ（老人斑）が優位に蓄積した場合を老人斑優位型（Pathological Aging: PA）、タウ（神経原線維変化）が蓄積した場合を原発性加齢性タウオパシー（Primary age-related tauopathy: PART）と称す [1, 2]。それぞれの機序を捉えることが、ADのみならず高齢者の認知機能障害を理解する上で重要であり、また病態、病因に根ざした創薬開発が可能となる。

Aβとタウが蓄積する部位には特徴があり、Aβが脳新皮質を中心に蓄積するのに対し、タウは辺縁系や側頭葉を中心に蓄積する（図1）。このような領域（空間）特異性は、病態理解に大きな手がかりとなる。我々は、このことに着目し、健常人、PAおよびAD患者の剖検脳を用いて、脳内のAβと、Aβの代謝もしくは神経変性に関する分子の領域分布を独自の方法にて検討、比較し、Aβ蓄積をもたらす結果のみならず、Aβ蓄積の原因を理解する上で重要な鍵となる発見を複数報告してきた [3~8]。この独自の手法を生かし、分子レベルでAD発症に繋がる病態を解明し、治療法の開発につなげることが今後の我々の使命と考えている。

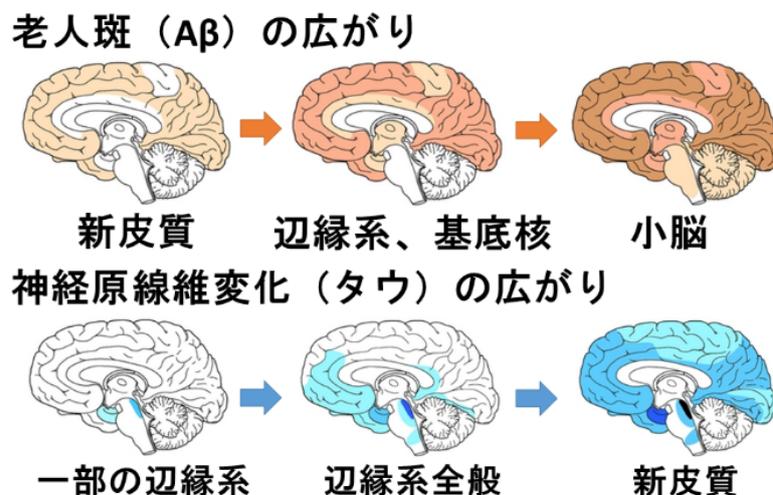


図1. Aβとタウの脳内の領域分布

方法

我々のこれまでの研究では主にA β に着目してきたが、本研究では、さらにタウに大きく着目する。そのために従来解析してきた健常人とPAおよびAD患者のみならず、新たにPARTの剖検脳も解析対象にするとともに、これまで解析してきた12領域に加え、タウの蓄積が病態初期から認められる、もしくは病態後期まで認められにくいとされる領域を新たに追加し、12+ α 領域を解析する。それら病態の異なる被験者の各脳領域での、A β とタウおよびタウの代謝に関与すると考えられる分子、シナプスや炎症などの神経変性に関係する分子の発現量を、ELISA測定系を中心に定量し、発現量の病態間の比較のみならず(図2-1)、各分子の領域分布を群内もしくは群間で比較することで(図2-2)、タウの蓄積が神経変性にどのような影響を与えるのかとともに、何故タウが蓄積するのかについても分子的理解をすすめることを目的とする。またELISA測定系などを用いた候補分子を対象とした解析では解析できる分子が限られることから、公共データベースの解析や我々自身による網羅的遺伝子発現解析などのオミクス解析により、タウの蓄積と時間的、空間的に相関する新規分子の同定も進めるとともに、細胞培養系やマウスを用いて、同定された遺伝子や経路の関与を実証する。最終的にはAD発症に至る分子的なプロセスを統合的に理解するとともに、新規標的を明らかにし、創薬開発につなげることを目標とする。

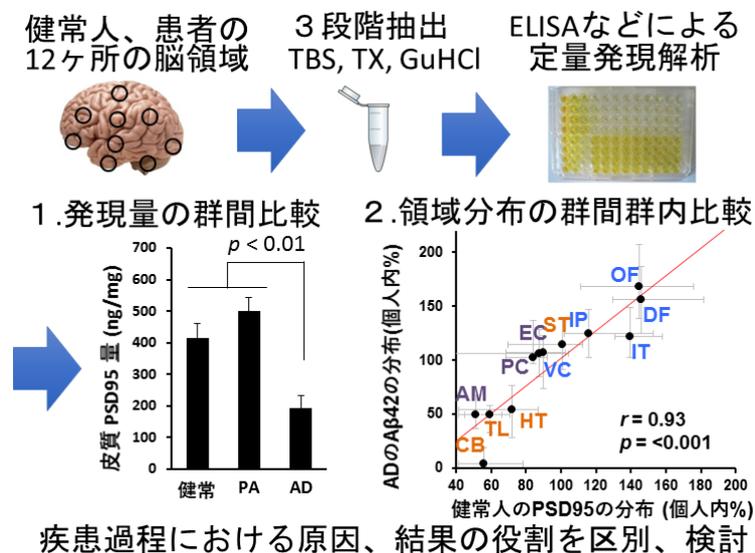


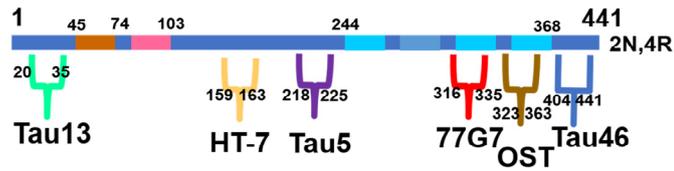
図2. 本研究の解析方法 (Shinohara et al, Brain 2017 より改変)

結果および考察

1. タウやタウの代謝に関与する分子に対するELISAの開発

脳内のタウ蓄積を正確に評価するために、様々なエピトープに対する抗タウ抗体を組み合わせた10種類以上のELISAを開発した。それら開発したELISAを用いて、剖検脳の不溶性画分に対する反応性を検討すると、特にタウの中間~C末端部位に反応するELISAが最も、AD患者で増加することが判明した(図3)。

さらに、多数の検体(前頭葉領域)を用いると、そのような反応性の高いELISAはBraak stageと最も相関することが判明した(data not shown)。タウの代謝に関与するとされる分子のELISAの開発、導入も行った。



検出/捕捉	Tau13	HT7	Tau5	77G7	OST
Tau13					
HT7					
Tau5					
77G7					
Tau46					

図3. 様々なエピトープ部位の抗体を組み合わせるによるタウ ELISA の開発、検証

2. ヒト剖検脳の入手について

東京都健康長寿医療センターの村山繁雄部長らとの綿密な協議の結果、東京都健康長寿医療センターから送られた脳検体を、国立長寿医療研究センターのクリオスタット内で14か所の領域部位を切り出すことになった。現在までに健常者、PA、PART、AD患者の4群各3名 = 合計12名の剖検脳検体入手、国立長寿医療研究センターにて凍結保管している。解析に必要な検体の入手を引き続き行っている。

3. 公共データベースの活用による、タウの領域分布と相関する分子の同定

Allen Brain Atlas のデータベースで公開されている健常人の2万個以上の遺伝子の mRNA レベルでの発現の領域分布のデータを基に、我々が得た高齢者の辺縁系を中心とするタウの蓄積の領域分布と相関する遺伝子を探索した結果、126 遺伝子が正に相関し ($r \geq 0.7$)、76 遺伝子が負に相関している ($r \leq -0.7$) ことが分かった。ここから、さらに加齢で変化する遺伝子をデータベースから検索したところ、計17 遺伝子に絞られた。

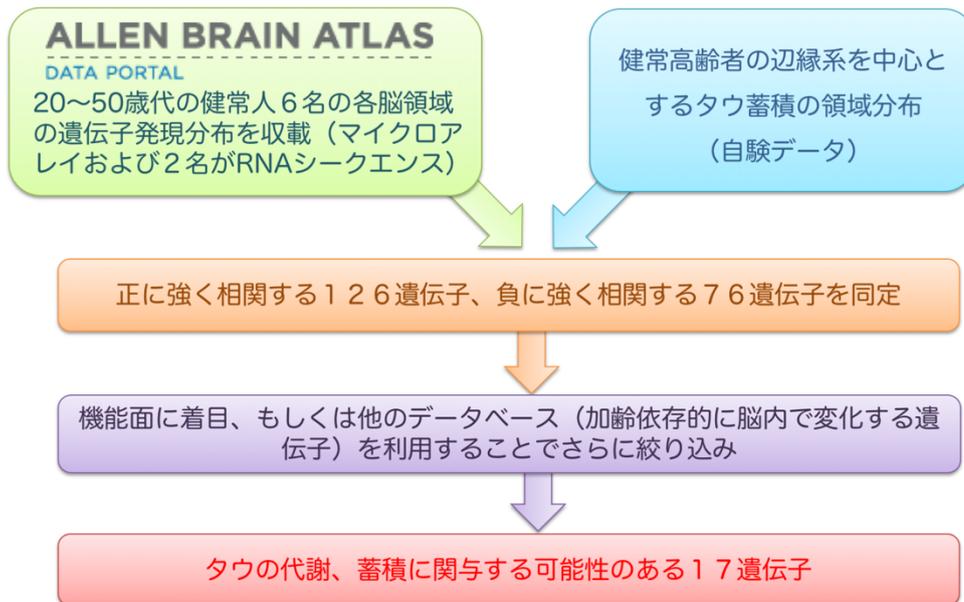


図4. 公共データベースを利用したタウの蓄積に関与する可能性がある遺伝子の絞り込み

4. 同定した分子の蛋白質レベルでの検証

17 遺伝子の中でも発現量が特に多いことが示唆される 2 つの遺伝子 X と遺伝子 Y (仮名) について、さらなる検証をおこなった。遺伝子 X については市販 ELISA を用いて脳検体 (前頭葉領域) でのタンパクレベルの測定を試みたが、有意なシグナルは得られず検出が難しいと分かった。そこでウェスタンブロッティング (WB) を行ったところ、想定される大きさにバンドは検出されたが、健常人と AD 患者で大きな違いは認められなかった。一方で、遺伝子 Y についてはウェスタンブロッティングによる検討で、健常人に比べて AD 患者の脳内で有意に増加していることが判明した (図 5)。

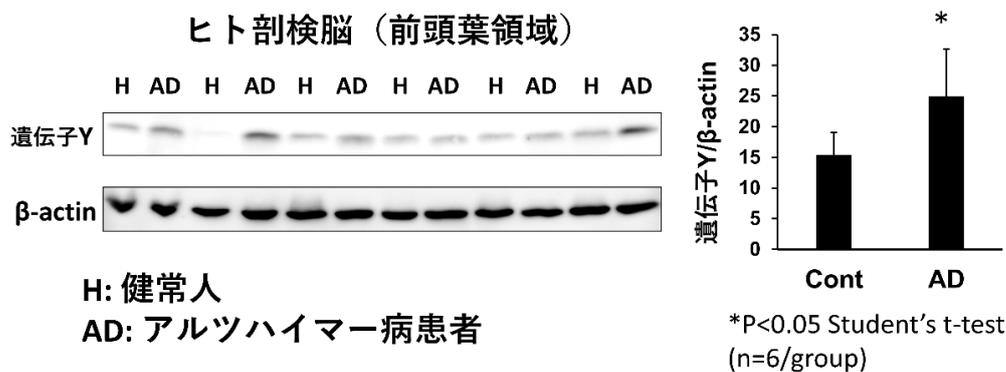


図5. 遺伝子 Y の脳内発現についての蛋白質レベルでの検証

考 察

本研究は我々独自の解析手法を利用してタウの蓄積機序を理解するために、新たに剖検脳や解析手法を導入、開発することから開始した。1 年という限られた期間ではあったが、ある程度の成果を得ることはできた。特にタウ ELISA の開発については、論文投稿の目処がついた。本研究助成終了後も引き続き本プロジェクトを継続し、公共データベースの利用により同定した遺伝子 Y の検証を進めるとともに、我々自身の網羅解析データによる新規遺伝子の同定を行い、細胞、動物モデルなども導入しつつ、脳内におけるタウの蓄積機序の理解に迫り、認知症の治療薬開発を目指したい。

共同研究者・謝辞

剖検脳を解析するにあたり、検体を供与いただいている東京都健康長寿医療センター、高齢者ブレインバンクの村山繁雄部長、森島真帆研究員、ならびに被験者とそのご遺族の方に謝辞を申し上げます。

文 献

- 1) D. W. Dickson, H. A. Crystal, L. A. Mattiace, D. M. Masur, A. D. Blau, P. Davies, S. H. Yen, M. K. Aronson. Identification of normal and pathological aging in prospectively studied nondemented elderly humans. *Neurobiol Aging*, 13(1):179-189, 1992 DOI: 10.1016/0197-4580(92)90027-u
- 2) Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, Abisambra JF, Abner EL, Alafuzoff I, Arnold SE, Attems J, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, Gearing M, Grinberg LT, Hof PR, Hyman BT, Jellinger K, Jicha GA, Kovacs GG, Knopman DS, Kofler J, Kukull WA, Mackenzie IR, Masliah E, McKee A, Montine TJ, Murray ME, Neltner JH, Santa-Maria I, Seeley WW, Serrano-Pozo A, Shelanski ML, Stein T, Takao M, Thal DR, Toledo JB, Troncoso JC, Vonsattel JP, White CL 3rd, Wisniewski T, Woltjer RL, Yamada M, Nelson PT. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathologica*, 128(6):755-766, 2014 DOI: 10.1007/s00401-014-1349-0
- 3) M. Shinohara, G. Bu. What can we learn from regional vulnerability to A β accumulation in non-demented individuals? *Neurodegenerative disease management*, 3(3): 187-189, 2013 DOI: 10.2217/nmt.13.20
- 4) M. Shinohara, R. C. Petersen, D. W. Dickson, G. Bu. Brain Regional Correlation of Amyloid- β with Synapses and Apolipoprotein E in Non-Demented Individuals: Potential Mechanisms underlying Regional Vulnerability to Amyloid- β Accumulation. *Acta Neuropathologica*, 125(4): 535-547, 2013 DOI: 10.1007/s00401-013-1086-9
- 5) M. Shinohara, S. Fujioka, M. E. Murray, A. Wojtas, M. Baker, A. Rovelet-Lecrux, R. Rademakers, P. Das, J. E. Parisi, N. R. Graff-Radford, R. C. Petersen, D. W. Dickson, G. Bu. Regional Distribution of Synaptic Markers and APP Correlate with Distinct Clinicopathological Features in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *Brain*, 137(5): 1533-1549, 2014. Selected as Editor's choice DOI: 10.1093/brain/awu046
- 6) M. Shinohara, M. E. Murray, R. D. Frank, M. Shinohara, M. DeTure, Y. Yamazaki, M. Tachibana, Y. Atagi, M. D. Davis, C. C. Liu, N. Zhao, M. M. Painter, R. C. Petersen, J. D. Fryer, J. E. Crook, D. W. Dickson, G. Bu, T. Kanekiyo. Impact of sex and APOE4 on cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*. 132(2):225-234, 2016 DOI: 10.1007/s00401-016-1580-y
- 7) M. Shinohara, S. Koga, T. Konno, J. Nix, M. Shinohara, N. Aoki, P. Das, J. E. Parisi, R. C. Petersen, T. L. Rosenberry, D. W. Dickson, G. Bu. Distinct spatiotemporal accumulation of N-truncated and full-length amyloid- β 42 in Alzheimer's disease. *Brain*, 140(12):3301-3316, 2017 DOI: 10.1093/brain/awx284
- 8) Y. Yamazaki, M. Shinohara, M. Shinohara, A. Yamazaki, M. E. Murray, A. M. Liesinger, M. G. Heckman, E. R. Lesser, J. E. Parisi, R. C. Petersen, D. W. Dickson, T. Kanekiyo, G. Bu. Selective loss of cortical endothelial tight junction proteins during Alzheimer's disease progression. *Brain*, 143(4):1077-1092, 2019 DOI: 10.1093/brain/awz011