

アルツハイマー病研究チーム

Laboratory for Alzheimer's Disease

チームリーダー 高島明彦

TAKASHIMA, Akihiko

アルツハイマー病は脳血管性痴呆と並ぶ代表的な老人性痴呆疾患の1つである。この病気は進行に伴って記憶認知障害を引き起こし末期には高度の痴呆状態となる。高齢化時代を迎えた現在、アルツハイマー病を含めて老人性痴呆症疾患の成因解明と治療法の確立は社会的に重要な問題である。当研究チームでは：(1) 痴呆症の原因となっている神経変性、すなわち神経細胞死や神経原線維変化の成因について、 β -アミロイド、タウ、プレセニリンのキーワードから研究を行い動物モデルを作製すること。(2) この動物モデルを用いて治療法確立へ向けて検討を行うこと。さらに(3) 老人性痴呆症を引き起こす素過程としての脳老化の実体を明らかにし、その分子機構の解明を目的とする。

1. アルツハイマー病発症機構

(1) アミロイド生成機序： $A\beta$ と細胞毒性（石塚，村上，佐原，村山，朴，中尾，溝呂木，山下，下條，高島）

$A\beta$ が細胞毒性を示すためには凝集体を形成する必要がある。この凝集体の性質を明らかにするため、試験管内で $A\beta$ 40をインキュベートし $A\beta$ モノマー，ダイマー，オリゴマー， β シート構造を持つ線維をゲル濾過高速液体クロマトグラフィーによって分画することができた。それぞれの分画から同じ濃度の $A\beta$ を準備し培養細胞に添加した結果，線維構造のものが最大のMTT低下を示した。さらに，それぞれをAFMによって観察すると，毒性を示す線維は1nm径の細い線維であることが明らかになった。また生化学的性質を調べたところ繊維化によって等電点がモノマーよりも酸性側にシフトしていることが明らかになった。これらのことをふまえ，いわゆるプロトフィブリルと呼ばれるアミロイド線維における毒性機構を調べた。線維化によって等電点が酸性側にシフトし細胞膜により結合しやすくなり，線維が細胞膜上を覆うことで細胞外からのシグナルが遮断されている，すなわち，神経細胞ではシナプス領域に結合することによってシナプス間のシグナルが妨害され，神経毒性を引き起こしている可能性が考えられた。

(2) 神経原線維変化形成から神経細胞死（崔，佐原，村山，朴，中尾，溝呂木，山下，高島）

神経原線維変化はリン酸化されたタウタンパクが細胞内で繊維状構造物として蓄積したものであり，アルツハイマー病をはじめ痴呆症を伴う神経変性疾患に共通に観察される。従って神経原線維変化の形成機序を明らかにすることでアルツハイマー病における神経細胞死機構を明らかにし，治療法を示すことをこの研究の目的としている。これまで我々は神経原線維変化を呈するタウトランスジェニックマウスの作成に成功し，これらを用いて β アミロイドによりGSK-3 β の活性化，シナプス消失，神経脱落が起こることを見いだした。本年度は，CHIPがタウタンパクのユビキチンリガーゼとして働き，タウタンパクをユビキチンプロテアソーム系によって効率よく分解することを解明した。さらにP301Lを発現する安定細胞株はベクターだけの細胞と比べて細胞ストレスに対して脆弱であるのだが，CHIPを高発現する

と不溶性タウの減少とともに脆弱性は対照レベルまで回復することが示された。すなわち，不溶性タウとストレスに対する細胞の脆弱性には関連が見られ，CHIPは不溶性タウの出現を抑制することが明らかになった。一方タウタンパクの繊維化機構の詳細はこれまで明らかになってこなかった。in vitroでのタウ凝集過程を原子間力顕微鏡を用いて溶液中で詳細に検討した結果，タウは繊維化する前に5個以上のタウ分子からなる球状の凝集中間体を作り，それらが連結してPHFと呼ばれるタウ繊維を形成することが明らかになった。ヒト脳から精製したタウ線維凝集中間体はすでにサルコシル不溶性であり，PHFタウ同様過剰にリン酸化していた。この中間体はAD脳とくらべてはるかに少量ではあるが正常脳でも見いだすことができた。このことは正常脳においても中間体形成が起きており，それを代謝する機構，例えばCHIPなどによって代謝され線維形成が抑制されている可能性を示唆するものといえよう。

(3) アルミニウムによるアルツハイマー病発症機構（佐原，村山，前田，高島）

(i) タウ重合におけるアルミニウムの影響

タウタンパクをポリアニオンなどとともにインキュベーションすると，タウは β シート構造を持つ凝集線維を形成する。これはアルツハイマー病等で見られるPHFと同様のものである。この条件下でAlを0.2mMから20mMまでの濃度範囲でインキュベーション溶液に加え，チオフラビンの蛍光測定を行った。1mM以上のアルミニウムの添加はチオフラビン蛍光増大を完全に阻害した。この原子間力顕微鏡観察では明らかなタウ線維の減少が観察された。次にアルミニウムそのものがポリアニオンのようにタウの繊維化を促進するかどうかを測定した。ヘパリンなしでタウを0.2mMから20mMまでの濃度範囲でAlインキュベートしチオフラビン蛍光を測定したが，全く増大を示さなかった。しかし原子間力顕微鏡ではタウの構造物を観察することができた。これらの構造物は一定の形態を示さずむしろアモルファス凝集体を形成すると考えられた。すなわち，アルミニウムはタウの β 結合による繊維化を阻害しアモルファス凝集を増大させることが示された。

(ii) 細胞モデルにおけるアルミニウムの効果

細胞を 0~200 μ M のアルミニウムマルトールで処理し SDS 不溶性タウの形成能を調べた。タウを発現する細胞では 50 μ M アルミニウムで不溶性タウの出現が観察された。CHIP を同時に発現する細胞ではアルミニウム濃度の増大とともに SDS 不溶性タウの量が減少した。これは、アルミニウムによってアモルファスタウ凝集体が SDS 不溶性タウとして生じるが、CHIP、プロテアソーム分解系で容易に分解されるためアルミ濃度の増大とともに生じるアモルファス凝集が分解されるため SDS 不溶性タウが減少すると解釈される。

(iii) 個体でのアルミニウムの効果

まず、脳内アルミニウム濃度増大を調べるため 3 日間、10, 25, 50 mM アルミニウムマルトールを腹腔内に 200 μ l 連続投与した。マウスの脳では通常 5 μ M のアルミニウムが存在していることが判ったが、それぞれの濃度のアルミニウムは 3 日連続投与後に直線的に増大し、それぞれ 9.6, 11, 16 μ M となった。50 mM 投与群は肝臓に障害が見られたが脳では神経原線維変化の増大は見られなかった。25 mM で 2 週間のアルミニウム連続投与を行ってみると最終的に約 20 μ M のアルミニウム脳内濃度となった。しかし、肝臓にやはり異常が見られ脳では何ら異常所見は得られなかった。これらのことから、アルミニウムのアルツハイマー病発症への寄与は非常に少ないと結論した。

2. 脳老化の解明 (佐原, 村山, 前田, 高島)

(1) 環境因子による脳老化促進

神経原線維変化は加齢に伴い entorhinal cortex に出現する。ほぼ 75 歳以上の高齢者ではほとんどの場合この部位に神経原線維変化が生じており、この部位の機能低下が予測される。このことから脳の老化はタウの蓄積を伴う神経変成によって生じるという作業仮説を基礎に検討を行っている。酸化ストレスは生物共通の老化因子として知られているが、本年度我々はタウ蓄積と酸化ストレスの関係を調べた。その結果、酸化ストレスはタウタンパク同士のジスルフィド結合を促進しタウ線維形成を加速することが In vitro, In vivo の実験系で明らかとなった。

Alzheimer's disease is one of the most common forms of dementia. The disease is characterized clinically with memory loss in early stages that progresses into cognitive impairment, and eventually dementia. In aging societies, determining the mechanisms behind and developing treatments for senile dementias, including Alzheimer's disease, are pressing issues. Our lab studies the mechanisms of neurodegeneration in senile dementia through β -amyloid, tau and presenilins. Our major research objectives are (1) developing animal models designed to exhibit the pathological features of AD brain (i.e., Ab accumulation, neurofibrillary tangle formation, and neuronal loss), (2) developing therapeutic strategies for dementia using these model animals, and (3) determining the factors for the aging brain, the primary cause of senile dementia.

This year, we focused on determining which structure of Ab was neurotoxic. Ab was incubated and aggregated Ab was separated in monomers, dimers, oligomers, and fibrils by using HPLC/gel chromatography. An in vitro cytotoxic assay revealed maximum toxicity in fibrillar Ab. These toxic Ab fibrils were 1 nm thin filaments and had a

lower isoelectric point than monomeric Ab. This suggests that thin Ab filaments attach to the cell membrane more easily, thereby blocking extracellular signals and leading to cell death.

We investigated tau degradation and the mechanism of fibril formation in NFTs. We found that CHIP was an E3 ligase of tau and that CHIP overexpression reduced cytoplasmic tau concentration. This prevented NFT formation. In vitro AFM observations of tau aggregation successfully showed intermediate forms of tau fibrils. When these intermediate tau clusters aggregated and stuck together, tau fibrils with at least 5 tau molecules were formed.

We also investigated the relationship between AD and aluminum. While Al enhanced Ab aggregation, it did not increase Ab induced neurotoxicity, because Al induced amorphous Ab aggregate. Second, no increase of ThT fluorescence of tau was seen with Al after incubation with a 20 mM treatment. AFM observations revealed irregularly shaped tau structures, suggesting that Al also induces amorphous tau aggregation. In vitro results suggest that Al is not directly involved in AD pathogenesis. While the cell model showed SDS-insoluble tau at 100 mM Al-maltol treatment, Al IP injections in tau Tg mice killed the animals before reaching 100 mM Al. These results suggest that, while Al can induce NFT formation, it might impair other organs, and kill the individual, before a sufficient concentration of Al in brain is reached to trigger that formation.

Because NFTs appear in the entorhinal cortex of most persons by the age of 75, NFT formation may be a cause of brain aging. As oxidative stress is a known aging factor, we took our hypothesis and investigated the effects of oxidative stress on NFT formation. Oxidative stress accelerated tau aggregation through a disulfide bond. Thus, oxidative stress probably induces brain aging by stimulating tau aggregation in neurons.

Research Subjects

1. Effects of β -amyloid on neurodegeneration
2. Mechanism of neurofibrillary tangles
3. Production of animal models for Alzheimer's Disease
4. Determine the factors for aging brain

Staff

Laboratory Head

Dr. Akihiko TAKASHIMA

Research Scientists

Dr. De-Hua CHUI

Dr. Koko ISHIZUKA

Dr. Akiko MURAKAMI

Dr. Naruhiko SAHARA

Technical Staff I

Mr. Tatsuya MIZOROKI

Ms. Miyuki MURAYAMA

Mr. Shinobu NAKAO
Ms. Jung-Mi PARK
Mr. Shunji YAMASHITA

Assistants

Ms. Makiko HAYASHI

Junior Research Associates

Mr. Sumihiro MAEDA

Visiting Scientists

Mr. Genzo ITO (IBL Co., Ltd.)
Dr. Tomohiro MIYASAKA (Tokyo Univ.)
Dr. Ohoshi MURAYAMA (Azabu Univ.)
Dr. Yoshitaka TATEBAYASHI (Tokyo Inst. Psychiatry)
Dr. Yuji YOSHIIKE (Univ. California, Irvine, USA)

Trainees

Mr. Masafumi SHIMOJO (Dept. Life Sci., Tokyo Inst. Technol.)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Hatakeyama S., Matsumoto M., Kamura T., Murayama M., Chui D., Planel E., Takahashi R., Nakayama K. I., and Takashima A.: "U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates polyubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy", *J. Neurochem.* **91**, 299–307 (2004). *

Planel E., Miyasaka T., Launey T., Chui D., Tanemura K., Sato S., Murayama O., Ishiguro K., Tatebayashi Y., and Takashima A.: "Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease", *J. Neurosci.* **24**, 2401–2411 (2004). *

Takashima A.: "The role of GSK-3 β in the formation of neurofibrillary tangles", *Psychogeriatrics* **4**, S51–S56 (2004). *

(総説)

高島明彦: "ユビキチンプロテアソームを介したタウ蛋白分解機構", *Dementia Jpn.*: 日本痴呆学会誌 **18**, 39–45 (2004).

中谷紀章, 山下俊治, 藤森俊彦, 吉川武男: "遺伝子発現プロファイリングより得られたうつ病感受性候補遺伝子の機能解析: LIMK1 遺伝子ノックアウトマウスの行動解析", *精神薬療研究年報* **36**, 6–10 (2004).

高島明彦: "脳の老化とアルツハイマー病発症機構: タウ研究からのアプローチ", *脳* **21**, 7, 143–150 (2004).

(その他)

高島明彦: "アルツハイマー病の原因: 治療法の研究はどこまで進んできたか", *TMDC MATE*, No. 234, pp. 4–5

(2004).

高島明彦: "GSK-3 β ", *カレントセラピー* **22**, 407 (2004).

[単行本・Proc.]

(総説)

Sun X. and Takashima A.: "Regulation of amyloid precursor protein processing by lithium", *Amyloid Precursor Protein: A Practical Approach*, edited by Xia W. and Xu H., CRC Press, Florida, pp. 145–153 (2005).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Murakami A., Sato K., Sato K., Nakano A., and Takashima A.: "Pmt4p dependent O-mannosylation of heterologous expressed human β -amyloid precursor protein (APP) in *Saccharomyces cerevisiae*", 57th Ann. Meet. of the Japan Soc. for Cell Biology, Toyonaka, May (2004).

Maeda S., Kim H., Akagi T., Miyasaka T., Hashikawa T., Ikai A., and Takashima A.: "Generation of tau filament through globular tau oligomer", 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).

Yamada M., Yuhki M., Kitamura N., Araya R., Seki K., Itohara S., Tanemura K., Takashima A., Wess J., and Noguchi T.: "Mice deficient for the M5 muscarinic receptor show impaired acetylcholine-dependent autoregulation of cerebral blood flow and reduced cognitive function", 34th Ann. Meet. of Soc. for Neuroscience (Neuroscience 2004), San Diego, USA, Oct. (2004).

(国内会議)

高島明彦: "FTDP-17 の疾患モデルマウス: 異常タウ蛋白質の in vivo 解析", 日本薬学会第 124 年会, 大阪, 3 月 (2004).

高島明彦: "脳老化とインスリンシグナル", 第 77 回日本薬理学会年会, 大阪, 3 月 (2004).

高島明彦: "脳の老化から見たアルツハイマー病の原因と治療法", 日本応用細胞生物学会第 2 回大会, 高崎, 6 月 (2004).

種村健太郎, 宮坂知宏, 近藤隆, 高島明彦: "Neural degeneration with tau inclusion in FAD mutant PS-1 knock-in mice", 第 138 回日本獣医学会学術集会, 札幌, 9 月 (2004).

Ebrahim A., 下畑充志, 竹内環, 赤木巧, 村山美由紀, 天野賢治, Subramhanya K. H., 端川勉, 左合治彦, Epstein C. J., 高島明彦, 山川和弘: "Studying the neurodegenerative phenotype in Ts1Cje, a partial Trisomy 16 mouse model for Down Syndrome", 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).

野口孝則, 結城宗浩, 北村尚士, 新家瑠奈, 関健二郎, 糸原重美, 種村健太郎, 高島明彦, Wess J., 山田真久: "アセチルコリン依存性脳循環自動調節と記憶障害", 第 27 回日本神経科学大会・第 47 回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2004), 大阪, 9 月 (2004).

前田純宏, 金賢徹, 赤木巧, 宮坂知宏, 端川勉, 猪飼篤, 高島明彦: "顆粒状凝集物を介したタウ線維形成", 第 23 回日本痴呆学会学術集会, 東京, 9 月 (2004).