

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07618

研究課題名(和文) 認知症の新たな発症メカニズムの解明と新規治療薬の創出

研究課題名(英文) Elucidation of new pathogenic mechanisms of dementia and development of new therapeutic agents

研究代表者

細川 雅人 (Hosokawa, Masato)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：00435116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：タウオパチーの病理を再現する動物モデルを構築するにあたり、これまでのタウ注入マウスモデルの欠点を克服するため、ゲノム編集技術を用いて6アイソフォームタウを発現する新規マウス(Tau 3R/4R マウス)を作製した。認知症患者剖検脳から界面活性剤不溶性画分を抽出し、これらに含まれるタウ線維を新規マウス脳内に注入した。数ヶ月経過後にタウ蓄積病理の形成・伝播が観察されるか検討を行った。アルツハイマー病注入マウスではマウス内在性の3Rと4R両方のタウが、皮質基底核変性症注入マウスでは4Rタウのみが、ピック病注入マウスでは3Rタウのみが蓄積し、アイソフォーム特異的なシード依存性増幅反応が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、異常タウにはアイソフォーム特異的なシード依存性凝集を引き起こす能力がある、異常タウに伝播能がある、脳内に注入したヒトタウ線維が種の壁を越えて内在性のマウスタウの蓄積を誘導することができる、というタウが持つプリオン様の性質が確認された。この新規マウスを用いたタウ線維注入モデルは、タウ伝播メカニズムの解明や、タウの伝播抑制作用を持つ薬剤の探索に用いることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to construct a mouse model that recapitulates the pathology of tauopathies, new mice (Tau 3R/4R mice) expressing six isoforms of tau were generated using genome editing technology to overcome the shortcomings of previous experimental tau injection mouse models. Sarkosyl-insoluble fractions were extracted from postmortem brains of dementia patients and the tau fibrils contained in these fractions were injected into the brains of Tau 3R/4R mice. We investigated whether the formation and propagation of tau accumulation pathology could be observed after a certain period of time. In the brain extracts of Alzheimer's disease-injected mice, both endogenous 3R and 4R tau accumulated, in the brain extracts of corticobasal degeneration-injected mice only 4R tau accumulated, and in the brain extracts of Pick's disease-injected mice only 3R tau accumulated. An isoform-specific, seed-dependent amplification of tau was observed.

研究分野：分子生物学

キーワード：タウ ゲノム編集 認知症 アルツハイマー病 大脳皮質基底核変性症 ピック病 プリオン様伝播

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)、大脳皮質基底核変性症(CBD)、ピック病(PiD)などでは神経細胞やグリア細胞内にタウタンパク質が異常蓄積し、神経変性が生じることにより認知症が発症することが知られている。このようにタウが蓄積する疾患をタウオパチーと呼ぶ。タウタンパク質は微小管結合領域が3回繰り返しの3リピート(3R)タウと4回繰り返しの4リピート(4R)タウに大別され、ヒト成体脳では6種類のアイソフォームが発現している。ADでは3Rタウと4Rタウの両方が、CBDでは4Rタウのみが、PiDでは3Rタウのみが凝集・蓄積することが明らかとなっている。これは疾患によって特徴的な蓄積タウアイソフォームがあることを示している。さらに、このタウ蓄積病理は脳内で広がって行くことが報告されており、この現象は「伝播」として知られている。アルツハイマー病ではタウの蓄積部位・広がりや臨床症状に相関性があることが報告されている。タウオパチーの病態機序解明や治療薬の開発には、病理を正確に再現できるマウスが必要とされていた。

しかし、過去に作製されたマウスモデルにおいて、AD患者脳の不溶性画分を注入したマウス脳では、4Rタウの蓄積を誘導することはできたが、3Rタウの蓄積は誘導できなかった。また、PiD患者脳の不溶性画分の注入実験においても、3Rタウの蓄積を誘導できなかった。その理由として、まずヒトとマウスにおけるタウの発現様式の違いが考えられた。ヒトは胎児期脳で3Rタウのみを発現しているが、その後、3Rと4Rタウの両方が発現するようになる。一方、ワイルドタイプのマウスは胎児期～幼少期脳で3Rタウのみを発現しているが、成体ではほとんどすべてのタウが4Rタウに置き換わるという大きな違いがある。これまでに報告された研究では、これらの違いを全く考慮せずに行ったため、疾患に特徴的なアイソフォームの蓄積を再現することができなかつたと推察された。そこで、ヒトと同じ発現様式のタウマウスを開発することが必要であった。また、過去に報告された多くの実験で4Rタウ・トランスジェニックマウスを用いていたことが、3Rタウの蓄積を誘導できなかった理由として考えられた。

2. 研究の目的

ゲノム編集技術を用いて、ヒト成体脳と同様に、成体になっても内在性の3Rと4R両方のタウ(6アイソフォームタウ)を生理的に正常量発現するマウスを作製し、このマウスの脳にタウオパチー患者脳から抽出した界面活性剤不溶性画分を注入し、アイソフォーム特異的なタウの伝播・蓄積が起こるかを調べる。

3. 研究の方法

1) Tau 3R/4R マウスの作製

マウスのゲノム上のタウエクソン10 - イントロン10にかけて、CRISPR/Cas9でゲノム編集ができる位置をCHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>)にて検索した。様々な条件を加味し、single guide RNAとしてtau gRNA-6 (5' - GAAGGATAATATCAAACACGTCCCGG-3')を選択した。Tau gRNA-6 mRNA, Cas9 mRNAをC57BL/6Jマウスの2細胞期の受精卵にインジェクションした。インジェクション後の

受精卵を偽妊娠マウスの子宮へ移植した。産生個体のジェノタイピングはマウスの尾よりろ紙上に血液を1滴採取し、直径1.2 mmの円形に切り出した物をPCRの鋳型とした。PCRはMightyAmp (TaKaRa), Forward primer: 5' - CCAGATTCCTTTTGTGACTTCCAGGGTGCCATCC-3', Reverse primer: 5' - CCAGAGATGAGGGAAGAGGTGTCAGCC-3' を用いておこなった。ABI Veriti thermal cycler (Applied Biosystems)を使用し、98℃, 2分ののち、98℃, 10秒, 60℃, 15秒, 68℃, 35秒を32サイクルでPCRをおこなった。PCRサンプルは1%アガロースゲルで電気泳動をおこなった。

2) タウオパチー患者脳からの界面活性剤不溶性画分の抽出

患者脳(0.2 g)を1.8 mLのA68 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.8 M NaCl, 1 mM ethylene glycol bis-N, N, N', N'-tetraacetic acid, 10% sucrose)中でホモジネートした。さらにA68 bufferを1.8 mL、20% sarkosylを400 µL加え、37℃で30分インキュベーションをおこなった。15,000 rpm, 4℃で10分間遠心後、上清を回収し、さらに50,000 rpm, 4℃, 20分遠心した。ペレットを生理食塩水で洗浄し、30 µLの30 mM Tris-HCl (pH7.5)を加えて超音波処理をおこなった。

3) Tau 3R/4R マウスへのタウオパチー患者脳由来不溶性画分の注入

抽出した患者脳のsarkosyl不溶性画分をTau 3R/4Rマウスの右側線条体 (ブレグマからAnterior-Posterior= +0.2 mm, Medial-Lateral= +2.0 mm, Dorsal-Ventral= -2.6 mm)へイソフルラン吸入麻酔下で接種した(5 µL/mouse)

4) 組織化学的検討

接種から8ヶ月後以降に抜脳し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、20%シュウクロース液に置換した。脳を凍結ミクロトームで30 µmに薄切し、免疫組織化学染色をおこなった。薄切切片をギ酸処理10分、オートクレーブ110度10分、その後室温で30分間過酸化水素処理し、ビオチン化AT8抗体 (Innogenetics, Belgium)を1,000倍希釈で反応させた。その後アビジン - ビオチン化 horseradish peroxidase 複合体 (Vector Laboratories, USA)を反応させ、ジアミノベンジジン/硫酸ニッケルアンモニウムにて発色をおこなった。対比染色はKernechtrot液 (Merk, Germany)を用いた。

5) 生化学的検討

マウスの脳をA68 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, 10% sucrose)でホモジナイズし、100,000 x g, 4℃で20分間超遠心した。上清を-20℃で保管し、一部を用いてアルカリフォスファターゼによる脱リン酸化反応をおこなった。サンプルをSDS-PAGE sample bufferに懸濁し、100℃で5分間加熱した。10% SDS-PAGE上で200 V, 45分間電気泳動し、泳動後のゲルをPVDF膜に転写した。転写されたPVDF膜を3% gelatinでblockingしたのち、1次抗体としてT46 (1:1,000, Invitrogen), RD3 (1:500, Millipore), anti-4R (1:1,000, 当研究室で作製), AT8 (1:1,000, Innogenetics), pS396 (1:1,000, Calbiochem), マウスタウ特異抗体 (1:1,000, 当研究室で作製)を1晩反応させた。膜を洗浄したのち、anti-mouse IgG-HRP (1:50,000, Bio-Rad)と1時間反応し、SuperSignal West Dura Extended

Duration Substrate を用いて化学発光をおこなった。化学発光は LAS-4000 mini (GE Healthcare) で検出した。化学発光検出終了後、た膜を洗浄し、anti-mouse IgG-Biotin (1:500, Vector Laboratory) を 1 時間反応させた。膜を洗浄後 ABC 液 (Vector Laboratory) に 1 時間浸漬し、ジアミノベンジジン/NiCl₂/H₂O₂ で発色させた。

4. 研究成果

ゲノム編集技術を用いて、ヒト成体脳と同様に、成体になっても 3R と 4R 両方のタウを生理的に正常量発現する (過剰発現系ではない) モデルマウス (Tau 3R/4R マウス) の作製に成功した (図 1)。

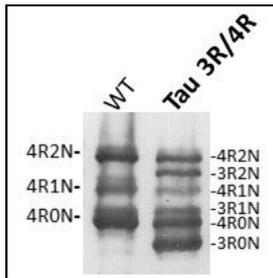


図 1. 3R と 4R 両方のタウを発現するマウスの作製。ワイルドタイプマウス (左) では脳内で 4R タウのみが発現しているが、Tau 3R/4R マウス (右) ではヒトと同様の発現パターンを示し、3R と 4R タウの両方が脳内で発現していた。

次に AD, CBD, PiD 患者剖検脳から界面活性剤不溶性画分を抽出し、これらに含まれるタウ線維を Tau 3R/4R マウス脳内に注入した。一定期間経過後にタウ蓄積病理の形成・伝播が観察されるか検討を行った。3R タウ特異抗体、4R タウ特異抗体を用いて免疫組織化学染色をおこなったところ、AD (3R+4R タウオパチー) 注入マウスではマウス内在性の 3R と 4R 両方のタウが、CBD (4R タウオパチー) 注入マウスでは 4R タウのみが、PiD (3R タウオパチー) 注入マウスでは 3R タウのみが蓄積し、アイソフォーム特異的なシード依存性増幅反応が観察された (図 2)。

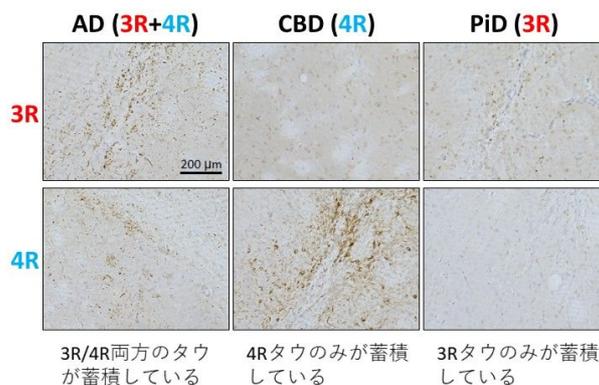


図 2. シード依存的異常タウの蓄積。AD, CBD, PiD 患者脳由来タウ線維を Tau 3R/4R マウス脳内に注入後、形成されたタウ蓄積病理を 3R タウ特異抗体 (上段)、4R タウ特異抗体 (下段) で染色した。AD 線維注入マウスでは 3R, 4R 両方のタウ蓄積が確認された。CBD 線維注入マウスでは 4R タウのみが観察

され、3R タウの蓄積は認められなかった。PiD 線維注入マウスでは 3R タウのみが確認され、4R タウの蓄積は認められなかった。シード依存的に異常タウの蓄積が誘導されることが明らかとなった。

また、AD タウ線維を注入したマウス脳をタウのリン酸化抗体 (AT8) で染色したところ、時間経過に伴って、注入部位である線条体でのタウ蓄積病理が増加し、さらに線条体と直接神経回路がつながっている大脳皮質、視床、扁桃体へのタウ蓄積病理の伝播が認められた (図 3)。

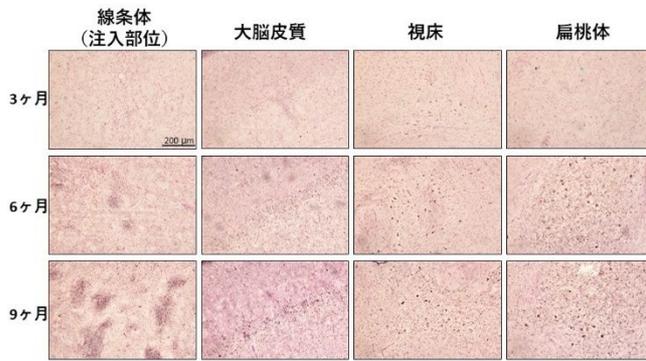


図3. AD 線維注入マウスにおけるタウ蓄積病理の形成と伝播

AD 線維注入マウス脳における異常タウの蓄積と伝播をタウ注入後3, 6, 9か月で観察した。線条体（注入部位）、大脳皮質、視床、扁桃体に蓄積するタウをリン酸化タウ抗体

(AT8)で検出した。いずれにおいても3か月ではタウ蓄積の程度は弱いだが、時間経過とともに、線条体でのタウ蓄積病理が増加し、さらに線条体と直接神経回路がつながっている大脳皮質、視床、扁桃体へタウ蓄積病理が伝播していることがわかった。

最後に、PiD タウ線維注入マウス脳を詳しく調べたところ、AD や CBD タウ線維を接種した時には観察されなかった球状のタウ蓄積病理が観察された（図4）。これらはヒト PiD で観察されるピック球に非常に良く似ていた。タウ線維注入実験でピック球様の病理が再現されたのは、世界で初めてのことである。

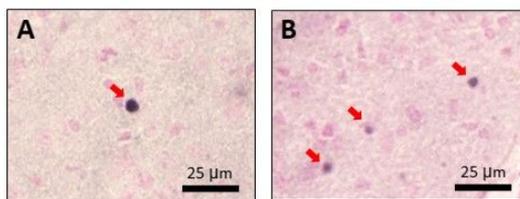


図4. PiD 線維注入マウスにおけるピック球様タウの蓄積

PiD 線維注入マウス脳を(A)リン酸化タウ抗体(AT8)と(B)抗マウスタウ抗体で染色

した。赤矢印がピック球様タウの蓄積を示している。

本研究により、異常タウにはアイソフォーム特異的なシード依存性凝集を引き起こす能力がある、異常タウに伝播能がある、脳内に注入したヒトタウ線維が種の壁を越えて内在性のマウスタウの蓄積を誘導することができる、というタウが持つプ

リオン様の性質が確認された。この新規マウスを用いたタウ線維注入モデルはタウ伝播メカニズムの解明や、タウの伝播抑制作用を持つ薬剤の探索に用いることができると考えられる（図5）。

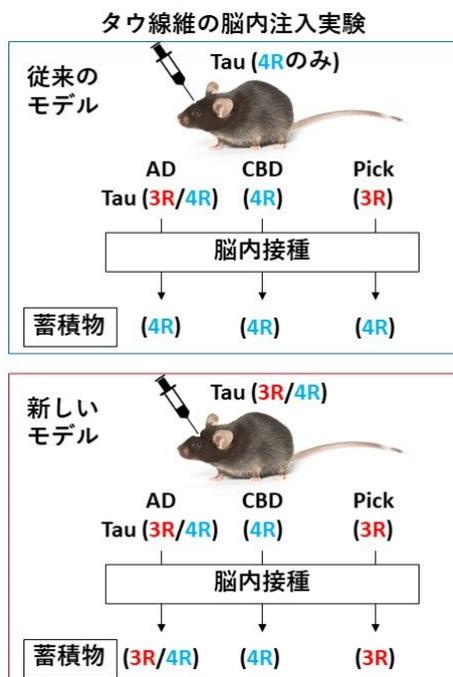


図5. 異常タウ線維注入実験におけるこれまでのモデル(上)と本研究(下)の相違

AD:アルツハイマー病, CBD:大脳皮質基底核変性症, PiD:ピック病

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hosokawa M, Masuda-Suzukake M, Shitara H, Shimozawa A, Suzuki G, Kondo H, Nonaka T, Campbell W, Arai T, Hasegawa M | 4. 巻 145 |
| 2. 論文標題 Development of a novel tau propagation mouse model endogenously expressing 3 and 4 repeat tau isoforms | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Brain | 6. 最初と最後の頁 349-361 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/brain/awab289 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 細川雅人 | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 プログラニューリン | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 非定型パーキンソニズム-基礎と臨床- | 6. 最初と最後の頁 209-215 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 細川雅人、長谷川成人 | 4. 巻 139 |
| 2. 論文標題 タウのプリオン様伝播モデル | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 薬学雑誌 | 6. 最初と最後の頁 1021-1025 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00165-6 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 細川雅人 | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 タウのプリオン様伝播動物モデル | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Dementia Japan | 6. 最初と最後の頁 306-317 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hosokawa M |
| 2. 発表標題 Development of tau propagation mice model |
| 3. 学会等名 Asian Pacific Prion Symposium 2021（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 細川雅人、鈴掛雅美、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 タウオパチーとタウ伝播のマウスモデル |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 細川雅人、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 Animal model of tauopathy and tau propagation |
| 3. 学会等名 第61回日本神経病理学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 細川雅人、鈴掛雅美、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 タウのプリオン様伝播の病態 - モデルマウスの解析から |
| 3. 学会等名 第39回日本認知症学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hosokawa M, Tanaka Y, Arai T, Kondo H, Akiyama H, Hasegawa M |
| 2. 発表標題 Progranulin haploinsufficiency reduces amyloid beta deposition in Alzheimer's disease mouse model |
| 3. 学会等名 ADPD2019 The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hosokawa M, Hasegawa M |
| 2. 発表標題 Development of tau propagation mice model |
| 3. 学会等名 6th Congress of Asian College of Neuropsychopharmacology (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 細川雅人 |
| 2. 発表標題 ALSモデルマウスの作製と治療薬開発 |
| 3. 学会等名 第3回せりか基金 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 細川雅人、下沢明希、鈴掛雅美、設楽浩志、新井哲明、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 タウのプリオン様伝播モデルマウス |
| 3. 学会等名 第66回日本実験動物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 細川雅人、下沢明希、鈴掛雅美、設楽浩志、新井哲明、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 タウのプリオン様伝播モデルマウス |
| 3. 学会等名 第38回日本認知症学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 細川雅人、下沢明希、鈴掛雅美、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 タウ伝播モデルマウスの作製 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 細川雅人、長谷川成人 |
| 2. 発表標題 タウの伝播モデル動物 |
| 3. 学会等名 第37回日本認知症学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Hideaki Hara, Masato Hosokawa, Shinsuke Nakamura, Takayoshi Shimohata, Masugi Nishihara | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 Springer Nature | 5. 総ページ数 183 |
| 3. 書名 Progranulin and Central Nervous System Disorders | |

〔出願〕 計3件

| | | |
|--|------------------------|-------------------------|
| 産業財産権の名称 METHOD OF PRODUCING A NOVEL DISEASE MODEL ANIMAL FOR TAUOPATHIES | 発明者 細川雅人、設楽浩志、長谷川成人 | 権利者 公益財団法人東京都医学総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、16/805203 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |

| | | |
|---------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 産業財産権の名称 新規タウオパチーモデル動物の作製方法 | 発明者 細川雅人、設樂浩志、長谷川成人 | 権利者 公益財団法人東京都医学総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-037753 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

| |
|--|
| <p>公益財団法人東京都医学総合研究所 http://www.igakuken.or.jp/</p> <p>東京都医学総合研究所 認知症プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/project/detail/dementia.html</p> <p>アルツハイマー病、大脳皮質基底核変性症、ピック病などの病態機序解明や治療薬の開発に必要とされる新しいマウスモデルの開発に成功 https://www.fukuoka-u.ac.jp/press/21/10/06091538.html</p> <p>認知症プロジェクトの細川雅人 客員研究員、長谷川成人 参事研究員らは「3リピートタウ/4リピートタウを内在性に発現する新規タウ伝播マウスモデルの開発」について、英国科学雑誌「Brain」に発表しました。 https://www.igakuken.or.jp/topics/2021/0913_1.html</p> |
|--|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 新井 哲明 (Arai Tetsuaki) (90291145) | 筑波大学・医学医療系・教授 (12102) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|