

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15381

研究課題名(和文) アルツハイマー病関連タウタンパク質による神経変性を増悪化する新規遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of a novel genetic modifier of tau-mediated neurodegeneration

研究代表者

榊原 泰史 (Sakakibara, Yasufumi)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・認知症先進医療開発センター・研究技術員

研究者番号：20734099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病において、過剰リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化は、最初期に青斑核、嗅内野に出現する。ウォルフラム症候群の原因遺伝子WFS1の発現レベルを抑制すると、神経細胞がタウ神経毒に対して脆弱となることから、本研究ではWFS1の発現レベルがタウ病理進行と神経変性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。15ヶ月齢のWfs1欠損マウスにおいて内在性のタウ病理は認められなかったため、マウス脳でタウ病理を創出するためには人為的にタウの産生を加速させる必要があると考え、アデノ随伴ウイルスベクターを用い、青斑核におけるタウ病理の創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、アルツハイマー病の発症リスクについては、ゲノムワイド関連解析などからアミロイドの蓄積に関与する遺伝的因子が多く報告されている。一方、アミロイドやタウの下流で神経変性の進行や増悪化に関与する遺伝的因子については未だに明らかにされていない部分が多い。神経変性への感受性に対するWFS1の関与を明らかにすることは、神経細胞に備わるレジリエンス機構の解明だけでなく、アルツハイマー病の発症後に神経変性を抑止する治療方法の開発にも繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of hyperphosphorylated tau initially occurs in the locus coeruleus and entorhinal cortex in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Since reduced level of WFS1, a gene implicated in Wolfram syndrome, increased neuronal vulnerability to tau toxicity in a fly model, this study aimed to investigate whether loss of WFS1 exacerbate tau-mediated neurodegeneration in mouse brain. The analyses revealed that deficiency of Wfs1 did not induce accumulation of phosphorylated tau at 15 months of age. Indeed, we established a system for viral vector-mediated tau expression to generate age-associated tau pathology in the locus coeruleus.

研究分野：病態神経科学

キーワード：アルツハイマー病 神経変性 タウ病理 青斑核 ノルアドレナリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

WFS1 の遺伝子変異を病因とするウォルフラム症候群は、若年発症性の糖尿病と視神経萎縮を主徴とする進行性の神経変性疾患である。患者では髄鞘形成不全に続いて脳幹や小脳の著明な萎縮が認められ、病態の進行に伴い神経炎症、軸索変性と神経細胞脱落が生じるが、*WFS1* の機能低下により神経変性が惹起される機序は明らかではない。

WFS1 は脳の神経細胞でも多く発現しており、神経細胞の生存や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられたため、申請者はショウジョウバエを用いてその可能性について検討を行った。その過程において、脳の神経細胞でのみ *WFS1* の発現レベルを抑制すると、加齢とともに神経機能障害や神経変性が生じることを明らかにした。さらに、ショウジョウバエ複眼の神経細胞にタウタンパク質を過剰発現させると神経変性が惹起されるが、そのときに *WFS1* の発現レベルが増加することを見出した。実際に、*WFS1* の発現レベルを抑制した状態ではタウタンパク質による神経変性の程度が増悪化したことから、*WFS1* の発現レベルが減少するとタウ神経毒性に対して神経細胞が脆弱になることが示唆された。この結果から、*WFS1* が神経細胞の脆弱性を規定する新規の遺伝的因子となる可能性が示唆されたので、マウスモデルを用いてその機序を解明する必要があると考えた。

2. 研究の目的

アルツハイマー病の特徴的病理であり、過剰リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化は、神経変性の程度と相関が高く、最初期に青斑核、嗅内野に出現し、青斑核や嗅内野の神経細胞脱落に伴い海馬や大脳皮質へと拡大する。故に、タウ病理が初出する脳領域(青斑核や嗅内野)における神経細胞の脆弱性は、タウ病理の進行、および神経細胞脱落に影響を及ぼす可能性が考えられた。

WFS1 は青斑核ノルアドレナリン作動性神経細胞や嗅内野第 1 層、海馬 CA1 野の錐体細胞に発現し、その発現分布は最初期にタウ病理が出現する脳領域と一致する。そこで本研究では *WFS1* の発現レベルが低いと青斑核や嗅内野の神経細胞がタウ神経毒性に対して脆弱となり神経変性が増悪するという仮説を立て、*WFS1* の発現レベルがアルツハイマー病のタウ病理進行と神経変性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒトタウの発現下で *Wfs1* の発現を欠損させたマウス系統の作製

Wfs1 欠損マウス(山口大学より導入)、およびヒトタウノックインマウス(理研脳神経科学研究センターより導入)(いずれも C57BL/6 マウスを遺伝的背景系統とする)について、当研究センター内実験動物施設棟に導入した。両マウス系統を交配させることで、マウス脳内でヒトタウを発現し、かつ *Wfs1* の発現を欠損、あるいは抑制したマウス系統を作製した。

Wfs1 欠損マウス、およびヒトタウノックインマウスについて、それぞれ単独では 15 ヶ月齢まで特に摂餌・摂水困難などの飼育上の問題、また死亡事例もほとんどなく、加齢飼育を行うことができた。

(2) ヒトタウ発現アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの作製とマウス脳内への投与

ヒトタウノックインマウスにおいては 24 ヶ月齢に至ってもタウ病理が出現しないため、マウスの寿命内でタウ病理を再現するためには、タウの産生を加速させる必要がある。そこで、青斑核にヒトタウ病理を創出するため、青斑核ノルアドレナリン作動性神経細胞にてヒトタウタンパク質(4 リピートタウ)を高発現するための AAV ベクターの作製を行った。ノルアドレナリン作動性神経細胞特異的に発現する PRS×8 プロモーター下にヒトタウタンパク質をコードする配列を挿入したコンストラクトを構築し、このコンストラクトを用いてウイルス粒子を調製した。

脳定位固定装置(成茂科学器械製作所製)を用いて野生型(C57BL/6J)マウスに対し、ヒトタウを高発現する AAV ベクターの投与を行った。吸入麻酔下(1.5%イソフルラン)にて装置にマウスを固定した後、プレグマから見て、右側へ 0.9 mm、後方へ 5.4 mm、さらに下方へ 3.7mm の位置に注射針を挿入し、右側青斑核に対し、分速 0.1 μL にてヒトタウ発現 AAV ベクター液 1 μL を注入した(1.2×10^{13} vg/mL)。ベクター投与後、飼育室にて 6 ヶ月間、飼育を継続した後、脳組織を採取した。

(3) 免疫組織化学染色

マウスに対し、三種混合麻酔(メドミジン 0.3 mg/kg + ミダゾラム 4 mg/kg + ブトルファノール 5 mg/kg)を投与して麻酔を行った後、4%パラホルムアルデヒド溶液を心臓から灌流し固定を行った。固定後の脳組織はスクロース溶液に浸漬した後に凍結し、クリオスタット(Leica 社製)を用いて凍結切片(25 μm 厚)を作製した。作製した切片を PBS-T(0.1% TritonX-100 を添加したリン酸緩衝溶液)を用いて、3 回洗浄した後、ブロッキング溶液(5%正常ヤギ血清、0.5%ウシ血

清アルブミン、0.3% TritonX-100 を含むリン酸緩衝溶液)を添加し、室温で1時間以上、振とうした。その後、抗体希釈液(3%正常ヤギ血清、0.5%ウシ血清アルブミン、0.3% TritonX-100 を含むリン酸緩衝溶液)で一次抗体を希釈し、4 で一晚、切片と反応させた。翌日、切片をPBS-Tで3回洗浄した後、抗体希釈液で希釈した二次抗体を添加し、室温で2~3時間、反応させた。その後、切片を再びPBS-Tで3回洗浄した後、DAPI(Molecular Probe社、2 µg/ml)を用いて核染色を行い、切片をスライドガラスに貼付し、室温で30分~1時間ほど乾燥させた。切片の乾燥後に、超純水でスライドガラスを軽く洗浄し、退色防止剤入封入剤を用いて封入した。

使用した一次抗体は、AT8抗体(Thermo Fisher社、1:500)、ドーパミン水酸化酵素(DBH)抗体(Immunostar社、1:500)、ノルアドレナリントランスポーター(NET)抗体(Synaptic Systems社、1:300)、ヒトタウ抗体(富士フィルム和光純薬社、1:300)であった(括弧内の数字は希釈倍率を示す)。また、二次抗体はAlexa Fluor 488マウスIgG(Abcam社、1:500)、Alexa Fluor 594ウサギIgG(Abcam社、1:500)、Alexa Fluor 594ラットIgG(Abcam社、1:500)であった(括弧内の数字は希釈倍率を示す)。

作製したスライドガラス標本は、LSM780共焦点レーザー顕微鏡(Carl Zeiss社製)、およびBZ-9000蛍光顕微鏡(キーエンス社製)にて観察した。

4. 研究成果

(1) 内在性タウ病理に対する*Wfs1*欠損の影響についての検討

*Wfs1*欠損マウスでは、ウォルフラム症候群の患者と同様に、膵細胞が進行性に脱落し高血糖を呈する。糖尿病が神経原線維変化の本態であるタウのリン酸化を亢進することから、*Wfs1*欠損マウスにおいて、慢性的な高血糖により内在性のタウ病理が出現する可能性について検討することとした。

*Wfs1*欠損マウスでは9ヶ月齢で顕性糖尿病が認められ、高血糖による死亡事例が多発すると予想されたが、当研究センター実験動物施設棟では、15ヶ月齢に到達するまで死亡事例なく飼育を継続することができた。この月齢の時点で約6ヶ月間、高血糖負荷状態にあったことから、青斑核や嗅内野でタウ病理が出現していると予想した。

そこで、過剰リン酸化タウが最も早期に検出される青斑核の神経細胞に着目し、15ヶ月齢の*Wfs1*欠損マウス脳内でタウ病理が出現しているかどうかについて検討を行った。しかし、青斑核の細胞体、および大脳皮質へ投射する神経軸索のいずれにおいても、AT8抗体(タウの202番目のセリン残基と205番目のスレオニン残基のリン酸化を認識する)で標識されるリン酸化タウの蓄積は認められなかった。これらの結果から、*Wfs1*欠損により高血糖負荷が継続しても、内在性タウ病理が出現するには至らないと推測された。

タウについて、マウスでは3種類のアイソフォーム(3リピートタウのみ)が存在するが、ヒトのタウ(4リピートタウと3リピートタウからなる6種類のアイソフォームが存在)と異なり凝集性が低いことから、ヒトタウの発現条件下(ヒトタウノックインマウス)において、*Wfs1*欠損による内在性タウ病理への影響を検討する必要があると考えられる。昨年度に*Wfs1*欠損・ヒトタウノックインマウスの系統を確立できたことから、このマウス系統を用いて、15ヶ月齢以降での内在性タウ病理について評価を進めている。

(2) AAVベクターを用いた青斑核タウ病理の創出

これまでの研究から、ヒト以外の動物種においてタウ病理を出現させるためには、寿命を延伸させる、あるいはタウの産生を加速させる必要があると考えられる。動物の寿命を大きく延伸させることは不可能であるため、遺伝子改変技術によりタウのリン酸化を亢進させ、マウス脳に病理を創出してきた。これらのモデルマウスでは、アルツハイマー病ではなく、家族性前頭側頭型認知症に関連する変異型タウを過剰発現させることで、大脳皮質や海馬においてタウ病理が出現する。一方で、申請者は、アルツハイマー病におけるタウ病理の進行過程を忠実に再現するために、青斑核で特異的にタウの産生を加速し、タウ病理を創出する必要があると考え、ヒトタウ発現AAVベクターを構築した。

ここでは、野生型マウスの青斑核に対し、ノルアドレナリン作動性神経細胞特異的にヒトタウを発現するAAVベクターを投与し、6ヶ月後にヒトタウの発現や、タウのリン酸化の程度について調べた。AAVベクターを投与していない左側青斑核と比較すると、ベクター投与を行った右側青斑核ではヒトタウが発現しており、AT8抗体で標識されるリン酸化タウが検出された。また、詳細な検証を行っているところであるが、青斑核から大脳皮質に投射する神経軸索においてもヒトタウ、およびリン酸化タウを検出できた。これらの結果から、AAVベクターを用いることにより青斑核でタウの産生を加速させ、病理を創出できることが分かった。

本実験においては、青斑核の神経細胞におけるタウの凝集、また青斑核からの投射領域におけるタウ病理の拡大は認められなかったが、ヒトタウノックインマウスを用いることで、これらの病理学的変化を検出できると予想される。現在、確立した*Wfs1*欠損・ヒトタウノックインマウスの青斑核に対してAAVベクターを投与し、タウ病理の増悪化、および他の脳領域への病理拡大のメカニズムについて検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasufumi Sakakibara, Michiko Sekiya, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Koichi M. Iijima	4. 巻 20
2. 論文標題 Amyloid- plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in App knock-in mouse models of Alzheimer's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12868-019-0496-6	査読の有無 有
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 Yoshiyuki Kasahara, Yasufumi Sakakibara, Takashi Hiratsuka, Yuki Moriya, Klaus Peter Lesch, F. Scott Hall, George R. Uhl, Ichiro Sora	4. 巻 39
2. 論文標題 Repeated methamphetamine treatment increases spine density in the nucleus accumbens of serotonin transporter knockout mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 130-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12049	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yasufumi Sakakibara, Michiko Sekiya, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Koichi M. Iijima	4. 巻 19
2. 論文標題 Cognitive and emotional alterations in App knock-in mouse models of A amyloidosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12868-018-0446-8	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件/うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Koichi M. Iijima, Yasufumi Sakakibara, Yu Hirota, Kyoko Ibaraki, Kimi Takei, Yoko Tsubokawa, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Michiko Sekiya
2. 発表標題 Loss of locus coeruleus-noradrenergic afferents in the App knock-in mouse model of A amyloidosis
3. 学会等名 The 15th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michiko Sekiya, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 Sulfonylurea receptor/Sur deficiency increased vulnerability to neurodegeneration in Drosophila models of Alzheimer's disease
3. 学会等名 The 15th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michiko Sekiya, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 Deficiency in a fly ortholog of HS-Aging related gene, sulfonylurea receptor/Sur, increased vulnerability to neurodegeneration in Drosophila models of Alzheimer's disease
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Koichi M. Iijima, Yasufumi Sakakibara, Yu Hirota, Kyoko Ibaraki, Kimi Takei, Takashi Saito, Takaomi C. Saïdo, Michiko Sekiya
2. 発表標題 Reduced density of noradrenergic fibers without prominent neuron loss or tau pathology in the locus coeruleus in App knockin mouse models of A amyloidosis
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榊原泰史、茨城京子、竹井喜美、斉藤貴志、西道隆臣、関谷倫子、飯島浩一
2. 発表標題 Appノックインマウスでは青斑核で神経細胞脱落、またタウ病理は起こらないが、ノルアドレナリン投射線維が減少する
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榊原泰史、茨城京子、竹井喜美、斉藤貴志、西道隆臣、関谷倫子、飯島浩一
2. 発表標題 Appノックインマウスにおける青斑核神経投射とneurovascular couplingの変化の解析
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関谷倫子、権秀明、榊原泰史、近松幸枝、飯島浩一
2. 発表標題 アルツハイマー病におけるATP感受性K ⁺ チャネル機能の役割
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯島浩一、Minghui Wang、榊原泰史、Bin Zhang、関谷倫子
2. 発表標題 ネットワーク解析から解き明かすA β 病態
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関谷倫子、Minghui Wang、榊原泰史、近松幸枝、Bin Zhang、飯島浩一
2. 発表標題 遺伝子ネットワーク解析を用いたアルツハイマー病の発症機序解明と創薬標的の探索
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Xiuming Quan, Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 Sur deficiency increases vulnerability to age-related neurodegeneration in Drosophila
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi M. Iijima, Yasufumi Sakakibara, Takashi Saito, Takaomi C. Saïdo, Michiko Sekiya
2. 発表標題 Amyloid- plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits and synaptic degeneration in App knock-in mouse models of Alzheimer's disease
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michiko Sekiya, Yasufumi Sakakibara, Sachie Chikamatsu, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 A novel Drosophila model of Alzheimer's disease
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (AAIC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasufumi Sakakibara, Takashi Saito, Takaomi C. Saïdo, Michiko, Koichi M. Iijima
2. 発表標題 Amyloid- plaque formation and reactive gliosis are required for induction of cognitive deficits in App knock-in mouse models of Alzheimer's disease
3. 学会等名 6th Congress of AsCNP (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 権秀明、関谷倫子、榊原泰史、飯島浩一
2. 発表標題 スルフォニル尿素受容体欠損がもたらす老年性神経変性への脆弱性
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榊原泰史、関谷倫子、斉藤貴志、西道隆臣、飯島浩一
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルであるAppノックインマウスにおける認知機能障害はアミロイド 斑の形成とグリオシスに起因する
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島浩一、榊原泰史、斉藤貴志、西道隆臣、関谷 倫子
2. 発表標題 Cognitive deficits and synaptic degeneration in App knock-in mouse models of AD
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷倫子、榊原泰史、近松幸枝、飯島浩一
2. 発表標題 新規アルツハイマー病モデルショウジョウバエの作製
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koichi M. Iijima, Xiuming Quan, Yasufumi Sakakibara, Michiko Sekiya
2. 発表標題 Studying mechanisms underlying hippocampal sclerosis of aging in Drosophila
3. 学会等名 The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 権 秀明、榊原 泰史、飯島 浩一、関谷 倫子
2. 発表標題 加齢性海馬硬化症発症機序の解明
3. 学会等名 第11回NAGOYAグローバルリトリート
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯島 浩一、権 秀明、榊原 泰史、関谷 倫子
2. 発表標題 加齢性海馬硬化症モデルショウジョウバエの解析
3. 学会等名 第37回日本認知症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 権 秀明、関谷 倫子、榊原 泰史、飯島 浩一
2. 発表標題 加齢性海馬硬化症発症機序の解明
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榊原 泰史、関谷 倫子、斉藤 貴志、西道 隆臣、飯島 浩一
2. 発表標題 A アミロイドーシスモデルであるAppノックインマウスにおける情動および認知機能に関する行動解析
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立長寿医療研究センター研究所 プレスリリース(2019年4月24日) https://www.ncgg.go.jp/ri/report/20190424.html
--

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

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
---------	---------