

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07860

研究課題名(和文) 神経変性疾患の進行メカニズムの解明と早期診断法の探索

研究課題名(英文) Analysis of the progression mechanism of neurodegenerative diseases

研究代表者

鈴掛 雅美(増田雅美)(MASUDA-SUZUKAKE, Masami)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・主任研究員

研究者番号：20583751

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)：本研究ではアルツハイマー病やパーキンソン病の進行過程の主要プロセスである異常タンパク質の脳内伝播についてその影響因子の検討を行った。これまでアルツハイマー病で蓄積・伝播するタウの脳内伝播を再現する簡便なモデルマウスが確立されていなかったが、本研究において新たなモデルマウスを確立した。このモデルを用いて疾患のリスクファクターが病態に与える影響を検討した。その結果、疾患の最大のリスクファクターである加齢がタウ伝播に促進的に寄与することが明らかとなった。性別についてはタウの脳内伝播に影響を及ぼさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アルツハイマー病などのタウタンパク質の蓄積を伴う神経変性疾患の新規モデルマウスを確立した。このモデルは疾患早期の進行過程を再現しており、この系を用いた解析からアルツハイマー病の危険因子である「加齢」が病態の進行に促進的に働くことが明らかとなった。この系はアルツハイマー病の進行過程の解明や進行過程を標的とした新規治療法開発への応用が期待できる。既に複数の研究室、製薬企業に導入されており、学術的需要の高いモデルである。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of assembled tau protein in the central nervous system is characteristic of Alzheimer's disease and several other neurodegenerative diseases, called tauopathies. We developed a new mouse model of tau accumulation and propagation in brain. Single intracerebral injection of synthetic tau filaments induced by dextran sulphate into wild-type mice caused seeding of endogenous tau, followed by spreading to distinct areas in a time-dependent manner.

This study revealed that intracerebral injection of synthetic full-length wild-type tau seeds prepared in the presence of dextran sulphate caused tau propagation in non-transgenic mice. These findings establish that propagation of tau assemblies does not require tau to be either mutant and/or overexpressed.

研究分野：生化学

キーワード：タウ シヌクレイン 伝播 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

現代の超高齢化社会においてアルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) およびパーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) の患者数は増加の一途をたどっている。しかしながら治療法としては対症療法が主であり、病態に基づいた原因療法が確立されていないという課題があった。両疾患の原因療法の確立を困難にしているのは、病態発生から治療開始までに数年から十数年のタイムラグがあるためである。より効果的な治療を行うためには、早期診断により治療開始を早め、さらに進行過程を標的とした治療戦略が望まれる。

AD、PD では特徴的な病理像として異常タンパク質蓄積病理が認められる。AD ではタウが、PD では シヌクレインが細胞内蓄積する。タウと シヌクレインの蓄積には共通点が報告されており、主に以下3つが挙げられる。

(1)蓄積タンパク質は構造変化を起こし シート構造に富むアミロイド線維を形成している。

(2)蓄積タンパク質はリン酸化、ユビキチン化を受けて蓄積している。

(3)蓄積病理は決まった脳領域で始まり、一様な方向性を持って脳内伝播する。

この性質は筋萎縮性側索硬化症 ALS で蓄積する TDP-43 タンパク質にも当てはまるため、神経変性疾患において蓄積する異常タンパク質に共通の性質と考えられる。蓄積タンパク質は類似したプロセッシングを受けながら脳内伝播し神経変性を誘導すると考えられる。さらにタウ、シヌクレイン蓄積病理の脳内分布、すなわち異常タンパク質の脳内伝播と臨床症状の進行度に相関性が報告されている (Braak et.al. *Neurobiology of Aging* 2003 & Braak et.al. *Acta Neuropathol.* 1991) ことから、病理の脳内伝播過程が疾患の進行過程と考えられる。しかしながらその分子メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

(1)タウ脳内伝播モデルマウスの作製

従来のタウ脳内伝播モデルマウスは患者脳から抽出した蓄積タンパク質をマウス脳内に接種するものであったが、患者脳組織由来の試料は症例間で蓄積タンパク質の量および質 (翻訳後修飾など) に違いがあり、モデルとしての再現性に課題があった。脳組織は有限であり商業的な大規模スクリーニングに不向きであること、人由来の試料であり使用に規制もあることから、汎用性の高いモデルとは言い難い。そこで本研究では合成タウタンパク質から作製した不溶性線維を用いて病理伝播を再現できる系の確立を目指した。それにより、以下(2)、(3)への応用も期待できる。

(2)孤発性 AD および PD の早期進行メカニズムの解明

タウ、シヌクレインの脳内伝播は疾患の早期病態における重要な変化であり、そのメカニズム解明により新たな治療戦略の創出につながると考えられる。そこで本研究では両タンパク質の脳内伝播に影響する因子の同定を試みた。

(3)AD および PD 早期診断マーカーの探索

予備検討において、シヌクレイン線維を脳内接種したコモンマーモセット血清中に異常型シヌクレインに対する自己抗体が検出された。この自己抗体が早期診断マーカーとなりうるか、伝播モデルマウスを用いて評価、検討を行った。

3. 研究の方法

(1)タウ脳内伝播モデルマウスの作製

合成タウから不溶性線維を作製する際には添加剤が使用されており、一般的にヘパリンが使用されてきた。しかしながらヘパリン添加によって作製したタウ線維 (ヘパリン-タウ線維) はマウス脳内に接種しても病理を誘導しないことが既に報告されていた。私たちは以前の検討から、異なる添加剤を用いると異なる構造のタウ線維ができることを見出していた。そこで添加剤としてデキストラン硫酸を用いてタウ線維を作製し得られたタウ線維 (デキストラン-タウ線維) を電子顕微鏡により観察すると、ヘパリン-タウ線維に比べて長さの短い線維が形成され、アミロイド線維結合色素であるチオフラビン T への結合性やグアニジン塩酸塩溶液に対する溶解性にも違いが認められた。以上の結果から、デキストラン-タウ線維はヘパリン-タウ線維とは異なる線維構造を有することが改めて示された。次にデキストラン-タウ線維を野生型マウス脳内に注入し、タウ蓄積病理の形成・伝播が見られるか検討を行った。解析は組織免疫染色によるタウ蓄積病理の時空間的解析と、生化学的手法による不溶性タウの解析により行った。

(2)孤発性 AD および PD の早期進行メカニズムの解明

上記(1)で確立したタウ伝播モデルマウスおよび、シヌクレイン伝播モデルマウスを用いて、脳内伝播に影響する因子を検索した。本研究では疾患のリスクファクターである加齢、性別、そして老人斑の影響を調べた。伝播の影響は病理解析および生化学的解析により評価した。

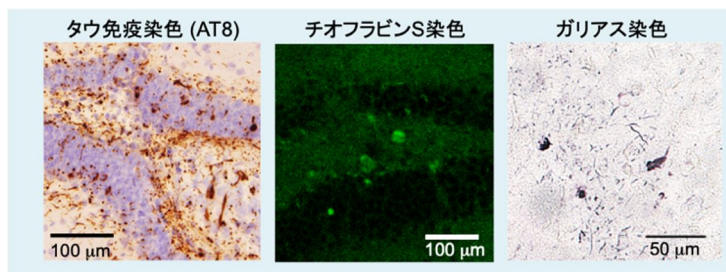
(3)AD および PD 早期診断マーカーの探索

シヌクレイン線維を脳内接種したコモンマーマーモセット血清中に異常型シヌクレインに対する自己抗体が検出されたが、マーマーモセットは個体数を増やして検討することが難しいため、タウ伝播モデルマウスおよびシヌクレイン伝播モデルマウスを用いて検討を行った。タウおよびシヌクレイン線維を脳内接種したマウスから経時的に血清を採取し、ELISAにより血清中のタウまたはシヌクレインに対する自己抗体の量を測定した。エンドポイントにおいて病理解析を行い、抗体価との関連について比較、検討を行った。

4. 研究成果

(1)タウ脳内伝播モデルマウスの作製

デキストラン-タウ線維を野生型マウス脳内に接種した結果、接種後1ヶ月でタウ蓄積病理の形成が観察された。さらに時間経過に伴って接種部位と神経連絡を持つ部位への伝播が認められた。デキストラン-タウ線維の注入によって誘導されたタウ病理は、アルツハイマー病で見られるタウ蓄積病理と同様の染色性を有しており、チオフラビンS染色、ガリアス染色(下図)、さらに様々なタウのリン酸化抗体(12E8、AT100、AT180、PHF-1、pS396、pS422)に対して陽性を示した。



生化学的解析から、接種後3ヶ月でサルコシル不溶性のリン酸化タウの蓄積が観察され、不溶性タウは接種からの時間経過に伴い増加した。これは脳内伝播が進行したことを示唆する結果であり、病理解析の結果と一致する。

以上の結果から、野生型マウス脳内にデキストラン-タウ線維を注入することによりタウ蓄積病理の形成および脳内伝播を再現するモデルマウスを確立することができた。このモデルマウスはタウ伝播(すなわち疾患の進行過程)のメカニズム解明や、タウ伝播を標的とした新たな治療法開発などへの応用が期待される。

この成果はBrain communications誌にて発表し¹、特許登録を行った(特許第6367550号「新規タウオパチーモデルマウスの作製方法」)。

(2)孤発性 AD および PD の早期進行メカニズムの解明

AD、PDの最大のリスクファクターである加齢について、加齢マウスと若齢成体マウスに脳内接種し比較を行ったところ、加齢マウスではタウの伝播が促進されていた。シヌクレインについては現在解析中である。

性差は疾患のリスクファクターとの報告もあるが、統一の見解は未だ得られていない。ADでは罹患男性は罹患女性に比べ死亡リスクが高い(=進行が早い)との報告がある。PDでは男性の発症率が女性に比べ約1.5倍高いとの報告がある。若齢雌雄のマウスを用いて検討したところ、タウの脳内伝播に差は認められなかった。老齢の雌雄では差が出る可能性もあり、今後検討を行う。

ADではタウ蓄積以前に細胞外にアミロイドペプチドが蓄積してできた老人斑が出現する。老人斑の脳内分布は神経変性と直接の関連性は示されていないがADの超早期病態の1つである。一方、PDでは一般的に老人斑は出現しない。老人斑モデルであるAPPノックインマウス(APP NL-G-F knock-in mice)と野生型マウスを用いて比較を行った結果、APPノックインマウスではタウ伝播の促進効果が観察された。シヌクレインについては現在検討中である。

本研究では加齢および老人斑の存在によりタウ伝播が促進されることを明らかにした。今後はこの条件下においてタウ伝播に促進的に働く因子を同定し新規治療法の標的分子創出を目指す。

(3)AD および PD 早期診断マーカーの探索

ELISA 解析によりマウス血清中のタウあるいは シヌクレインに対する自己抗体を測定した結果、解析に用いた全個体において脳内接種直後に自己抗体が産生されピークに達していた。そして時間経過に伴って緩やかに低下する傾向が観察された。これは自己抗体量が脳内の病理量および脳内伝播進行とはリンクしないことを示しており、診断マーカーとしては機能しないと考えられた。脳内接種後に急激に自己抗体が産生された原因については、脳内接種により血液脳関門が物理的に破壊され血中に入ったタウあるいは シヌクレイン線維が免疫反応を惹起したためと考えられこのモデルでの artificial な効果だと考えられた。

<引用文献>

1. Masuda-Suzukake M, Suzuki G, Hosokawa M, Nonaka T, Goedert M, Hasegawa M. Brain Commun. Jul 8;2(2):fcaa091. doi: 10.1093/braincomms/fcaa091. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morgan Sophie A., Lavenir Isabelle, Fan Juan, Masuda-Suzukake Masami, Passarella Daniela, DeTure Michael A., Dickson Dennis W., Ghetti Bernardino, Goedert Michel	4. 巻 295
2. 論文標題 -Synuclein filaments from transgenic mouse and human synucleinopathy-containing brains are major seed-competent species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6652 ~ 6664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012179	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 Masami Masuda-Suzukake, Genjiro Suzuki, Masato Hosokawa, Takashi Nonaka, Michel Goedert, Masato Hasegawa	4. 巻 2
2. 論文標題 Dextran sulphate-induced tau assemblies cause endogenous tau aggregation and propagation in wild-type mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcaa091	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 Ito Kawakami, Atsuko Motoda, Masashi Hashimoto, Aki Shimozawa, Masami Masuda-Suzukake, Reiko Ohtani, Mina Takase, Mari Kumashiro, Kazuyuki Samejima, Masato Hasegawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Progression of phosphorylated -synuclein in Macaca fuscata	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bpa.12952	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 -
1. 著者名 Masuda-Suzukake M., Hasegawa M.	4. 巻 139
2. 論文標題 Prion-like Propagation of Pathological -Synuclein in Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 1007-1013
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.18-00165-4.	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 -

1. 著者名 Lavenir I, Passarella D, Masuda-Suzukake M, Curry A, Holton JL, Ghetti B, Goedert M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Silver staining (Campbell-Switzer) of neuronal α -synuclein assemblies induced by multiple system atrophy and Parkinson's disease brain extracts in transgenic mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0804-5.	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 Masuda-Suzukake M.	4. 巻 154
2. 論文標題 Animal models of synucleinopathies: prion-like propagation of alpha-synuclein in wild-type animals.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 301-305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.301.	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 -

1. 著者名 Morgan SA, Lavenir I, Fan J, Masuda-Suzukake M, Passarella D, DeTure MA, Dickson DW, Ghetti B, Goedert M.	4. 巻 -
2. 論文標題 α -Synuclein filaments from transgenic mouse and human synucleinopathy-containing brains are major seed-competent species.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.012179.	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

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masami Masuda-Suzukake, Masato Hasegawa.
2. 発表標題 Animal models of synucleinopathies: prion-like propagation of alpha-synuclein in non-transgenic animals.
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 鈴掛雅美
2. 発表標題 動物モデルにおける シヌクレイン伝播
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴掛雅美, Michel Goedert, 長谷川成人
2. 発表標題 野生型マウスを用いた新規タウ伝播モデル
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>野生型マウスを用いたタウ蓄積の脳内伝播モデル https://www.igakuken.or.jp/topics/2020/0708.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

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