

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591738

研究課題名(和文)新規認知症モデルマウスの創出と認知症治療薬の開発

研究課題名(英文)Creation of novel model mice for dementia research and development of new medicines for dementia treatment.

研究代表者

細川 雅人(HOSOKAWA, Masato)

公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員

研究者番号：00435116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の新たな薬剤開発・薬物治療へつなげるために、認知症疾患の根本的治療法開発の基盤となる新規認知症モデルマウスを作製した。これらのマウスでは薬剤誘導により神経変性疾患関連タンパク質を過剰発現できることを確認した。まだ加齢が十分でないため、あるいは他の理由により、神経細胞内においてタンパク質の異常凝集は観察されていない。また、別のモデルマウスの解析結果から、グラニューリン遺伝子変異がアルツハイマー病や皮質基底核変性症などのタウオパチーの危険因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nobel mice model regarding dementia research were produced for discovering effective drugs. These mice over expressed neurodegenerative diseases associated protein by doxycycline. The abnormal aggregations of these proteins have not observed in neuronal cells yet because aging of mice is not sufficient or other reasons. The results of the other model mice suggest that granulin mutations might contribute to the pathogenesis or be risk factors for tauopathies, including Alzheimer's disease or corticobasal degeneration.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：認知症 TDP-43 tau 疾患モデルマウス タンパク質異常凝集 グラニューリン

1. 研究開始当初の背景

血管性認知症を除いた主要の認知症性疾患では、タンパク質の異常蓄積が病因と考えられている。例えば、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) では、アミロイド (A β) とタウ、レビー小体型認知症 (dementia with Lewy bodies: DLB) では、A β とタウに加えて α -シヌクレインが蓄積することが知られている。前頭側頭葉変性症 (frontotemporal lobar degeneration: FTLD) は、前頭・側頭葉の神経細胞脱落により人格変化や失語症状を呈する疾患群の総称であり、初老期認知症の中では AD に次いで頻度が高く、時に筋萎縮性側索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS) を合併する。2006 年、TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43) が、FTLD および ALS 患者脳に出現する細胞内蓄積物の主要構成タンパクであることが申請者の所属する研究チームによって明らかにされた [Arai T. et al BBRC. 351:602-611 (2006)]。この発見以後、FTLD の病理分類は主要な凝集タンパクに基づいてなされるようになり、TDP-43 の蓄積によるものを FTLD-TDP、タウの蓄積によるものを FTLD-tau と呼ぶことが 2008 年の国際会議で合意された。

2006 年のもう一つの重要な発見は、TDP-43 蓄積を有する家族性 FTLD の原因遺伝子としてプログラニュリン (progranulin: PGRN) が同定されたことである。PGRN は成長因子の一種であり、炎症、細胞増殖、創傷治癒などの多くのプロセスに関与することが知られている。PGRN の変異の多くでは、中途終始コドンが発生して翻訳が途中で止まり、ナンセンス変異依存分解機構によって変異型 mRNA が分解されるために、正常な PGRN タンパクの発現量が半減することが病因と考えられている。しかしながら、PGRN タンパク量の低下が、どのようにして TDP-43 蓄積につながるのかは不明である。また、最近の研究で、PGRN の異常が AD 発症に関与するとの報告もあり、PGRN の脳での機能と神経変性との関連性に関心が集まっている。

さらに、最近の研究により、TDP-43 の蓄積は他の多くの認知症性神経変性疾患脳においても認められることが明らかとなってきた。認知症性疾患においては複数のタンパク質蓄積が予想外に多く生じていることが明らかになってきている。

TDP-43 異常蓄積の発見以降、タンパク質の複合型の蓄積が、その疾患の臨床像や病理形成機序に関係していることが次々と明らかになったことから、現在すべての変性型認知症疾患において病変重複の見直しが必要となったと考えられる。

2. 研究の目的

前頭側頭葉変性症の原因タンパク質として新たに見いだされた TDP-43 と従来から知られていたタウ、アミロイド、 α -シヌクレインなどのタンパク質との異常蓄積の相互関係を明らかにするために、タンパク質蓄積の重複という観点から、認知症疾患の根本的治療法開発の基盤となる新規認知症モデルマウスを作製する。作出したマウスを用いて異常タンパク質重複蓄積の病理機構を明らかにするとともに、タンパク質の異常凝集を抑制する候補化合物をマウスに投与することにより、認知症の新たな薬剤開発・薬物治療へつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規認知症モデルマウスの作製

ドキシサイクリン誘導型 TDP-43、 α -synuclein トランスジェニックマウスの作製

出生後の任意の時期や、成体になってから遺伝子発現を制御できるように pTRE-Tight vector (Clontech) を用い、TRE (tetracycline responsive element) の下流に

1. TDP-43 (K263E 変異)
2. TDP-43 NLS [78-84]
3. TDP-43 12 [78-84 & 187-192]
4. GFP-TDP-43 12
5. α -synuclein

を組み込んだプラスミドを作製した。作製したプラスミドを直線化したのち、常法によりトランスジェニックマウス (Tg) を作製した。

tetracycline transactivator (tTA) マウスの入手

Doxycycline (Dox) 非投与時に前脳特異的に遺伝子発現が on になるマウスとして、tetracycline transactivator (tTA) を発現する CamK2a-tTA マウス (Dox-off) を Jackson Laboratory より入手した。

TDP-43/tTA、 α -synuclein/tTA マウスの作製

TDP-43 Tg と tTA Tg あるいは α -synuclein Tg と tTA Tg を交配して、TDP-43/tTA、 α -synuclein/tTA マウスを作製した。1-2 ヶ月齢より Dox 不含の餌を食べさせることにより TDP-43 あるいは α -synuclein の発現を誘導した。その後、TDP-43 および α -synuclein の発現を免疫組織化学染色および生化学的解析で確認した。

(2) プログラニュリン低下タウマウスの作

製

P301L タウトランスジェニックマウスと *GRN* ノックアウトマウスを交配し、P301L タウ/*GRN*^{+/-}マウスを作製した。13、19 ヶ月齢の脳を摘出し、イムノブロットング及び免疫組織化学染色をおこなった。

(倫理面への配慮)

実験動物は実験動物の倫理基準に準じて実施した。具体的な実験計画は本報告者の所属研究所における動物実験倫理委員会において承認を受けた。

4. 研究成果

(1) 新規認知症モデルマウスの作製

ドキシサイクリン誘導型 TDP-43 Tg の作製では、TDP-43 の K263E 変異 1 系統、NLS 変異 4 系統、12 変異 1 系統、GFP-12 変異 3 系統の作出に成功した。全系統を Dox-off 系の CamK2a-tTA と交配したマウスでは、それぞれの TDP-43 の発現が免疫組織化学染色および生化学解析で確認された。

-synuclein Tg の作製では、4 系統の作出に成功した。全系統を Dox-off 系の CamK2a-tTA と交配したマウスでは、それぞれの -synuclein の発現が生化学解析により確認された。

これまでに作製・報告された TDP-43 トランスジェニックマウスでは、フェノタイプが出るものは誕生時から後肢の異常・けいれんなどが現れている。世界中で作られている TDP-43 Tg はいずれも同じような状況にある。このような出生時からの TDP-43 の過剰発現による悪影響を除くため、Dox 誘導型の TDP-43 トランスジェニックマウスを作製し、後天的に TDP-43 を過剰発現できることを確認した。まだ加齢が十分でないため、あるいは他の理由により、神経細胞内において TDP-43 の異常凝集体は観察されていない。TDP-43 の異常凝集体が確認される個体が得られたのち、認知機能に関する行動解析実験をおこなう予定である。

(2) プログラニューリン低下タウマウスの作製

イムノブロットングでは 13 ヶ月齢の P301L タウ/*GRN*^{+/-}マウスにおいて、P301L タウマウスに比べ、トリス可溶性画分中のリン酸化タウ量が増加していた。また 19 ヶ月齢では、P301L タウ/*GRN*^{+/-}マウスにおいて界面活性剤不溶性画分中のリン酸化タウ量が増加していた。

免疫組織化学染色では P301L タウ/*GRN*^{+/-}マウスにおいてリン酸化タウ陽性細胞が増加していた。抗リン酸化基質抗体を用いたイムノブロットングで cyclin

dependent kinases (CDKs)によるリン酸化の亢進が観察された。PGRN の減少が CDKs を活性化し、タウのリン酸化を亢進させることが推測された。*GRN* 遺伝子変異が AD や CBD などのタウオパチーの危険因子となる可能性が示唆された。本研究結果は *Journal of neuropathology and experimental neurology* 74: 158-165 (2015) に掲載された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

Progranulin reduction is associated with increased tau phosphorylation in P301L tau transgenic mice.

Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Kondo H, Matsuwaki T, Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H

Journal of neuropathology and experimental neurology 74 158-165

2015 年 2 月. 査読有

DOI:10.1097/NEN.0000000000000158

Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring.

Akitake Y, Katsuragi S, Hosokawa M, Mishima K, Ikeda T, Miyazato M, Hosoda H

Nutrition research 35: 76-87 2015 年 1 月. 査読有

DOI:10.1016/j.nutres.2014.10.014

An autopsied case of corticobasal degeneration showing severe cerebral atrophy over a protracted disease course of 16 years.

Kondo D, Hino H, Shibuya K, Fujisawa K, Kosaka K, Hirayasu Y, Yamamoto R, Kasanuki K, Minegishi M, Sato K, Hosokawa M, Arai T, Arai H, Iseki E

Neuropathology : Epub ahead of print 2014 年 12 月. 査読有

DOI:10.1111/neup.12188

Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks.

Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimozawa A, Akiyama H, Hasegawa M

Acta neuropathologica communications 2: 88 2014 年 8 月. 査読有

DOI:10.1186/PREACCEPT-1296467154135944

Distinct pathways leading to TDP-43-induced cellular dysfunctions.

Yamashita M, Nonaka T, Hirai S, Miwa A, Okado H, Arai T, Hosokawa M, Akiyama

- H, Hasegawa M
Human molecular genetics 23:
4345-4356 2014 年 8 月. 査読有
DOI:10.1093/hmg/ddu152
Differential diagnosis of amyotrophic
lateral sclerosis from Guillain-Barré
syndrome by quantitative
determination of TDP-43 in
cerebrospinal fluid.
Hosokawa M, Arai T, Yamashita M, Tsuji
H, Nonaka T, Masuda-Suzukake M,
Tamaoka A, Hasegawa M, Akiyama H
The International journal of
neuroscience 124(5): 344-349 2014 年
5 月. 査読有
DOI:10.3109/00207454.2013.848440
Tau accumulation in the nucleus
accumbens in tangle-predominant
dementia.
Kawakami I, Hasegawa M, Arai T, Ikeda
K, Oshima K, Niizato K, Aoki N, Omi K,
Higashi S, Hosokawa M, Hirayasu Y,
Akiyama H
Acta neuropathologica communications
2: 40 2014 年 4 月. 査読有
DOI:10.1186/2051-5960-2-40
Pathological features of FTLN-FUS in
a Japanese population: analyses of
nine cases.
Kobayashi Z, Kawakami I, Arai T,
Yokota O, Tsuchiya K, Kondo H,
Shimomura Y, Haga C, Aoki N, Hasegawa
M, Hosokawa M, Oshima K, Niizato K,
Ishizu H, Terada S, Onaya M, Ikeda M,
Oyanagi K, Nakano I, Murayama S,
Akiyama H, Mizusawa H
Journal of the neurological sciences
335: 89-95 2013 年 12 月. 査読有
DOI:10.1016/j.jns.2013.08.035
前頭側頭葉変性症の病理と関連遺伝子
細川雅人、新井哲明
Clinical Neuroscience 第 31 巻第 12 号
pp.1435-1437 2013 年 12 月. 査読無
Microsomal prostaglandin E synthase-1
is induced in alzheimer's disease and
its deletion mitigates alzheimer's
disease-like pathology in a mouse
model.
Akitake Y, Nakatani Y, Kamei D,
Hosokawa M, Akatsu H, Uematsu S, Akira
S, Kudo I, Hara S, Takahashi M
Journal of neuroscience research 91:
909-919 2013 年 7 月. 査読有
DOI:10.1002/jnr.23217
Pyriproxyfen enhances the
immunoglobulin G immune response in
mice.
Sharmin T, Satho T, Irie K, Watanabe
M, Hosokawa M, Hiramatsu Y, Talukder
P, Okuno T, Tsuruda S, Uyeda S, Fukmits
Y, Tamura Y, Nakashima Y, Imoto M, Toda
A, Kashige N, Miake F
Microbiology and immunology 57:
316-322 2013 年 4 月. 査読有
DOI:10.1111/1348-0421.12035
Prion-like spreading of pathological
-synuclein in brain.
Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa
M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann
DM, Hasegawa M
Brain : a journal of neurology 136:
1128-1138 2013 年 4 月. 査読有
DOI:10.1093/brain/awt037
Atypical FTLN-FUS associated with
ALS-TDP: A case report.
Kobayashi Z, Arai T, Yokota O,
Tsuchiya K, Hosokawa M, Oshima K,
Niizato K, Akiyama H, Mizusawa H
Neuropathology 33(1): 83-86 2013 年 2
月. 査読有
DOI:10.1111/j.1440-1789.2012.01325.
x
Familial ALS with FUS P525L mutation:
two Japanese sisters with multiple
systems involvement.
Mochizuki Y, Isozaki E, Takao M,
Hashimoto T, Shibuya M, Arai M,
Hosokawa M, Kawata A, Oyanagi K,
Mihara B, Mizutani T
Journal of the neurological sciences
323(1-2): 85-92 2012 年 12 月. 査読有
DOI:10.1016/j.jns.2012.08.016
Methylene Blue Reduced Abnormal Tau
Accumulation in P301L Tau Transgenic
Mice.
Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M,
Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H,
Hasegawa M
PLoS one 7: e52389 2012 年 12 月. 査読
有 DOI:10.1371/journal.pone.0052389
Molecular analysis and biochemical
classification of TDP-43
proteinopathy.
Tsuji H, Arai T, Kametani F, Nonaka T,
Yamashita M, Suzukake M, Hosokawa M,
Yoshida M, Hatsuta H, Takao M, Saito
Y, Murayama S, Akiyama H, Hasegawa M,
Mann DM, Tamaoka A
Brain : a journal of neurology
135(11): 3380-3391 2012 年 11 月. 査読
有 DOI:10.1093/brain/aws230
Localization of fused in sarcoma (FUS)
protein to the post-synaptic density
in the brain.
Aoki N, Higashi S, Kawakami I,
Kobayashi Z, Hosokawa M, Katsuse O,
Togo T, Hirayasu Y, Akiyama H
Acta neuropathologica 124(3): 383-394
2012 年 9 月. 査読有
DOI:10.1007/s00401-012-0984-6

前頭側頭葉変性症の分子医学
新井哲明, 細川雅人, 野中隆, 長谷川
成人, 秋山治彦, 朝田隆
Dementia Japan 第 26 卷 第 3 号
pp.334-342 2012 年 9 月. 査読無
Long-term oral intake of aluminium or
zinc does not accelerate Alzheimer
pathology in A PP and A PP/tau
transgenic mice.
Akiyama H, Hosokawa M, Kametani F,
Kondo H, Chiba M, Fukushima M, Tabira
T
Neuropathology 32(4): 390-397 2012
年 8 月. 査読有
DOI:10.1111/j.1440-1789.2011.01274.
x

〔学会発表〕(計 21 件)

(国際学会)

Does frontotemporal dementia
associated with chorea suggest the
diagnosis of frontotemporal lobar
degeneration with fused in sarcoma
positive inclusions of the basophilic
inclusion body disease subtype?
Kawakami I, Kobayashi Z, Arai T,
Yokota O, Niizato K, Oshima K,
Hosokawa M, Akiyama H
The 9th International Conference on
Frontotemporal Dementias. Vancouver
(Canada) 2014 年 10 月
Pathological background of the
ventilatory response to hypercapnia
in dementia with Lewy bodies and
Parkinson's disease
Takahashi S, Arai T, Mizukami K, Kondo
H, Oshima K, Niizato K, Hosokawa M,
Akiyama H, Asada T
The 11th International Conference on
Alzheimer's & Parkinson's Diseases.
Florence (Italy) 2013 年 3 月
Inoculation of recombinant
alpha-synuclein fibrils can induce
alpha-synuclein pathology in
wild-type mice
Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa
M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann
D, Hasegawa M
The 11th International Conference on
Alzheimer's & Parkinson's Diseases.
Florence (Italy) 2013 年 3 月
Progranulin reduction affects tau
phosphorylation in P301L tau
transgenic mice
Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M,
Nonaka T, Yamashita M, Matsuwaki T,
Nishihara M, Hasegawa M, Akiyama H
The 11th International Conference on

Alzheimer's & Parkinson's Diseases.
Florence (Italy) 2013 年 3 月
Inoculation of recombinant
alpha-synuclein fibrils can induce
alpha-synuclein pathology in
wild-type mice
Masuda-Suzukake M, Oikawa T, Hosokawa
M, Nonaka T, Hasegawa M
8th International Conference on
Frontotemporal Dementias. Manchester
(United Kingdom) 2012 年 9 月
Methylene blue reduced tau
phosphorylation and aggregation in
P301L transgenic mice
Hosokawa M, Arai T, Nonaka T,
Yamashita M, Suzukake M, Hasegawa M,
Akiyama H
Alzheimer's Association
International Conference 2012 .
Vancouver (Canada) 2012 年 7 月
Screening of The SOD1, TARDBP and FUS
mutations and the pathological
studies in Japanese cases with
familial and sporadic amyotrophic
lateral sclerosis
Arai T, Arai M, Itokawa M, Yoshida M,
Tamaoka A, Kobayashi Z, Hosokawa M,
Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamada
M, Matsui M, Kaji R, Nakajima K, Kuwano
R, Takahashi S, Asada T, Akiyama H
Alzheimer's Association
International Conference 2012.
Vancouver (Canada) 2012 年 7 月
Intracellular seeded aggregation and
cytotoxic model of TDP-43
Nonaka T, Suzukake M, Yamashita M,
Hosokawa M, Akiyama H, Hasegawa M
Alzheimer's Association
International Conference 2012.
Vancouver (Canada) 2012 年 7 月

(国内学会)

プログランニューリンの減少はタウのリン
酸化を亢進させる
細川雅人、新井哲明、増田 - 鈴掛雅美、
近藤ひろみ、松脇貴志、西原真杉、長谷
川成人、秋山治彦
第 33 回 日本認知症学会 パシフィコ
横浜 (神奈川県・横浜市) 2014 年 11 月
妊婦の摂取栄養が子供の脳と精神に及
ぼす影響
秋武義治、桂木真司、細川雅人、池田智
明、細田洋司
第 3 回 日本 DOHaD 研究会学術集会 国
立成育医療研究センター (東京都・世田
谷区) 2014 年 7 月
Analysis of Tau phosphorylation in
Tauopathy using Phos-tag SDS-PAGE
木村妙子、細川智永、堤弘次、初田裕幸、
鈴掛 - 増田雅美、細川雅人、福島寛美、

石黒幸一、秋山治彦、村山繁雄、長谷川成人、久永眞市
第 55 回 日本神経病理学会 学術総合センター（東京都・千代田区）2014 年 6 月
タウトランスジェニックマウスにおいてプログランユリンの減少はタウのリン酸化に影響を与える
細川雅人、新井哲明、増田 - 鈴掛雅美、近藤ひろみ、松脇貴志、西原真杉、長谷川成人、秋山治彦
第 61 回 日本実験動物学会 札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）2014 年 5 月
タウオパチー病理変化の基礎
新井哲明、河上緒、小林禅、野中隆、長谷川成人、細川雅人、秋山治彦、池田研二、朝田隆
第 32 回 日本認知症学会 キッセイ文化ホール（長野県・松本市）2013 年 11 月
アルツハイマー病脳における神経炎症
秋山治彦、下村洋子、近藤ひろみ、羽賀千恵、細川雅人
第 32 回 日本認知症学会 キッセイ文化ホール（長野県・松本市）2013 年 11 月
全経過 16 年で高度な大脳萎縮を呈した皮質基底核変性症の 1 剖検例
近藤大三、井関栄三、笠貫浩史、峯岸道子、新井平伊、細川雅人、新井哲明、日野博昭、藤澤浩四郎、小阪憲司
第 32 回 日本認知症学会 キッセイ文化ホール（長野県・松本市）2013 年 11 月
蓄積 シヌクレインはマウス脳内でプリオン様の伝播能を示す
鈴掛雅美、野中隆、細川雅人、笈川貴行、新井哲明、David M. A. Mann、秋山治彦、長谷川成人
第 86 回 日本生化学会 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）2013 年 9 月
ミルセンによるアジュバント効果とその作用機序
末延竜哉、SHARMIN Tanjina、佐藤朝光、入江圭一、細川雅人、平松征洋、上田紗織、中島幸彦、鹿志毛信広、見明史雄、渡邊峰雄、福光由起、井本真澄、戸田晶久
第 30 回 和漢医薬学会 金沢大学（石川県・金沢市）2013 年 8 月
シヌクレイン線維の脳内接種は野生型マウスにレビー小体様病理を形成させる
鈴掛（増田）雅美、野中隆、細川雅人、笈川貴行、秋山治彦、長谷川成人
第 54 回 日本神経病理学会 タワーホール船堀（東京都・江戸川区）2013 年 4 月
myrcene によるマウスの IgG の産生誘導

とその機序

大森果奈、SHARMIN Tanjina、佐藤朝光、入江圭一、渡邊峰雄、細川雅人、平松征洋、上田紗織、福光由起、中島幸彦、井本真澄、戸田晶久、鹿志毛信広、見明史雄

第 133 回 日本薬学会 パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）2013 年 3 月

レビー小体型認知症とパーキンソン病における延髄の -シヌクレイン陽性構造の比較検討

高橋晶、新井哲明、水上勝義、近藤ひろみ、大島健一、新里和弘、細川雅人、秋山治彦、朝田隆

第 31 回 日本認知症学会 つくば国際会議場（茨城県・つくば市）2012 年 10 月

シヌクレイン線維の脳内接種は野生型マウスにレビー小体様病理を形成させる

鈴掛（増田）雅美、笈川貴行、細川雅人、野中隆、秋山治彦、長谷川成人

第 31 回 日本認知症学会 つくば国際会議場（茨城県・つくば市）2012 年 10 月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.igakuken.or.jp/dementia/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 雅人 (HOSOKAWA, Masato)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・主席研究員
研究者番号：00435116

(2) 連携研究者

秋山 治彦 (AKIYAMA, Haruhiko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・認知症・高次脳機能研究分野・参事研究員
研究者番号：20231839