

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461760

研究課題名(和文) ビトロネクチンによるタウオパチー脳萎縮制御機構の解明とイメージング薬開発

研究課題名(英文) The exploration for key imaging molecules relating to brain accumulation of Vitronectin in the mouse model of Tauopathy

研究代表者

丸山 将浩 (MARUYAMA, Masahiro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授

研究者番号：80396481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：補体成分である膜侵襲複合体(MAC)がVnに相反して攻撃因子として作用することで、脳萎縮に影響を及ぼすことをタウマウス実験によって確認した。Vn欠損タウマウスで認める強い海馬萎縮は、当該メカニズムに起因したものと思われた。Vnと補体系の発現バランスを調節することによってタウオパチー病態制御に繋がるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A final component of complement system, the membrane attack complex (MAC), affects neuronal dissolution which leads to brain atrophy in the mouse model of tauopathy. MAC acted as a raiding factor by contrast with the vitronectin(Vn) for tau crumbling neuron. The serious atrophy at hippocampus made by such mechanism in the Vn deleted model of tauopathy. It seems that the modulation of Vn-complement system controls the pathology in the tauopathy.

研究分野：神経科学

キーワード：ビトロネクチン タウオパチー 膜侵襲複合体 脳萎縮

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(AD)の病態進行を示す指標として主に、臨床症状と画像検査による脳萎縮の変化が挙げられる。ヒトADで病態進行に個人差が存在するように、タウオパチーモデルマウス海馬萎縮の程度に個体差が生じることを確認した。タウオパチー病態においてピトロネクチン(Vn)蓄積が神経保護的に作用する事を明らかにした。しかし如何なる因子に抗してVn蓄積現象が引き起こされているのかまでは明らかにされていない。そこでVnに相対する神経攻撃因子を同定し、病状に個体差を示すモデルマウスの特徴に当てはめてみることを通じて病態を解明し、見出した病態鍵分子を描出するイメージング開発を行いたいと考えた。

## 2. 研究の目的

タウオパチーの病理学的特徴として線維性タウ封入体形成と、線維性変化に至らず細胞死する大きな2つの変化が存在する。ヒト病理学的特徴を忠実に再現するPS19タウモデルマウス(Yoshiyama Y, et al. 2007.)を使用した実験では、線維性封入体形成に至らずに細胞死する変化が本疾患で急速に進行する脳萎縮の主因であることを明らかにした(Maruyama M, et al. Neuron. 2013.)。Vnは補体制御因子として知られており、申請者は局所でのVn蓄積が神経保護の役割を担うこと、タウ病変が発生する際にVn受容体が存在する脳領域に限定してVn蓄積現象を認めることをこれまで報告してきた。そこで、(1)病態進行とVn受容体発現の関係を評価することでVn蓄積メカニズムを明らかにする及び、(2)膜侵襲複合体(MAC)を攻撃因子と見立てて脳萎縮程度との関係性を明らかにするとともに、Vnが枯渇した環境に相

当するVn遺伝子欠損タウマウスでのMAC発現状態を評価することを、併せて行う。こうしてタウオパチーにおけるVn蓄積現象を包括的に解明し且つ、これら動態を可視化するにふさわしい画像化鍵因子を見出すことを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織学的手法による、タウオパチー脳萎縮に伴うVn受容体発現レベルの評価

4、9、14月齢のタウマウス並びに野生型マウスの脳組織切片を使用して、Vn抗体とVn受容体(ITGAV)抗体を用いて共染色を施し蛍光顕微鏡下に観察する。活性化アストロサイト(GFAP)または活性化ミクログリア(iba1)抗体による多重染色を行い、タウマウスと野生型マウス間における染色領域の相違を評価する。

### (2) タウオパチー病変領域における攻撃因子と神経線維発現レベルの評価

Vn欠損マウス(Zheng X, Ginsburg D, et al. 1995.)と交配によって作製したVn欠損タウモデルマウスを用意する。14月齢における野生型、タウマウス、Vn欠損掛け合わせタウマウスをそれぞれMRI測定し、海馬容積を評価する。測定終了後、麻酔下にて解剖して脳組織切片を作製する。抗MAC抗体と抗神経軸索抗体を使って異なる蛍光波長の二次抗体を組み合わせて共染し、蛍光顕微鏡撮影によって得られた染色切片のMACと神経線維シグナル値との関連性を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫組織学的手法による、タウオパ

## チー脳萎縮に伴う Vn 受容体発現レベルの評価

タウオパチーの病変領域において微小顆粒状に Vn が蓄積する現象は、その受容体であるインテグリン サブユニット (ITGAV) が元来発現していない領域では認められず、発現していた領域に一致して確認されることを明らかにしている。Vn 蓄積現象は Vn-受容体相互作用に依存することによって、領域特異的に引き起こされるものと見込んだ。そこで受容体側に観点を置き、ITGAV の発現分布について水平断脳組織を用いてタウマウス/野生型間で比較し評価した。野生型マウスでは嗅内野から歯状回分子層にかけて貫通線維領域に ITGAV 発現を認めるも、CA1~4 の線維層での発現は弱かった(図 1. 上段左側)。活性化グリア染色を組み合わせたことにより、CA1~4 線維層での発現の主体は活性化アストロサイト由来のものであることを確認した(図 1. 下段左側)。一方タウマウスではタウ病変形成が目立ち始める9ヶ月頃より分子層における ITGAV 発現分布にムラが生じ、野生型でほとんど陰性だった CA1~4 領域に陽性化所見の拡大を認めた(図 1. 上段右側)。活性化ミクログリアやアストロサイトマーカーを重染することにより、これらグリア由来 ITGAV 発現増加が、ITGAV 領域拡大化の正体であることを確認した(図 1. 下段右側)。タウマウス分子層ではニューロン由来に加えてグリア由来の ITGAV 発現が増加した訳だが、進行期には分布にムラが生じてむしろ全体的に減少した印象を持った。タウオパチーによってニューロン由来 ITGAV 発現低下を起こし、細胞表面での Vn 取り込みおよび細胞内輸送停滞を呈した結果、Vn 蓄積現象として認めるものと考えられた。ITGAV はニューロンと活

性化グリアの両者に発現することから、ITGAV に代わるニューロン由来に限定した Vn 蓄積現象特異的なマーカーを見出すことでより明瞭な病態解明に繋がると見込まれる。

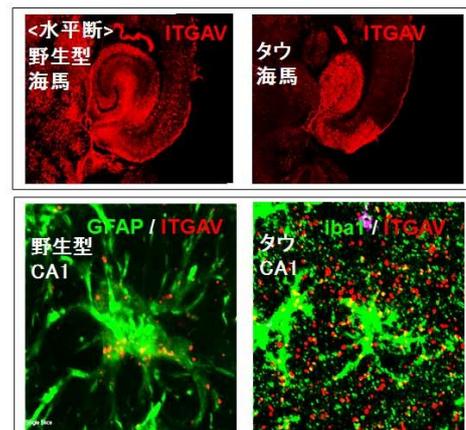


図1. 水平断スライスから見た ITGAV 分布の違い  
上段: 野生型マウスでは貫通線維~歯状回分子層、海馬台に染色像を認める。一方タウマウスでは海馬全体に染色像が拡大する。  
下段: 野生型では活性化アストロサイトに陽性像を、タウマウスではアストログリアだけでなく活性化ミクログリアにも陽性像を認める。

## (2) タウオパチー病変領域における攻撃因子と神経線維発現レベルの評価

炎症の際には補体が活性化し、MAC が形成され細胞の破壊に寄与することが知られている。また Vn は MAC 形成阻害作用を有することが明らかにされている。タウオパチーにおける Vn 蓄積現象は神経保護作用をなしているものと考えてきた。そこで MAC を Vn に相反する攻撃因子とみなして、攻撃因子側の視点に立って評価を行った。14 月齢の野生型、タウオパチーマウス、Vn 欠損掛け合わせタウマウスに高磁場 MRI 撮影を行い、各マウスの T2 強調画像データを用いて歯状回分子層の容積測定を行った。月齢が一致しているにもかかわらずタウマウスは萎縮程度にばらつきを認めた。容積の平均中央値を境に、低萎縮群、高萎縮群に分けた。撮影終了後に脳摘出を行った組織を用いて免疫組織学的評価を行った。野生型および低萎縮タウマウスの歯状回では神経軸索の発現が保たれて

いたが、高萎縮タウマウス、Vn欠損タウマウスでは発現が低下していた。一方、野生型および低萎縮タウマウスの歯状回ではMAC発現が低下していたが、高萎縮タウマウス、Vn欠損タウマウスでは発現が増加していた。このことからタウオパチー海馬萎縮に寄与する軸索の消失とMAC発現間に相対関係があることを確認した(図2.上段)。また、14月齢のタウマウス海馬切片を用いてMAC発現を層毎に比較して観察すると、低萎縮タウマウスではVnが蓄積している歯状回分子層でのMAC発現が低く、Vnが蓄積しないCA1で増加していた個体例が存在した(図2.下段)。その一方で、海馬萎縮が高度な個体では歯状回分子層を含む海馬全体にMAC発現増加が及んでおり、Vn欠損タウマウスも同様であった。また補体活性化の初期反応としてグリアに補体受容体C5aRの発現増加を確認した。これら一連の結果から勘案するに、Vnが蓄積する局所では補体侵襲に伴う炎症や細胞破壊が制御されているものと思われた。タウオパチーにおけるVn蓄積現象は病態進行によって発生する補体炎症に抗する生理的な防御反応であり、個々のタウマウスで引き起こされるこれら一連の現象の程度の違いがイメージングで計測される脳萎縮程度の個体差として反映されたものと考えられた。補体シグナル因子を病態鍵分子とみなしイメージング標的として病態を可視化することで、タウオパチー病態解明に繋げることが可能となると思われる。

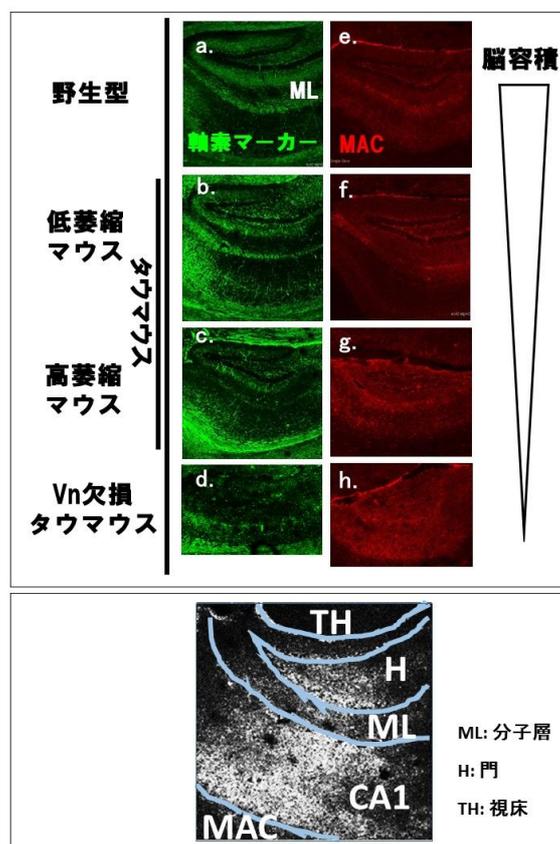


図2. 冠状断スライスから見た軸索およびMAC局在の違い  
 上段: 上より野生型、低萎縮タウマウス、高萎縮タウマウス、Vn欠損タウマウス。萎縮が高度になる程、軸索染色が低下(a→d)し、MAC染色が増加(e→h)する。  
 下段: 低萎縮タウマウスのMAC染色像。CA1ではMACの陽性化を認めるも、Vnが蓄積している分子層では陽性化が目立たない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Maruyama M, Higuchi M. Mechanic insights into tauopathies obtained from mouse model experiments in development of tau imaging agents. *Dementia Japan*. (査読有) 30: 303-309. (2016)
- 2) Maruyama M, Shimada H, Zhang MR, Suhara T, Higuchi M. Visualization of tau pathology in living mouse model and human tauopathies including Alzheimer's disease. *NIRS Annual Report*. (査読有) 2013-2014:46-47. (2014)

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) 丸山 将浩, タウ封入体イメージング開発におけるモデルマウス実験を通じて見えてきたもの, 第 34 回日本認知症学会学術集会, 2015 年 10 月 02 日, リンクステーションホール青森・ホテル青森, 青森県・青森市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 将浩(MARUYAMA, Masahiro)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授  
研究者番号：80396481