

令和元年6月18日現在

機関番号：82502

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26117008

研究課題名(和文)脳イメージングを基軸としたタンパク質老化モデルの治療評価系の開発

研究課題名(英文)Development of imaging-based diagnostic procedures for brain protein aging

研究代表者

佐原 成彦(Sahara, Naruhiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 脳機能イメージング研究部・グループリーダー(定常)

研究者番号：40261185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 87,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタウオパチー治療評価系の確立を目指し、小動物PETイメージング、形態核磁気共鳴イメージング、二光子顕微鏡を用いた蛍光イメージングによるマウスモデルの生体脳イメージングプラットフォームの構築を進めてきた。マウスの加齢依存的な脳萎縮、タウ病変([¹¹C]PBB3によるタウPETイメージング)、神経炎症(TSP0-PETイメージング)を定量的に評価し、これらマクロイメージングによる病態評価系を確立した。さらに第2世代タウPETトレーサーを用いたPETイメージングにより高感度・低バックグラウンドの検出システムが実現し、より早期のタウ病変の検出が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの神経変性疾患では脳内に不要なタンパク質の沈着物が出現する。老化に伴い不要なタンパク質の沈着が増大することから、これらタンパク質の沈着が疾患の発症原因ではないかと考えられてきた。本研究では、疾患動物モデルにPET、MRIなどの生体イメージング技術を適用し、病態進行度を評価しうる実験系を確立した。今後、認知症の根本治療薬の評価系として活用されることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Aims of this project are to develop biomarkers and to establish diagnostic procedures for brain protein aging. During past 5 years, rTg4510 transgenic (tg) mice expressing P301L mutated tau and non-tg mice were examined with brain MRI and PET imaging. PET studies with [¹¹C]PBB3 and [¹¹C]AC-5216 tracers, which labeled tau pathology and TSP0, revealed age-dependent increases, and correlated with age-dependent volume reduction in the forebrain on MRI. Histochemical analyses confirmed the relevance of pathological tau accumulation and elevated TSP0 immunoreactivity in putative microglia. Our results indicate that in vivo imaging of animal models is able to explore the temporospatial relationship among tau deposition, neuroinflammation and neuronal loss. Non-invasive PET imaging combined with transgenic mouse models can be a powerful experimental tool to investigate mechanisms of neurodegenerative diseases and evaluate therapeutic interventions.

研究分野：神経化学、認知症学

キーワード：タウ 脳イメージング タウオパチー マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳内における神経回路破綻・神経変性の原因や精神・神経変性疾患の発症機構はいまだ解明されていない。本領域研究では「脳タンパク質老化」を基軸とした分子レベルから個体レベルまでの毒性・病原性獲得メカニズムの解明を目指している。例えば、アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症、レビー小体型認知症など神経変性型認知症では、それぞれ アミロイド、TDP-43、タウ、FUS、 α -シヌクレインなどのタンパク質が老化し、生理機能を喪失し、機能分子との作用を失い病原性を獲得し、その病原性が神経細胞に蓄積し広がることが脳機能を支える神経回路の破綻をきたすと考えられている。この一連の病原性拡散経路が、認知症に至る神経変性の根本的分子基盤ではないかという仮説のもと、脳タンパク質老化研究は、これらのタンパク質の蛋白化学的研究にとどまらず、分子・細胞・個体レベルの多角的なアプローチが求められる。

我が国が既に国民の4人に1人が65歳以上という超高齢化社会に突入していることや、いまだアルツハイマー病を含めた精神・神経変性疾患の根本治療法が確立していないことなどから、脳老化研究の重要性は揺るぎない。例えば、アルツハイマー病研究では、老人斑と呼ばれる脳内の アミロイドペプチド沈着物の形成がアルツハイマー病発症の原因であるという仮説 (アミロイドカスケード仮説; Selkoe 1991 *Neuron*, Hardy and Selkoe 2002 *Science*) に基づいてアミロイドを標的とした治療法開発が進められてきたが、そのほとんどが失敗に終わっている。最近になって、アルツハイマー病のもう一つの病理像である神経原線維変化の主要構成成分であるタウ蛋白が新しい治療法の標的として注目を集め、動物モデルの作製、分子レベルの機能解析が積極的に進められている。神経原線維変化の脳内分布と神経脱落の部位が相関することから、タウが神経毒性を発揮するという説が主流になりつつあるが、毒性の本体はいまだ明らかになっていない。一方で、多くの神経変性疾患では、特定領域の病理変化が時間経過とともに周辺領域に拡散する現象が共通した特徴として存在する。この現象は、異常凝集蛋白のプリオン様伝播による病変拡大を意味する「プリオン仮説」として共通認識が得られている (Frost and Diamond 2010 *Nature Rev*)。タウ毒性発症機序においても異常凝集タウ蛋白の伝播が積極的に関与しているという説が有力であり、我々もヒト変異タウ (P301L) を発現するマウスモデルにおいて、老化タウ蛋白がシナプス連絡を介して近隣のニューロンに伝播し、内因性のタウを巻き込んで凝集することを明らかにした (de Calignon et al. 2012 *Neuron*)。さらに我々は、タウの生体イメージング技術を開発し、タウオパチーのマウスモデルおよびアルツハイマー病患者脳におけるタウの可視化に成功した (Maruyama et al. 2013 *Neuron*)。我々の研究グループでは、タウ PET イメージング、形態 MRI、マンガン造影 MRI (Perez et al. 2013 *Mol Neurodegen*)、拡散 MRI (Sahara et al. 2013 *Neurobiol Aging*) をタウオパチーマウスモデルに適用した実績を持つことから、世界に先駆けて生体イメージングを基軸としたタンパク質老化モデルの治療評価系の開発研究に着手した。

2. 研究の目的

現在、アルツハイマー病を代表とした認知症の分子基盤は、老化因子としての アミロイドやタウ蛋白などが病原性を獲得するとともに脳内で蓄積し、領域から領域へと伝播していくことにより神経回路の破綻をきたすことで説明できると考えられている。本研究では、脳タンパク質老化の進展メカニズムの解明と精神・神経変性疾患の治療を目的として、生体イメージング技術を駆使した治療評価系の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、生体脳における脳病理像を可視化する老化タンパク質プローブの開発を推進し、タンパク質老化の診断・治療評価を可能とするイメージングバイオマーカー探索を行う。また、タンパク質老化に伴う脳機能の低下を可視化するイメージング技術を開発する。一方で、生理的タンパク質から病原タンパク質への転移に伴い、加齢依存的に進行性の脳機能低下を呈する動物モデルを用いて、脳タンパク質の構造異常とその伝播機構の解明研究から導き出される標的分子を同定し、タンパク質老化を阻止しうる治療薬剤の開発に役立てる。

本研究では特に、加齢依存的なタウ病態と脳萎縮を発症することが知られている rTg4510 mouse (Santacruz et al. 2005) を用いて、ポジトロン断層撮像法 (PET)、核磁気共鳴画像法 (MRI)、二光子顕微鏡による蛍光イメージング撮像などの生体イメージング実験を実施することで、脳タンパク質老化の診断・治療評価系の確立を目指した。

4. 研究成果

研究期間内で明らかとなった主要な研究成果について下記に示す。

rTg4510 マウスのマルチモーダルイメージング技術による病態評価: これまで rTg4510 マウスの MRI、 $[^{11}\text{C}]\text{PBB3}$ によるタウ PET イメージング、神経炎症を評価する TSP0 (18 kDa Translocator protein)-PET イメージングを実施し、生体における病態進行度の評価を行なった。タウ PET と TSP0-PET との相関を調べることで、タウ病変に呼応して神経炎症が上昇する傾向が明らかとなった。また、PET データがタウ病変、TSP0 蛋白発現を正確に反映していることを証明するため死後脳の病理解析を行い、PET との相関関係を調べたところ、確かにこれらの生体イメージングが病理像を反映していることを突き止めた (Ishikawa et al. 2018 *J. Alzheimer's Disease*)。

また、恒常性ミクログリアマーカーの一つである P2Y12 受容体の発現量が若年期の rTg4510 マウスで減少することを突き止めた。別のタウオパチーマウスモデルにおいてもタウ病態依存的に P2Y12 受容体の減少が認められたことから、タウ病態とミクログリアの活性化が密接に関係していることが明らかとなった。以上の結果を参考にして神経炎症を標的としたバイオマーカーの開発が今後一層進展することが期待される (Sahara et al. 2018 *JAD*)。

ヒト疾患を対象とした¹¹C]PBB3-PET イメージング画像病理相関研究: 紀伊半島の筋萎縮性側索硬化症・パーキンソン認知症認知症複合(Kii ALS/PDC)、タウ遺伝子変異 N279K を有する家族性前頭側頭型認知症、進行性核上性麻痺をそれぞれ対象とした¹¹C]PBB3-PET ヒト臨床研究を実施する過程で死後脳を用いた神経病理学的解析を手掛け、PBB3 の結合性が免疫組織化学的に検出されるタウ病変と一致することを証明した (Shinotoh et al. 2019 *Neurology*; Ikeda et al. 2019 *Movement Disorder*; Endo et al. 2019 *Movement Disorder*)。

PBB3 リガンドの結合特性の評価: PBB3 のタウ病変に対する親和性を検証する目的で、2 系統のマウスモデル (rTg4510 マウス、PS19 マウス) とヒト剖検脳を用いて *in vitro* と *in vivo* における定量解析を行なった。その結果、いずれのマウスモデルにおいても *in vitro* と *in vivo* における PBB3 結合性は有意な相関が認められた。さらに、マウスモデルとヒトにおいて同等の結合親和性が確認された。すなわち、マウスモデルの病態評価系としての有用性が確認された。

加えて、PBB3 は MAO-A/MAO-B 阻害剤による競合阻害が認められなかったことから MAO は PBB3 の off-target となる可能性が低いことが証明された (Ni et al. 2018 *J. Nuclear Medicine*)。

タウ PET リガンド結合部位解析: 2017 年英国の研究グループよりアルツハイマー病脳由来タウ凝集体のクライオ電顕による分子構造解析データが発表された (Fitzpatrick et al. 2017 *Nature*)。詳細な構造データをもとにタウ線維上での PBB3 結合部位を探索する目的で Molecular Docking Simulation を行なった。その結果、タウ線維のコア領域 (349-351RVQ、364-369PGGGNK、351-353QSK) に シート線維に対して垂直に結合する可能性が見出された (Goedert et al. 2018 *Frontiers in Neurology*)。

タウ凝集体伝播細胞モデルの確立: 通常、タウ蛋白は培養細胞中で高発現させただけでは細胞内凝集体形成を誘導できない。近年、線維化したタウ凝集体をタウ発現細胞に導入することで、細胞内でのタウ凝集体を誘導できることが明らかになった。本研究班では独自に、タウ凝集体が yeast-prion 様に継代していく細胞株を樹立し、その細胞内タウ凝集体が PBB 化合物で標識されることを確認した。本細胞株を用いて凝集阻害剤ならびにタウ伝播抑制分子の同定を目指したハイスループットドラッグスクリーニングシステムを構築した (Matsumoto et al. 2018 *IJMS*)。

本研究の最大の成果は、ヒト臨床研究と動物モデル研究で共通した生体イメージング技術を用いた病態評価系を確立できたことである。タウ蛋白凝集過程またはタウ病態で見られる神経毒性の可視化が可能となったことから、今後、タウ病変に関連した薬剤開発が加速することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

1. Sharma G 以下 14 名 Sahara N (6 番目) Tau isoform expression and phosphorylation in marmoset brains. *JBC* 2019 Jun 5. pii: jbc.RA119.008415. 査読有 doi: 10.1074/jbc.RA119.008415. [Epub ahead of print]
2. Hashimoto S 以下 8 名 Sahara N (5 番目) Tau binding protein CAPON induces tau aggregation and neurodegeneration. *Nature Communications* 2019 Jun 3;10(1):2394. 査読有 doi: 10.1038/s41467-019-10278-x.
3. Endo H 以下 16 名 Sahara N (3 番目) In-vivo binding of a tau imaging probe, [¹¹C]PBB3, in patients with progressive supranuclear palsy. *Movement Disorders* 2019 Mar 20. [Epub ahead of print] 査読有 doi: 10.1002/mds.27643.
4. Ikeda A 以下 13 名 Sahara N (11 番目) Clinical heterogeneity of FTDP-17 caused by MAPT N279K mutation in relation to tau PET features. *Movement Disorders* 2019 Feb 17 [Epub ahead of print] 査読有 doi: 10.1002/mds.27623.
5. Shinotoh H 以下 15 名 Sahara N (13 番目) Tau imaging detects distinctive distribution of tau pathology in ALS/PDC on the Kii Peninsula. *Neurology* 2019 Jan 8;92(2):e136-e147, 査読有 DOI: 10.1212/WNL.0000000000006736.
6. Matsumoto G 以下 6 名 Sahara N (6 番目) Tau fibril formation in cultured cells compatible with a mouse model of tauopathy. *International Journal of Molecular Sciences* 2018 19, 1497, 査読有 DOI:10.3390/ijms19051497
7. Goedert M, Yamaguchi Y, Mishra S, Higuchi M, Sahara N. Tau filaments and development of positron emission tomography (PET) tracers. *Frontiers in Neurology* 2018, 9, 70 査読有 DOI 10.3389/fneur.2018.0070

8. Ruiqing N 以下 9 名、Sahara N (4 番目) Comparative in-vitro and in-vivo quantifications of pathological tau deposits and their association with neurodegeneration in tauopathy mouse model J. Nuclear Medicine 2018, online, 査読有 DOI 10.2967/jnumed.117.201632
9. Sahara N 以下 5 名 Microglial activation during pathogenesis of tauopathy in rTg4510 mice: implications for the early diagnosis of tauopathy J. Alz. Disease 2018, 64, S353-S359 査読有 DOI 10.3233/JAD-179933
10. Sahara N 以下 6 名 In vivo tau imaging for a diagnostic platform of tauopathy using the rTg4510 mouse line. Frontiers in Neurology 2017, 8, 663 査読有 DOI 10.3389/fneur.201700663
11. Koga S, Ono M, Sahara N, Higuchi M, Dickson DW. Fluorescence and autoradiographic evaluation of tau PET ligand PBB3 to alpha-synuclein pathology. Movement Disorders 2017, 32, 884-892 査読有 DOI 10.1002/mds.27013
12. Ishikawa I 以下 15 名 Sahara N (1 6 番目) In vivo visualization of tau accumulation, microglial activation, and brain atrophy in a mouse model of tauopathy rTg4510. J. Alz. Disease 2018, 61, 1037-1052 査読有 DOI 10.3233/JAD-170509
13. Ono M, Sahara N (2 番目)以下 15 名 Distinct binding of PET ligands PBB3 and AV-1451 to tau fibril strains in neurodegenerative tauopathy. Brain 2017, 140, 764-780 査読有 DOI 10.1093/brain/aww339
14. Higuchi M, Ji B, Maeda J, Sahara N, Suhara T. In vivo imaging of neuroinflammation in Alzheimer ' s disease. Clinical and Experimental neuroimmunology 2016, 7 , 139-144 査読有 DOI 10.1111/cen3.12308
15. Imamura K, Sahara N (2 番目) 以下 16 名 Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLD patient iPSC-derived neurons. Scientific Reports 2016, 10, 34904 査読有 DOI 10.1038/srep34904
16. Kimura Y 以下 13 名 Sahara N (12 番目)PET quantification of tau pathology in human brain with 11C-PBB3. J. Nuclear Medicine 2015, 56, 1359-1365 査読有 DOI 10.2967/jnumed.115.160127
17. Shimojo M, Higuchi M, Suhara T, Sahara N. Imaging multimodalities for dissecting Alzheimer ' s disease: advanced technologies of positron emission tomography and fluorescence imaging. Frontiers in Neuroscience 2015, 9, 482 査読有 DOI 10.3389/fnins.2015.00482
18. Sahara N, Murayama M, Higuchi M, Suhara T, Takashima A Biochemical distribution of tau protein in synaptosomal fraction of transgenic mice expressing human P301L tau. Frontiers in Neurology 2014 Mar 11;5:26:1 査読有 doi: 10.3389/fneur.2014.00026. eCollection 2014
19. Sahara N, 以下 5 名 Tau oligomers as potential targets for early diagnosis of tauopathy. J. Alzheimer ' s Disease 2014 40(0):S91-6 査読有 doi: 10.3233/JAD-132429

〔学会発表〕(計 15 件)

1. Sahara N, 以下 14 名 Microglia engulfment of tangle-bearing neurons in a living tauopathy model Neuroscience 2018, Society for Neuroscience, San Diego USA 2018-11-05 Nanosymposium
2. Sahara N, 以下 10 名 Neuroinflammatory process during pathogenesis of tauopathy in rTg4510 mice Advances in Neurodegenerative Disease Research and Therapy, Keystone Symposia, Keystone CO 2018-06-20 Short talk
3. Sahara N, Kimura T, Matsumoto G. Investigating combinatory phosphorylation of tau in a propagation model of tauopathy. Neuroscience 2017, Washington DC, USA
4. Sahara N 以下 12 名 Visualization of microglial response to tau-induced neurodegeneration in a model of tauopathy. Alzheimer ' s Association International Conference 2017, London UK
5. 佐原成彦 タウを標的とした診断・治療薬開発の現状 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会 2017 札幌
6. Sahara N 以下 11 名 In vivo multimodal imaging of tauopathy revealed a rapid turnover of pathological tau inclusions in a tauopathy mouse model. Neuroscience 2016, San Diego, USA
7. Sahara N 以下 10 名 Investigating the link between pathological tau accumulation, neuroinflammation and brain atrophy in a model of tauopathy. Alzheimer ' s Association International Conference 2016, Toronto Canada
8. 佐原成彦 タウオパチーマウスモデルを用いた脳タンパク質老化モデル評価系の確立 日本薬理学会 2016 長崎
9. Sahara N 以下 12 名 Longitudinal in vivo imaging of tauopathy, microglial activation and neuronal loss in a mouse model of tauopathy. Neuroscience 2015, Chicago, USA

10. 佐原成彦 タウオリゴマー研究の総括と今後の展望 第34回日本認知症学会 2015 青森
11. Sahara N以下10名 Utility of tau imaging probe PBB3 on a mouse model of tauopathy. Alzheimer's Association International Conference 2015, Washington DC, USA
12. Sahara N, 以下9名 Visualization of tau lesions in brains of tauopathy patients and model mice using tau ligand PBB3 Neuroscience 2014, Society for Neuroscience, Washington DC USA 2014-11-17 Nanosymposium
13. Sahara N Tau imaging: the frontier of neuroimaging in neurodegenerative disease Autonomous University of Madrid, Madrid Spain 2014-09-26 Seminar
14. Sahara N Tau PET imaging: New insight into early diagnosis of tauopathy 2nd International Conference on Alzheimer's Disease & Dementia, OMICS Publishing Group, Valencia Spain 2014-09-23 Symposium
15. Sahara N, 以下5名 Age-related white matter pathogenesis in a mouse model of tauopathy Alzheimer's Association International Conference 2014, Alzheimer's Association, Copenhagen, Denmark 2014-07-13 Oral Presentation

〔図書〕(計 2件)

1. Sahara N* and Kimura T. Biochemical properties of pathology-related tau species in tauopathy brains: an extraction protocol for tau oligomers and aggregates. Amyloid proteins: methods and protocols, third edition. p. 435-445. Sigurdsson EM, Calero M, Gasset M. Springer, 2018 (Book chapter)
2. Ren Y, Sahara N, Giasson B, and Lewis J*. Tauopathy mouse models. In Movement Disorders 2nd edition, Edited by LeDoux MS, Academic press 2015, p849-855 (Book Chapter) DOI: 10.1016/B978-0-12-405195-9.00055-X

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: FTLDの予防又は治療剤及びそのスクリーニング方法

発明者: 井上治久、今村恵子、樋口真人、佐原成彦、須原哲也

権利者: 国立大学法人京都大学 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

種類: A61P25/00

番号: PCT/JP2017/036520

出願年: 2017

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山口 芳樹

ローマ字氏名: Yamaguchi Yoshiki

所属研究機関名: 国立研究開発法人理化学研究所

部局名: 開拓研究本部

職名: 研究員

研究者番号(8桁): 90323451

(2)研究協力者

研究協力者氏名：樋口 真人
ローマ字氏名：Higuchi Makoto

研究協力者氏名：松本 弦
ローマ字氏名：Matsumoto Gen

研究協力者氏名：南本 敬史
ローマ字氏名：Minamimoto Takafumi

研究協力者氏名：青木 伊知男
ローマ字氏名：Aoki Ichio

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。