

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06793

研究課題名(和文) 生体脳マルチモーダルイメージング技術によるタウ毒性発症機序の解明

研究課題名(英文) Investigation for understanding the mechanisms of tau-induced neurotoxicity by using multimodal in vivo imaging techniques

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・チームリーダー(定常)

研究者番号：40261185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：老年性認知症の根本的治療法は未だ確立していない。近年、タウ蛋白を標的とした治療戦略が注目を集めている。本研究ではタウ蛋白の毒性獲得に起因する認知症発症メカニズムの解明を目指して、マウス認知症モデルを用いてポジトロン断層撮影法(PET)、核磁気共鳴画像法(MRI)、二光子顕微鏡などによる生体脳マルチモーダルイメージング研究を行なった。生体脳を解析することで毒性をもったタウ分子の時間・空間的变化を追跡することが可能となり、前臨床試験に資する治療評価系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Association of tau deposition with neurodegeneration in Alzheimer's disease and related tau-positive neurological disorders indicates contribution of tau aggregates to neurotoxicity. In vivo visualization of tau accumulation would offer a reliable, objective index to aid in the diagnosis of tauopathy and to assess the disease progression. Positron emission tomography (PET) imaging of tau lesions is currently available using several tau PET ligands. Because most tau PET ligands have the property of an extrinsic fluorescent dye, these ligands are considered to be useful for both PET and fluorescence imaging. Using these advanced imaging techniques, we developed a unique diagnostic platform of in vivo imaging of tau-, neuroinflammation-PET, and volumetric MRI. Brains of living mice can be used to monitor their volume, pathological tau accumulation and neuroinflammation. Moreover, live cell imaging with two-photon microscopy allows us to capture NFT formation and neuronal death in mice.

研究分野：神経化学

キーワード：タウ in vivo imaging 神経毒性

1. 研究開始当初の背景

我が国は既に国民の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。さらに、65歳以上の高齢者のうち認知症とその予備軍となる高齢者の割合が25%に達すると言われている。残念ながら、現時点では認知症の根本治療法は確立していない。一方で、家族性疾患の遺伝子変異同定研究を契機にアルツハイマー病を含めた精神・神経変性疾患の病態解明を目指した基礎研究は20数年以上続けられている。老人斑と呼ばれる脳内のβ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)をもとに、β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。アミロイドカスケード仮説の衰退により、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を形成するタウ蛋白が新しい治療法の標的として注目を集めている。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。最近、神経原線維変化の前駆体である凝集中間体が毒性の本体である可能性が議論されているが未だ不明な点が多い。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特徴的である。これには「プリオン仮説」と呼ばれる異常凝集蛋白伝播による病変拡大の可能性が示唆されている(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、生体内における異常凝集タウ蛋白伝播の事実を証明することが急務となっている。

2. 研究の目的

老年性認知症の半数以上を占めるアルツハイマー病の根本的治療法は未だ確立していない。近年、神経原線維変化の主要構成成分であるタウ蛋白を標的とした治療戦略が注目を集めている。ヒト脳における神経原線維変化形成過程は、本来、自己凝集能を持たないタウ蛋白が二量体を起点として凝集が始まると考えられる。本研究は毒性タウ分子種の同定とそれに関連する病態の可視化を目的とし、タウオパチー動物モデルを用いてポジトロン断層撮影法(PET)、核磁気共鳴画像法(MRI)、二光子顕微鏡などによる生体脳マルチモーダルイメージング研究を実施した。生体脳を解析することで毒性をもったタウ分子の時間・空間的变化を追跡し、タウ毒性メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究ではタウオパチーマウスモデルとして家族性前頭側頭型認知症のP301L変異を有するヒト型タウ蛋白質の発現を薬剤投与によって制御可能なトランスジェニックマウス(rTg4510 mouse line, Santacruz et al. 2005)の脳病態の評価を行なった。本マウスモデルは、CaMKIIプロモーター依存的にヒト型タウ蛋白質を発現し、約6ヶ月齢で神経病理学的なタウたんぱく質の神経細胞内封入体の出現を認める。これまでの死後脳解析の結果を踏まえて、本研究ではrTg4510マウス(2.5から14ヶ月齢、n=17)について形態MRIを行うことで加齢依存的な脳萎縮の有無を生体レベルで確認し、タウPET([¹¹C]PBB3-PET)、神経炎症PET(TSPO: [¹¹C]AC-5216-PET)を行うことで病態の進行度を評価した。PETシグナルは脳・海馬領域における各リガンドの集積量を小脳比として算出した。さらに死後脳切片を用いてPBB3蛍光染色とタウ、TSPO、Iba1(マイクログリアマーカー)、GFAP(アストロサイトマーカー)抗体による免疫組織染色を行い、PETデータと神経病理像との相関について検討した。

4. 研究成果

(1)rTg4510マウスにおける脳萎縮の進行
 大脳皮質、海馬、線条体、脳幹、小脳の領域について各月齢における体積を測定した結果、14ヶ月齢のrTg4510マウス大脳皮質、海馬、線条体では野生型マウスに比べて約50%となっていることが明らかとなった。2.5ヶ月齢のrTg4510マウス大脳皮質、海馬、線条体、あるいは全ての月齢のrTg4510マウス脳幹、小脳では野生型マウスとの違いは顕著でなかったことから、大脳皮質、海馬、線条体領域に特徴的な加齢に伴う脳萎縮が進行することが明らかとなった。

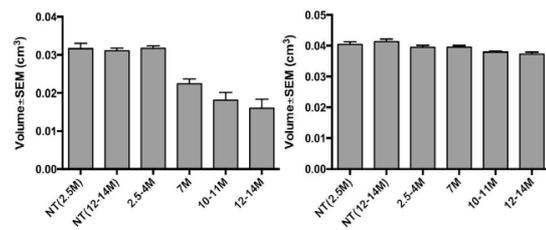
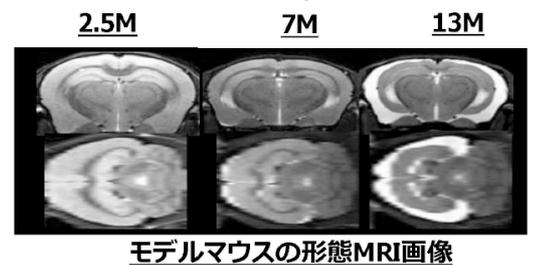


図1、rTg4510マウス形態MRI画像と脳体積(左:大脳皮質、右:小脳)

(2) Tau-PET イメージング

rTg4510マウスは神経病理学的知見よりヒト

病態と同等のタウ病変を呈することが知られている。放医研にて開発されたタウ PET トレーサー $^{[11C]}$ PBB3 (Maruyama et al. 2013) を用いて、生体におけるタウ病変の検出を試みた。 $^{[11C]}$ PBB3 投与後 60 分間の撮像を行い、大脳皮質・海馬を含む脳領域におけるシグナルを同一個体の小脳におけるシグナルで補正した値を解析した結果、12-14 ヶ月齢の rTg4510 マウスにおいて、 $^{[11C]}$ PBB3 シグナルが野生型マウスと比べて有意に高いことが明らかとなった。また、加齢依存的なシグナルの上昇も確認された。

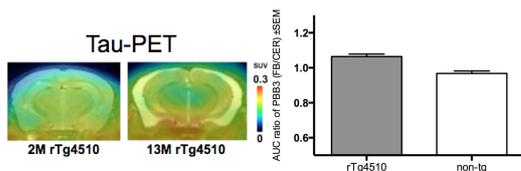


図 2、 $^{[11C]}$ PBB3-PET 画像と野生型マウスとのシグナル比較

(3) 神経炎症 PET イメージング

神経炎症におけるミクログリアやアストロサイトの反応性をミトコンドリア内膜蛋白である translocator protein (TSPO: 末梢性ベンゾジアゼピン受容体) の活性化で評価することが可能である (Banati et al. 2000)。放医研では TSPO を標的とした PET トレーサーを開発し、これまで複数の神経変性疾患マウスモデルで評価してきた (Maeda et al. 2008)。本研究では、rTg4510 マウスにおけるタウ病態の進行と神経炎症との関連性を探るため、 $^{[11C]}$ AC-5216 トレーサーによる TSPO-PET イメージングを行なった。その結果、12-14 ヶ月齢の rTg4510 マウスにおいて、 $^{[11C]}$ AC-5216 シグナルが野生型マウスと比べて約 60% 高く、2 か月齢から 14 か月齢に至るまで加齢依存的にシグナルが上昇することを確認した。さらに rTg4510 マウスにおける $^{[11C]}$ AC-5216 シグナルの上昇は $^{[11C]}$ PBB3 シグナルの上昇と相関し、大脳皮質の容積とは逆相関することが明らかとなった。すなわち、生体イメージング解析によって、脳萎縮、タウ病変、神経炎症の 3 つの因子それぞれに関連性があることを本研究で初めて明らかにしたと言える。

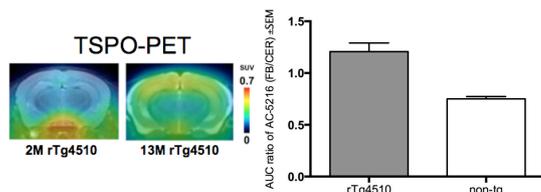


図 3、 $^{[11C]}$ AC-5216-PET 画像と野生型マウスとのシグナル比較

(4) PET シグナルとタウ病変、ミクログリア活性との関連性

$^{[11C]}$ PBB3、 $^{[11C]}$ AC-5216 はそれぞれ凝集性タウ、TSPO 蛋白を標的とした PET トレーサーである。RTg4510 マウスにおいて、これらのトレーサーが確かにタウ病変、ミクログリアの活性化を捉えていることを証明するため、イメージング解析を行ったマウスの死後脳標本を用いた病理解析を行った。まず、PBB3 リガンドは PET トレーサーとして活用されると同時に、 β シート構造を標識する蛍光リガンドとしても有用である。この特性を生かして、PBB3 とリン酸化タウ抗体 (AT8) による二重染色を行ったところ、確かに、PBB3 が rTg4510 マウスのタウ病変を検出する事が確認された。PBB3 蛍光染色と、AT8 陽性細胞を定量的に比較したところ、有意な相関が認められた。さらに、これらの値は $^{[11C]}$ PBB3 シグナルとも有意な相関がある事がわかった。次に、TSPO の病理学的評価を行った。脳内において TSPO はグリア細胞や血管で検出されるが、rTg4510 マウスでは加齢依存的に TSPO 陽性染色が上昇する。この上昇はミクログリアマーカー Iba1 の染色性の上昇と一致する。TSPO、Iba1 あるいは GFAP との二重染色の結果、rTg4510 マウスでは TSPO は主にミクログリアで発現 (活性化) している事が明らかとなった。TSPO 染色性の定量値と $^{[11C]}$ AC-5216 シグナルに有意な相関があることも確認された。

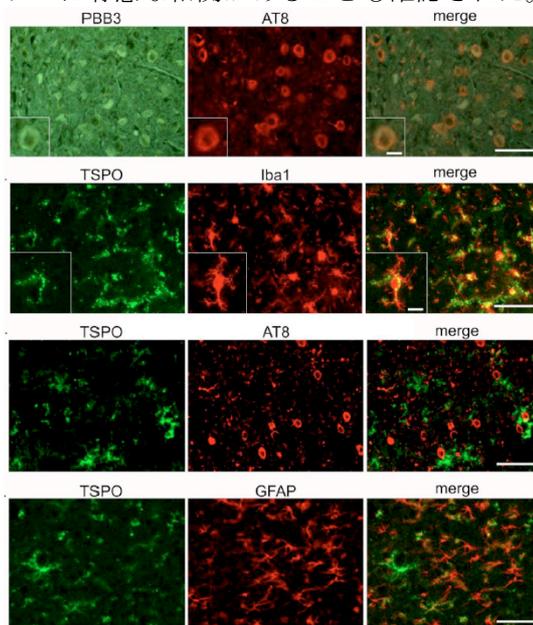


図 4、rTg4510 マウスにおける PBB3、リン酸化タウ、TSPO、GFAP の免疫染色画像

以上の結果から、rTg4510 マウスにおける PET 画像が病理像を反映している事が明らかとなり、これら PET イメージングが病態評価系として有用である事が証明されたと言える。

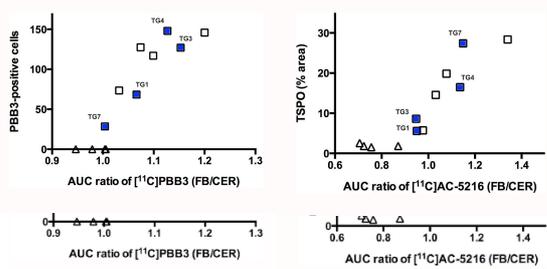


図5、PBB3 蛍光染色像と $[^{11}\text{C}]$ PBB3 シグナル (左) TSPO 免疫染色像と $[^{11}\text{C}]$ AC-5216 シグナル (右)

(5) 二光子顕微鏡によるマイクロイメージングと生体イメージング研究の今後の展望
 これまでタウ PET イメージング、神経炎症 PET イメージング、形態 MRI 法を用いてマウス脳の経時的変化を追跡することにより、タウ病変の進行に伴う神経炎症の上昇と、タウ PET シグナルの上昇がある月齢を境に頭打ちになる現象を確認した。死後脳標本を用いた病理像とタウ PET シグナルの相関を調べた結果、PET シグナルとタウ病理の有意な正の相関が認められたことから PET シグナルの頭打ち現象は部分容積効果によるものではないと推測できる。一方で、細胞レベルのタウ病態の変化を生体で評価するため、二光子顕微鏡による経時的観察を行った。その結果、タウ陽性神経細胞の産生と消失が起こる事で、全体量としてのタウ陽性細胞は6ヶ月齢まで上昇したのち、横ばい状態になることが確認された。興味深いことに、タウの発現を抑制することで産生と消失の割合が減少することが明らかとなった。これらの事実は生体イメージング技術にて初めて明らかになったことであり、マウスモデルを用いた治療評価系の指標となりうる。我々が用いたタウオパチーマウスモデルでは、ミクログリアの活性化を TSPO タンパクの上昇、あるいは P2Y₁₂ 受容体の減少で評価できることを見出しており、神経炎症を標的とした薬剤の開発に資する評価系が確立したと考えられる。今後、タウ病態、神経変性、神経炎症がどのように関わって、脳機能障害を引き起こすかについて継続して研究を進めていきたい。

<引用文献>

① Selkoe DJ The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 1991, 6, 487-498
 ② Hardy J and Selkoe DJ The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problem on the road to therapeutics. *Science* 2002, 297, 353-356
 ③ Frost B and Diamond MI. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. *Nature Rev.* 2010, 11, 155-159
 ④ Santacruz K et al. Tau suppression in

a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* 2005, 309, 476-481

⑤ Maruyama M et al. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 2013, 79, 1094-1108

⑥ Banati RB et al. The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain* 2000, 123, 2321-2337

⑦ Maeda J et al. Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's disease and other CNS pathologies. *J. Neurosci.* 2008, 28, 12255-12267

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 11 件)

① 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

② 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

③ 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 in press 査読有

④ 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

⑤ Ishikawa I 以下 15 名 Sahara N (16 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

⑥ 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

⑦ 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

⑧ 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

⑨ Imamura K, Sahara N (2 番目)以下 16 名 Calcium dysregulation contributes to neurodegeneration in FTLN patient iPSC-derived neurons. Scientific Reports 2016, 10, 34904 査読有 DOI 10.1038/srep34904

⑩ 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

⑪ 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

[学会発表] (計 9 件)

① Sahara N, Kimura T, Matsumoto G. Investigating combinatory phosphorylation of tau in a propagation model of tauopathy. Neuroscience 2017, Washington DC, USA

② 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

③ 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

④ 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

⑤ 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

⑥ 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

⑦ 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

⑧ 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

⑨ 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

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nirs.qst.go.jp/seika/brain/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐原 成彦 (Sahara Naruhiko) 放射線医学総合研究所・チームリーダー

研究者番号: 40261185

(4) 研究協力者

石川 愛 (Ishikawa Ai) 放射線医学総合研究所、千葉大学医学部