

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08215

研究課題名(和文) タウタンパク質変異アルツハイマー病モデルマウスの認知能力の精査

研究課題名(英文) Learning and Memory Performance of Alzheimer Disease Mouse Model with Mutant Human Tau Protein

研究代表者

桐野 豊 (Kirino, Yutaka)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：10012668

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)：出生後に発現調節が可能な変異タウ遺伝子導入マウスを用い、変異タウタンパク質(mMAPT)の発現期間と記憶障害(モリス水迷路試験、新規物体探索試験、及びトレース型瞬目反射条件付け)の程度および神経原線維変化(NFT)の発現量との相関について調べた。6か月齢のrTg4510マウスではNFT発現が亢進していたが、2か月間のドキシサイクリン(DOX)投与によりNFT発現量が低減し、記憶障害も緩和された。しかし、このDOX投与効果は、10か月齢の老齢マウスでは見られなかった。さらに、老齢マウスにおいてはmMAPTの発現短縮時もオートファジー系によるNFTのクリアランスが飽和していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、タウタンパク質変異ADモデルマウスにおいて、神経原線維変化(NFT)の程度と学習・記憶障害の程度に強い相関があること、そして、異常タウタンパク質の発現、及び、その結果としてのNFT蓄積を抑制することで、学習・記憶障害を改善できることを示した。これは、最近、われわれとは異なるタイプのタウタンパク質変異モデルマウスに対して、鼻腔にタウタンパクに対する抗体ワクチンを投与することにより、病態が改善されたという報告(Takeuchi et al., npj Vaccines, 2020)と一致する。NFTをターゲットとするAD治療法の開発の可能性を示した成果であるという社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：rTg4510 mice constitutively express mutant human tau protein until transgene expression is inactivated by administration of the doxycycline (DOX). In 6-month-old (young) rTg4510 mice, the hippocampus dependent learning abilities including spatial memory, object recognition memory, and trace eyeblink conditioning were impaired. These impairments were reduced by pre-treatment with DOX for 2 months. In parallel, the expression of NFTs decreased in DOX-treated group. 10-month-old (aged) rTg4510 mice showed severe recognition impairment and increased levels of NFTs. Treatment with DOX could not ameliorate the tau pathology in aged rTg4510 mice as well as DOX-untreated group. Since the amount of autophagy markers decreased along with the amelioration of tau pathology, clearance mechanisms of NFTs via autophagy have kept normal functions in 4- to 6-month-old mice while, in 10-month-old mice, clearance system may reach a saturation level.

研究分野：物理系薬学

キーワード：生物物理化学 タウタンパク質 神経原線維変化 学習と記憶 遺伝子変異マウス アルツハイマー病モデル

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。

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病(Alzheimer's Disease, AD)患者の脳に特徴的に認められる病理学的変化は、神経細胞外の β アミロイド老人斑の沈着 ($A\beta$ プラーク) 及び、細胞内神経原線維変化 (Neurofibrillary Tangle, NFT) である。疾患の動物モデルの開発は、疾患の発症のメカニズムの探究や治療法の探究に重要な貢献をする。AD の場合、自然に AD の病理変化を発症する動物は存在しないので、ヒトの家族性 (遺伝性) AD 原因遺伝子を導入したマウスが開発されてきて、その中枢神経系の異常や記憶障害と $A\beta$ プラーク形成との相関に関する多くの研究なされてきた。その結果、両者は必ずしも相関せず、むしろ NFT の形成・蓄積が AD の臨床症状とよく相関するという知見が出てきた。したがって、NFT を形成する遺伝子変異マウスの学習・記憶能力を詳細に調べることの重要性が大きく浮上してきた。

2005 年に SantaCruz らにより作出された変異 *MAPT* 遺伝子導入マウス (rTg4510 マウス) は、変異遺伝子の発現を加齢の任意の時点で Doxycycline の投与の有無により抑制 (repression) を OFF/ON することができる点で、優れた AD モデルである。しかしながら、このモデルマウスにおける学習・記憶のテストは十分に行われておらず、NFT 形成期間の制御が AD 治療に有効かどうかの知見は得られていない。これらの過程における学習能力を詳細に調べることにより、NFT 形成と認知能力との相関を明らかにすることができ、将来的には神経原線維変化をターゲットとした認知症に関する新しい創薬アプローチ理論の構築も期待できる。

2. 研究の目的

rTg4501 マウスに対して、いくつかの月齢で行動学的に記憶を測定する。同時に NFT 発現の程度を測定する。更に、変異遺伝子の発現を停止した後のマウスについても、同様のテストを実施する。以上より、各種の認知能力と NFT 発現の程度との相関を求めて、NFT が AD の進行の真のマーカーとなり得るのか、明らかにする。

3. 研究の方法

The Jackson Laboratory より雌性 Tg(tetO-MAPT*P301L)ならびに雄性 Tg(Camk2a-tTA)マウスを購入し、交配することで、Tg(Camk2a-tTA) Tg(tetO-MAPT* P301L)ダブルトランスジェニックマウス (rTg4510 マウス) を作成した (図 1)。4、6 および 10 か月齢の rTg4510 マウスを用い、瞬目反射条件付け (EBC)、モリス水迷路試験 (MWM) および新奇物体探索試験 (ORT) により記憶を測定した。変異タウタンパク質の発現は、ドキシサイクリン (DOX) の継続投与により抑制した。NFT 形成は抗 PHF1 抗体を用い、ウエスタンブロッティングにより検出した。NFT の代謝の指標として、オートファジーのマーカーである LC3A および LC3B の発現量を測定した。

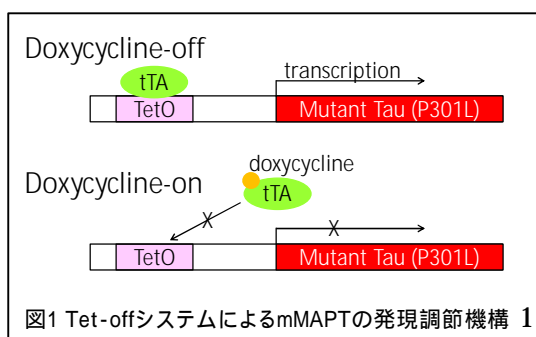


図1 Tet-offシステムによるmMAPTの発現調節機構 1

4. 研究成果

(1) rTg4510 マウスの記憶障害発生時期の特定

学習障害発生時期を特定すべく、4、6 か月齢の rTg4510 マウスおよび同月齢の野生型マウスを用い、MWM および ORT を行った。その結果、野生型マウスおよび 4 か月齢の rTg4510 マウスでは記憶形成が認められたが、6 か月齢の rTg4510 マウスでは有意な記憶障害が認められた。このことより変異タウタンパク質(mMAPT)の過剰発現により記憶障害が現れる境界域は 4~6 か月齢の間であることが特定された。

(2) rTg4510 マウスの記憶障害に対する変異タウタンパク質発現抑制の効果

4 か月齢および 8 か月齢の rTg4510 マウスに 2 か月間ドキシサイクリン (DOX) を投与することで mMAPT の発現を一時的に抑制したマウス(DOX-on 群)を用いてモリス MWM および ORT を行い、DOX 無投与群(DOX-off 群)と比較した。野生型マウスについても同様の実験を行った。6 か月齢の DOX-on 群では、DOX-off 群と比較して MWM および ORT の記憶障害が有意に改善し、野生型マウスと同レベルとなった。一方、10 か月齢の rTg4510 マウスにおいても同様の実験を行ったところ、DOX-off、DOX-on 両群において MWM および ORT の両試験において学習障害が認められ、6 か月齢で認められたような mMAPT の発現抑制による学習の改善は認められなかった (図 2)。

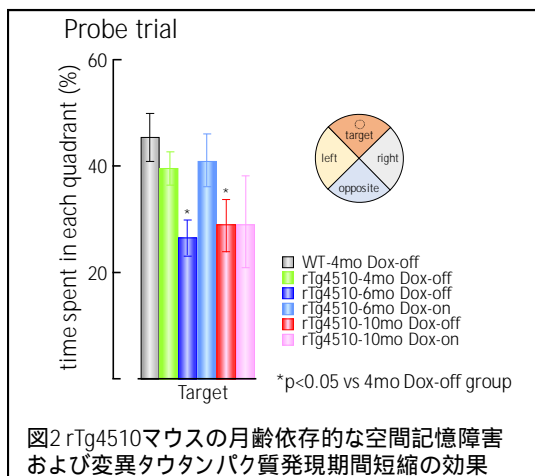


図2 rTg4510マウスの月齢依存的な空間記憶障害および変異タウタンパク質発現期間短縮の効果

(3) rTg4510 マウスの瞬目反射条件付け学習に対する変異タウタンパク質発現抑制の効果

6 か月齢の rTg4510 マウスにおいて、DOX を直前の 2 か月前投与し、異常タウタンパク質の発現を抑制した群(DOX-on 群)と通常飼育した群(DOX-off 群)に分け、EBC 実験(Trace 500 課題)を行った。10 日間の条件付けの結果、最終的な条件応答(CR%)は DOX-on 群では 60%前後まで上昇したのに対し、DOX-off 群では 40%前後の上昇にとどまった (図 3)。rTg4510 マウスの Dox-On 群と Dox-Off 群の間では、分散分析により、有意差がみられた(p=0.029)。今回用いた Trace 500 課題の学習成立には小脳や脳幹に加えて、海馬や大脳皮質のネットワークが重要であることが明らかとなっている。本研究の結果から、6 か月間の異常タウタンパク質の過剰発現により小脳・海馬・大脳皮質のネットワーク異常を惹起するが、異常タウタンパク質の発現を抑制することで改善できることが明らかとなった。

同様の実験を 10 か月齢の rTg4510 マウスについて計画している。rTg4510 マウスの繁殖、飼育は容易ではなく、10 か月齢という高齢マウスを学習行動実験に必要な数だけ確保することは大変困難である。今後、2 ヶ月以内に必要な数のマウスを調達することが可能となる見込みであり、EBC 実験を実施する予定である。

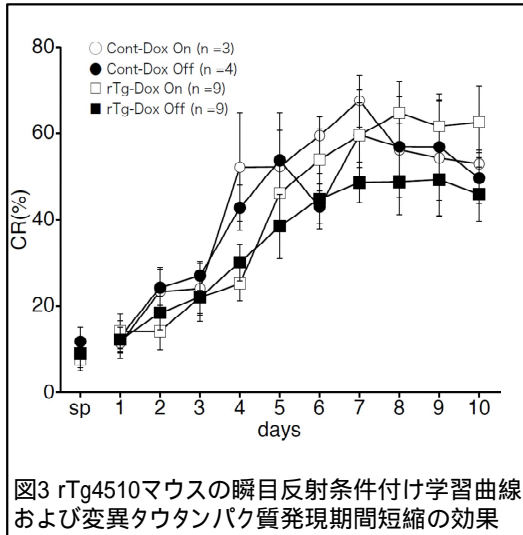


図3 rTg4510マウスの瞬目反射条件付け学習曲線および変異タウタンパク質発現期間短縮の効果

(4) rTg4510 マウスにおける変異タウタンパク質発現期間と神経原線維変化の相関

rTg4510 マウスの海馬における NFT 形成をウエスタンブロッティングによって検出した。その結果、6 か月齢では、DOX-on 群は DOX-off 群と比較して、NFT の発現量が有意に減少した。一方、10 か月齢の DOX-on 群では、DOX-off 群と比較して NFT の発現量に有意差は認められなかった (図 4)。このことから、10 か月齢の rTg4510 マウスでは、6 か月齢と比較して NFT のクリアランスに障害がある可能性が考えられる。

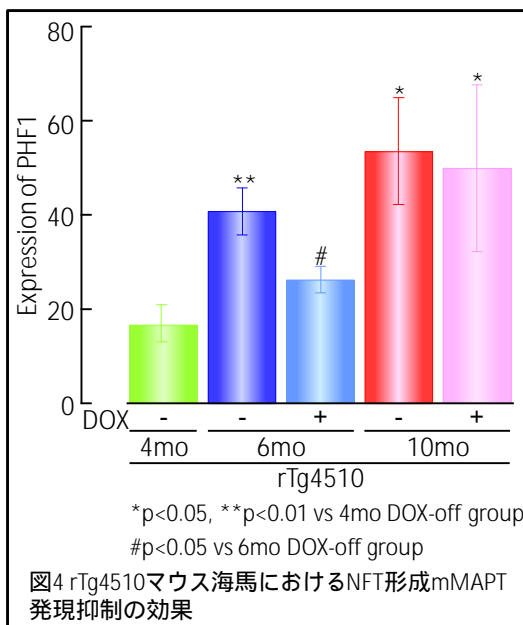
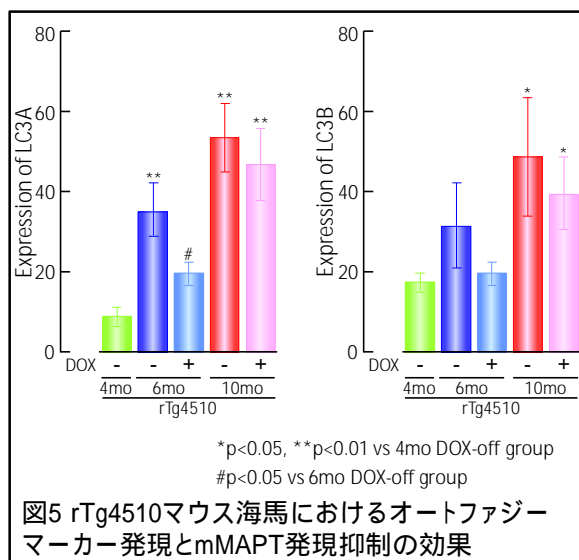


図4 rTg4510マウス海馬におけるNFT形成mMAPT発現抑制の効果

(5) rTg4510 マウスにおける変異タウタンパク質発現期間とオートファジー系の変容

NFT の除去に關与するオートファジーのマーカである LC3A および LC3B の発現量をウエスタンブロット法により調べた。その結果、6 か月齡の rTg4510 マウスでは 4 か月齡と比較して両マーカータンパク質の発現増加が認められたが、2 か月間の DOX 前投与によりその発現量は減少した。一方、10 か月齡の rTg4510 マウスでは 4 か月齡と比較して両マーカータンパク質の発現増加が認められ、2 か月間 DOX を前投与してもその発現量は減少しなかった (図 5)。このことから、10 か月齡の rTg4510 マウスでは、LC3 を介したオートファジー系が常に飽和しており、NFT の分解・除去が障害されていることが明らかになった。



以上より NFT 形成と AD の主症状である記憶障害には正の相関があることが明らかとなったことから、NFT 形成が AD 症状の進行のマーカとして有用であることが示唆された。また、その記憶障害は、NFT 形成を減少させることで改善した。NFT 産生期間が長期になることで、オートファジー系による NFT の除去メカニズムが飽和し、記憶障害が改善しなくなるため、AD による記憶障害の抑制には、早期における NFT 形成の抑制が効果的であることが示唆された。

得られた研究成果(1)~(5)については、今後可及的速やかに、論文として公表する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 H. Shishido, M. Ueno, K. Sato, M. Matsumura, Y. Toyoda, Y. Kirino, T. Tamiya, N. Kawai, Y. Kishimoto	4. 巻 2019
2. 論文標題 Traumatic Brain Injury by Weight-Drop Method Causes Transient Amyloid- Deposition and Acute Cognitive Deficits in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Behavioural Neurology	6. 最初と最後の頁 3248519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/3248519	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 -

1. 著者名 Yasushi Kishimoto, Kai Fukumoto, Mika Nagai, Ayaka Mizuguchi, Yuiko Kobayashi	4. 巻 2017
2. 論文標題 Early contextual fear memory deficits in a double-transgenic amyloid- precursor protein/presenilin 2 mouse model of Alzheimer 's disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int. J. Alzheimers. Dis.	6. 最初と最後の頁 8584205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2017/8584205	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Kubota, Yutaka Kirino
2. 発表標題 タウタンパク質発現期間依存的な記憶およびタウタンパク質代謝の障害
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Kubota, Yutaka Kirino
2. 発表標題 Age-dependent impairment of memory, neurofibrillary tangle formation and clearance in a mouse model of tauopathy
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Kirino, Hajime Shishido, Nobuyui Kawai, Yasunori Toyota, Takashi Tamiya, Takashi Kubota, Masaki Ueno, Yasushi Kishimoto
2. 発表標題 Traumatic brain injury accelerates amyloid-beta deposition and impairs learning and memory in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease
3. 学会等名 Society for Neuroscience Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 窪田剛志、桐野豊
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスの 7ニコチン性アセチルコリン受容体を介した学習改善作用におけるmicroRNA-134の効果
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	窪田 剛志 (Kubota Takashi) (90412402)	徳島文理大学・薬学部・助教 (36102)	
研究分担者	岸本 泰司 (Kishimoto Yasushi) (90441592)	徳島文理大学・薬学部・教授 (36102)	