

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09680

研究課題名(和文) タウオパチー伝播モデルを用いたアルツハイマー病危険因子の役割の解明

研究課題名(英文) The role of Alzheimer's disease risk factors in the tauopathy propagation model.

研究代表者

松本 信英 (Matsumoto, Shin-Ei)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：40432950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：<新たなタウオパチーモデルマウスの作出> 全長タウよりも凝集しやすいタウC末端断片を発現する新たなタウオパチーモデルマウスの作出を試みた。2系統において目的遺伝子の導入を確認できたが、十分な量のタウC末端断片の発現が認められなかった。今後は全長タウ発現マウスをベースとしてゲノム編集による作出を行う予定である。

<共培養細胞モデルを利用したTREM2の役割の検討> SH-SY5Y細胞を用いたタウ蓄積モデルにミクログリア細胞株BV2を加え共培養を行った結果、SH-SY5Y細胞内の不溶性タウ蓄積が減少した。今後はこのモデルを用いてTREM2の欠損や変異がタウの蓄積に与える影響を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

凝集タウの伝播は培養細胞やマウスモデルを用いて再現されているがそのメカニズムはほとんど不明でありTREM2の関与についてもほとんど報告がない。本研究で確立した伝播モデルおよびTREM2 R47Hノックインマウスは伝播メカニズムにおけるTREM2の役割の解明に非常に有用であると考えられる。また、神経系細胞株とミクログリア系細胞株との共培養による伝播モデルについては国内外でも報告が皆無であり、新しい知見が得られる可能性が高い。本研究結果は伝播による病変の拡大メカニズムの理解につながり、新たなタウオパチー治療方法確立の一助となり得る。

研究成果の概要(英文)：<Production of a new tauopathy model mice> We tried to create a new tauopathy model mouse that expresses a tau C-terminal fragment (Tau-CTF) that is easier to aggregate than full-length tau. Although introduction of the target gene was confirmed in two lines, expression of Tau-CTF was not observed. In the future, we plan to use genome editing.

<The role of TREM2 in co-culture model> As a result of performing co-culture by adding microglia cell line BV2 to tau accumulation model using SH-SY5Y cells, insoluble tau accumulation in SH-SY5Y cells decreased. In the future, we plan to use this model to examine the role of TREM2 on tau accumulation.

研究分野：神経病態学、免疫学

キーワード：タウオパチー ミクログリア TREM2 伝播

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

1. 研究開始当初の背景

AD や FTLD をはじめとするタウオパチーでは、変性部位の神経細胞内にタウの凝集体である神経原線維変化 (NFT) が観察される。NFT の出現はタウオパチー発症・進行のメカニズムと深く関わっていると考えられており、これまで、タウの過剰リン酸化、切断などの翻訳後修飾が NFT 形成を促進する原因になるという報告がなされている。しかしながら、これらの凝集体蓄積機構や、NFT 形成による神経細胞死誘導のメカニズムに関してはまだ不明な点が多い。

近年、タウオパチーにおける病変拡大のメカニズムとしてタンパク質凝集体の細胞間伝播の可能性が注目されている。すなわち、これらのタウオパチーで観察される細胞内タウ凝集体が、細胞から細胞へと拡がり、伝播した細胞内で再び蓄積のシードとして機能し、正常なタウタンパク質を次々と凝集させ、結果として凝集体形成が拡大していく可能性が考えられており、それを支持するような実験結果も相次いで報告されている (Nonaka et al, *J. Biol. Chem.* 2010)。この仮説は、神経変性疾患の病状の進行に伴って異常病変が拡大していく現象を部分的に説明できる可能性がある。応募者らはタウオパチーモデルマウス Tg601 の脳内で加齢に伴い約 24kDa のタウ C 末端断片 (Tau-CTF24) が増加することを見出し、培養細胞伝播モデルにおいて in vitro で凝集させた組換えタウ蛋白あるいはヒトタウオパチー患者脳の不溶性画分をシードとして導入すると、Tau-CTF24 が全長タウ (Tau-FL) と比較してより多量の細胞内凝集体を形成することを報告した (Matsumoto et al, *Hum. Mol. Genet.* 2015)。

一方で、近年の大規模ゲノム解析からアルツハイマー病の遺伝学的危険因子として報告された遺伝子のうち triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) はミクログリアによる貪食に関連する分子である (Karch et al, *Biol. Psychiatry* 2015)。TREM2 はミクログリア表面に発現している免疫受容体であり貪食と炎症抑制に関与する。TREM2 の R47H 変異は AD だけでなくパーキンソン病や ALS などのリスクも上昇させるとの報告もあり、異常蓄積蛋白の除去に関与している可能性が高い (Rayaprolu et al, *Mol. Neurodegener.* 2013, Cady et al, *JAMA Neurol.* 2014)。

2. 研究の目的

以上のことから、TREM2 はタウの伝播・蓄積にも密接に関わると考えられるが、伝播メカニズムにおける役割はほとんど報告されていない。そこで本研究では、培養細胞およびマウスの伝播モデルを用いて、タウ凝集体の伝播と蓄積における TREM2 の役割を解明することを目指す。

3. 研究の方法

- (1) Neuro2a や SH-SY5Y 等の神経系細胞株と BV-2 等のミクログリア系細胞株との混合培養系を用いた新たな伝播モデルを確立し、TREM2 のノックダウン、ゲノム編集技術を用いたノックアウト、過剰発現を行い、不溶性タウの細胞内蓄積に影響を与えるかどうか検討する。さらに、ミクログリアから分泌されるサイトカインの定量を行い、炎症との関与についても検討する。
- (2) マウス初代培養細胞を用いてより生体に近い形の共培養伝播モデルを確立する。上記 1, 2 で得られた知見と合わせて伝播における TREM2 の役割を同様の手法を用いて検討する。
- (3) 申請者が老齢のタウオパチーモデルマウス脳で見出した Tau-CTF24 は伝播・蓄積しやすいという特徴があり、tau-CTF24 を発現する Tg マウスを作製できれば伝播モデルとして非常に有用であると考えられる。作製した tau-CTF24 発現マウスの脳室内に凝集タウを投与することで in vivo 伝播モデルを確立する。
- (4) AD 発症のリスクバリエーションである TREM2 R47H のノックインマウスをゲノム編集により新たに作出する。このマウスを用いて凝集タウ脳内投与による伝播モデルを作成し、TREM2 の伝播における役割をウエスタンブロッティングや免疫組織染色により検討する。さらにモリス水迷路、パーズ迷路、Y 迷路等の行動試験を行い、認知機能についても検討する。

4. 研究成果

(1) 共培養伝播モデルの構築

ヘパリンナトリウムを凝集核としてリコンビナントタウ蛋白を 37°C で 1 週間インキュベートすることで不溶性の凝集タウを形成させた。別途タウ、蛍光タンパク融合タウ (EGFP-タウ、mCherry-タウ) を発現させた SH-SY5Y 細胞株にこのタウ凝集体をシードとして導入することで、細胞内に新たに不溶性タウの蓄積を誘導することができた (図 1)。

また、この細胞内タウ蓄積モデルにミクログリア細胞株である BV-2 を共培養することで、タウ蓄積に与える影響を検討した結果、BV-2 を加えた系では細胞内の不溶性タウが減少することがわかった。以上のことから、ミクログリアが神経細胞内のタウの蓄積に影響を与える可能性が示唆された (図 2)。

さらに、EGFP-tau を発現させた SH-SY5Y 細胞に凝集タウを導入したドナー細胞と、mCherry-tau を発現させたレシピエント細胞を共培養した結果、レシピエント細胞にも新たに不溶性 mCherry-tau が蓄積したことから、ドナー細胞からレシピエント細胞へと何らかのメカニズムで不溶性タウが伝播している可能性が示唆された (図 3)。また、この系に

さらに BV-2 を共培養することでも不溶性 mCherry-tau が減少したことから、伝播にもミクログリアが影響を与える可能性が示唆された (図 3)。

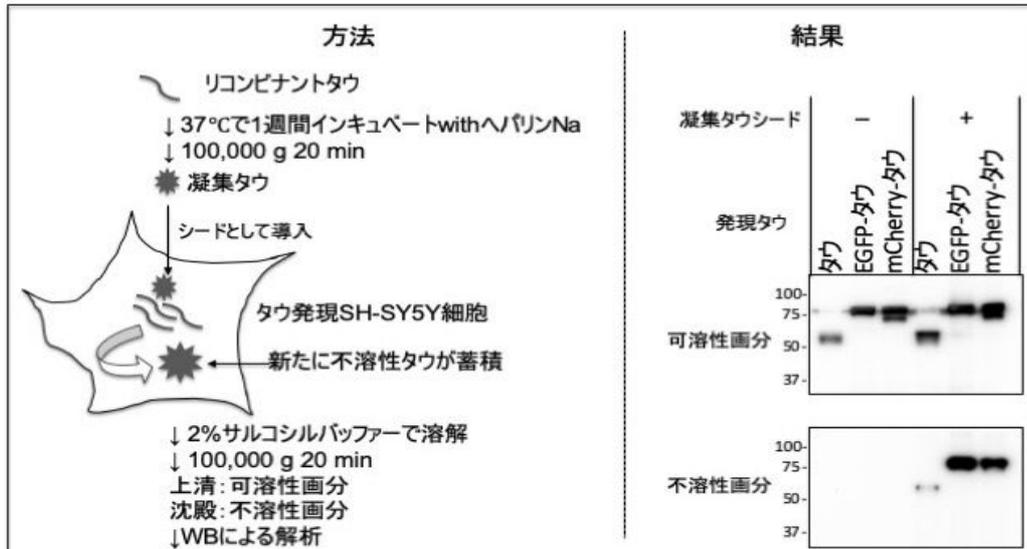


図1. シード依存的細胞内tau蓄積モデル
野生型tau、蛍光タンパク融合tauともにtau凝集体依存的に蓄積した

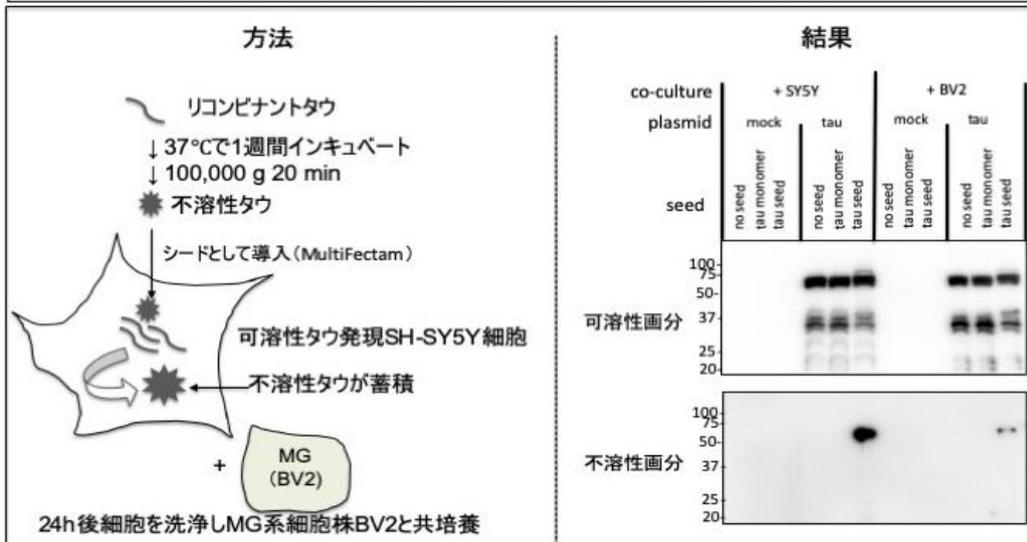


図2. 細胞内tau蓄積モデルにおけるミクログリア(MG)の影響
SH-SY5Y細胞内にシード依存的に蓄積するtauが、BV2との共培養により減少した。
MGが不溶性tauの蓄積に影響を与える可能性がある。

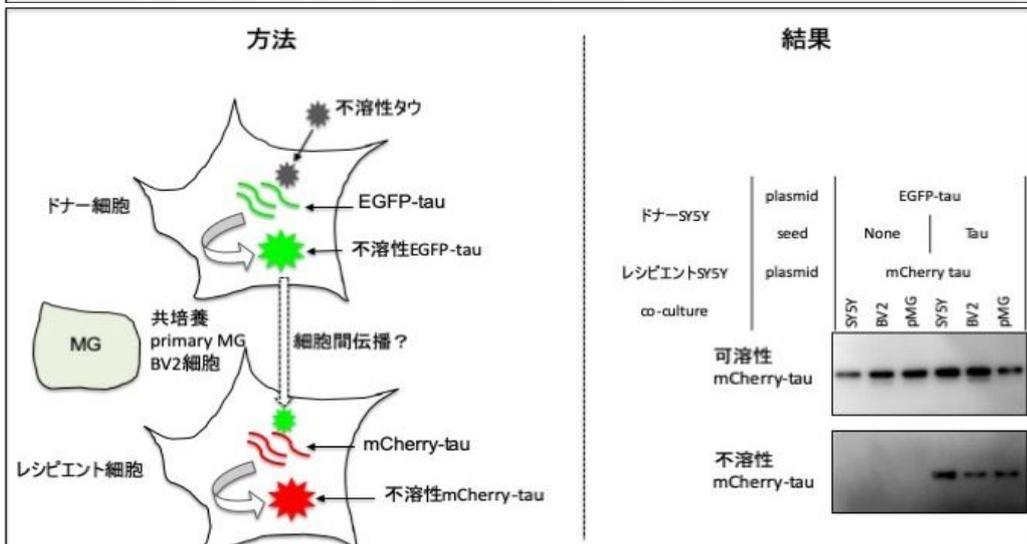


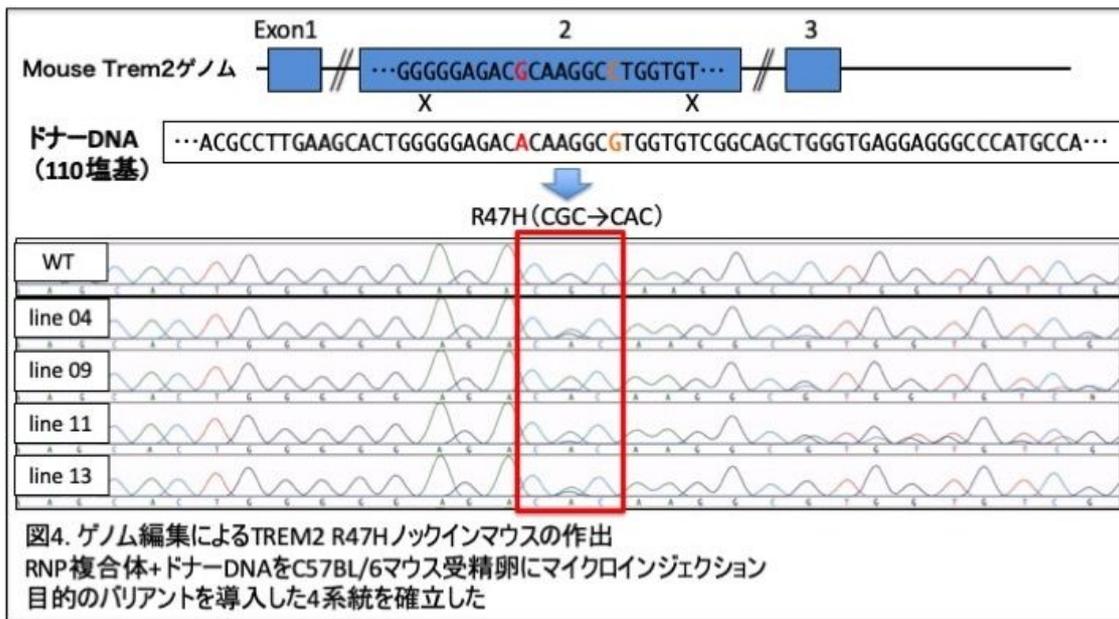
図3. 不溶性tauの細胞間伝播モデル
ドナー細胞内で蓄積した不溶性EGFP-tauが伝播してレシピエント細胞内のmCherry-tauの蓄積を誘導したと考えられる。また、MGとの共培養により不溶性mCherry-tauの蓄積が低減する傾向が見られた。

(2) Tau-CTF Tg マウスの作出

短期間でタウ病理の伝播を観察できるタウオパチーモデルマウスとして利用することを目的として、Tau-CTF 過剰発現マウスの作出を試み、2 系統において目的遺伝子の導入を確認できた。しかし脳における Tau-CTF 発現をウエスタンブロッティングにより確認した結果、十分な量の Tau-CTF 発現が認められなかった。今後、全長タウ発現 Tg601 をベースとして、ゲノム編集による Tau-CTF 過剰発現マウスの作出を行う予定である。

(3) TREM2 R47H ノックインマウスの作出

CRISPR-Cas9 によるゲノム編集法を用いて TREM2 R47H ノックインマウスの作出を行った。目的の変異と共に近傍の *StuI* 制限酵素処理部位消失を導入することでスクリーニングを簡便にした。ダイレクトシーケンスによる確認の結果、最終的に 4 系統を確立することが出来た (図 4)。今後、ウエスタンブロッティングやフローサイトメトリーによる TREM2 発現確認を行う予定である。



5 . 主な発表論文等

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

アルツハイマー病のリスクバリエント TREM2 R47H ノックインマウスの樹立

松本信英、立部誉、原博満

鹿児島神経科学研究会第 11 回研究発表会、2018

3xTg-AD モデルマウスの病態における TREM2 の役割

松本信英

認知症研究を知る若手研究者の集まり 2017

タウオパチーモデルマウス Tg601 における切断タウの機能解析

松本信英、本井ゆみ子、石黒幸一、田平武、亀谷富由樹、長谷川成人、服部信孝

鹿児島神経科学研究会第 8 回研究発表会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

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
研究分担者なし

(2)研究協力者
研究協力者なし

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。