

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01355

研究課題名(和文)アルツハイマー病の病理進展機序を解明するための統合的MRI解析

研究課題名(英文)Evaluation of the progression of pathological changes in Alzheimer's disease using MRI

研究代表者

柳沢 大治郎 (Yanagisawa, Daijiro)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・准教授

研究者番号：50581112

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)：本研究の目的は、アルツハイマー病の病理進展、すなわち最初期のアミロイドの沈着からタウ病変の形成、そして神経変性にまで至る過程を統合的に解析するMRI画像法を開発することである。そして、新規プローブShiga-X35を開発して、フッ素MRIによるタウイメージングを世界で初めて成功した。また、アミロイド病理とタウ病理を同時に解析するためのモデルの開発、タウ病理の形成量を変動させる遺伝子の探索を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病の病理進展では、最初期にアミロイドの沈着が始まり、次いでタウ病変の形成と神経変性が誘導されることが知られている。すなわち、個々の病理をそれぞれ解析するのではなく、統合して解析することでアルツハイマー病の病理進展の本質が理解できると推察される。しかし、これまでにそれを実現できる技術は開発されていない。本研究はアルツハイマー病の病理進展の理解に役立つ研究であり、将来のアルツハイマー病克服の一助となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a methodology using MRI to comprehensively evaluate the pathological process in Alzheimer's disease, such as amyloid deposition, tau pathology, and neurodegeneration. We synthesized Shiga-X35, a novel probe for 19F-MRI, and succeeded in tau imaging using Shiga-X35 in a mouse model of tauopathy, rTg450. We further conducted the researches aiming to develop a mouse model that have amyloid and tau pathology and to explore unknown factors that affect the level of tau pathology in rTg4510.

研究分野：神経科学、医用画像

キーワード：タウ アルツハイマー病 フッ素MRI 遺伝子改変マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の画像診断技術の目覚ましい発展により、これまでは死後にしか知り得なかった脳内の病理学的変化を、生前に生きたまま評価・解析することが可能となった。アルツハイマー病におけるアミロイドの沈着(老人斑)やタウ病変(神経原線維変化)をイメージングする試みは、それぞれアミロイドイメージング、タウイメージングと呼ばれている。これらのイメージング技術は早期診断、病期の進行モニタリング、薬効評価に役立つと期待されている。最近では、放射性同位元素(^3H や ^{18}F)を用いた陽電子放射断層撮影法(PET)を利用するイメージングが注目されている。

研究代表者はこれまでに磁気共鳴画像法(MRI)を用いたイメージング技術を開発してきた。MRIは通常、生体内の解剖学的構造を非侵襲的に描写するために用いられている。これは生体に多量に存在する水分子のプロトン(^1H)の核磁気共鳴(NMR)現象を利用しており、プロトンの密度や状態の違いを信号の強弱として反映させた画像である。一方、研究代表者らはフッ素原子(^{19}F)のNMR現象を利用した ^{19}F -MRIを用いている。 ^{19}F は、生体内に存在せず、安定同位体で天然存在比100%という特徴を持つ。つまり、 ^{19}F で標識した低分子化合物を合成し、それを生体に投与して、 ^{19}F -MRIで捉えることができれば、低バックグラウンドで、放射性被曝のない、安価なイメージング技術が実現する。研究代表者はこれまでにアミロイドイメージング用 ^{19}F プローブを開発し、遺伝子改変マウスにおける ^{19}F -MRIに成功した(Yanagisawa et al, 2014; Yanagisawa et al. 2011)。さらに、タウイメージング用 ^{19}F プローブも開発中である。

アルツハイマー病の病理進展では、最初期にアミロイドの沈着が始まり、次いでタウ病変の形成と神経変性が誘導されることが知られている。すなわち、個々の病理をそれぞれ解析するのではなく、統合して解析することでアルツハイマー病の病理進展の本質が理解できると推察される。しかし、これまでにそれを実現できる技術は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究では、 ^{19}F -MRIと ^1H -MRIを組み合わせることで、アルツハイマー病におけるアミロイドの沈着、タウ病変の形成、そして神経変性までを統合的に解析するためのイメージング技術を開発することを目的とした。アミロイドの沈着がどのような機序・経路で神経原線維変化をはじめとする病理変化を誘導するのかという、アルツハイマー病の病理進展の鍵となる現象を解明することで、アルツハイマー病の新しい治療戦略の開発に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

(1) タウイメージング

動物はタウ遺伝子改変マウス(rTg4510マウス)を使用した。麻酔下のマウスにフッ素MRI用プローブShiga-X35(200 mg/kg)を尾静脈より投与し、7テスラ実験動物用MR装置を用いて ^{19}F -MRを測定した。測定終了後、脳を摘出して組織化学的解析を実施した。

(2) アミロイドとタウの病理進展モデル

rTg4510マウスの脳実質にアミロイドを微量注入することで、アミロイドとタウ、2つの病理学的特徴を有するマウスモデルの作製を検討した。2または4か月齢のrTg4510マウスをイソフルラン麻酔下で脳定位固定装置に固定し、アミロイドまたはvehicleを大脳皮質または線条体に微量注入した。そして、1、7、14および28日後に脳を摘出して、抗アミロイド抗体および抗リン酸化タウ抗体を用いた免疫組織化学的解析を実施した。

(3) rTg4510マウス

前脳領域に高度なタウの蓄積を認めるrTg4510マウスは、CaMKII-tTAマウス(遺伝的背景C57BL/6J)とtet0-TauP301Lマウス(遺伝的背景FVB/NJ)との交配で得られるバイトランスジェニックマウスである。そこで、正逆交配によって得られる遺伝的背景が異なる産仔rTg4510マウス間でのタウ蓄積量を比較した。まず雌性CaMKII-tTAマウス(遺伝的背景C57BL/6J)と雄性tet0-TauP301Lマウス(遺伝的背景FVB/NJ)を交配することでrTg4510(F1 C57BL/6J x FVB/NJ)を得た。また、雌性tet0-TauP301Lマウス(遺伝的背景FVB/NJ)と雄性CaMKII-tTAマウス(遺伝的背景C57BL/6J)を交配することでrTg4510(F1 FVB/NJ x C57BL/6J)を得た。タウ蓄積量は抗リン酸化タウ抗体(AT8)を用いた免疫組織化学的解析、Gallyas-silver染色、および可溶性・不溶性タウ蓄積量を指標に解析した。

野生型マウスについても正逆交配によって、WT(F1 C57BL/6J x FVB/NJ)とWT(F1 FVB/NJ x C57BL/6J)を得た。そして、網羅的遺伝子解析(RNA-seq)によって、両者の遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

(1)

Shiga-X35を投与したrTg4510マウスでは前脳に強いフッ素MR信号が検出された。信号強度を半定量して比較したところ、rTg4510マウス前脳における信号強度は野生型マウスに比べ有意に高かった。測定終了後、脳を摘出して組織化学的解析を実施したところ、AT8陽性タウ病変およびGallyas陽性染色はrTg4510マウスの前脳に認められた。さらに、蛍光顕微鏡観察におい

て、Shiga-X35 の蛍光が AT8 陽性タウ病変に一致して認められた。

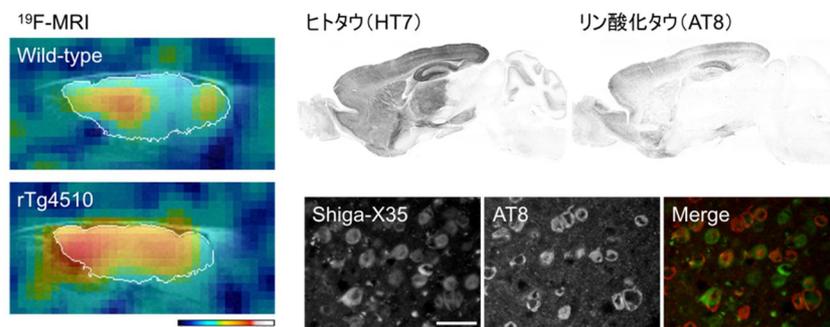


図 1. Shiga-Y35 を用いた ¹⁹F-MRI によるタウイメージング

(2)

免疫組織化学的解析の結果、抗アミロイド 抗体による陽性反応は、注入 1 日後までは認められたが、それ以降では観察されなかった。また、抗リン酸化タウ抗体を用いたタウ病変の免疫組織化学的解析では、アミロイド 群と vehicle 群とでタウ病変形成量に差は認められなかった。

(3)

rTg4510 (F1 FVB/NJ x C57BL/6J) の方が rTg4510 (F1 C57BL/6J x FVB/NJ) よりも高度な AT8 陽性細胞および Gallyas 陽性構造物の蓄積が認められた。さらに、rTg4510 (F1 FVB/NJ x C57BL/6J) では sarkosyl 不溶性タウおよび TBS 可溶性画分において 64 kDa 付近に出現するタウの蓄積もより高度に認められた。

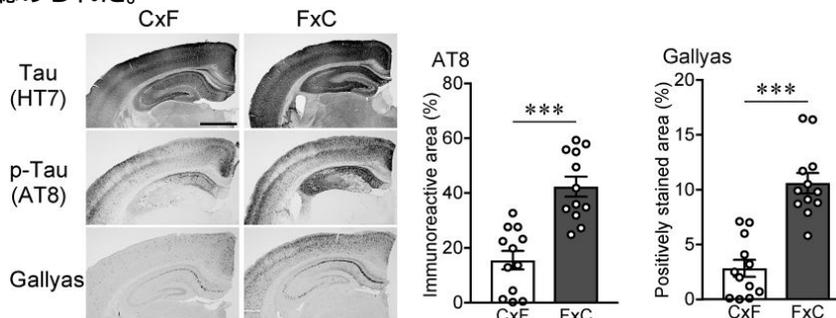


図 2. AT8 陽性細胞および Gallyas 陽性構造物の蓄積量の比較

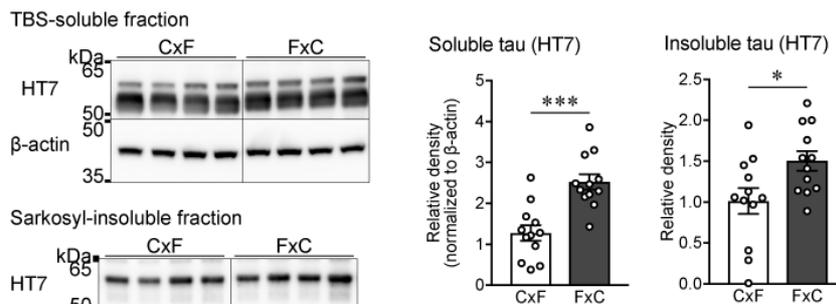


図 3. TBS 可溶性画分および sarkosyl 不溶性画分におけるタウ蓄積量の比較

(4)

WT (F1 C57BL/6J x FVB/NJ) と WT (F1 FVB/NJ x C57BL/6J) の遺伝子発現を比較したところ、E3 ubiquitin-protein ligase midline-1 の発現量に有意な差が認められた。この midline-1 の発現量の差は rTg4510 (F1 C57BL/6J x FVB/NJ) と rTg4510 (F1 FVB/NJ x C57BL/6J) でも認められた。

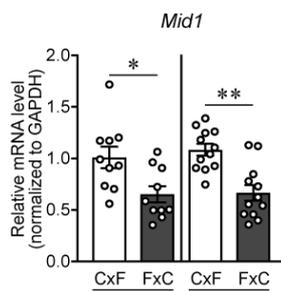


図 4. Midline-1 発現量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hamezah Hamizah Shahirah, Durani Lina Wati, Yanagisawa Daijiro, Ibrahim Nor Faeizah, Aizat Wan Mohd, Makpol Suzana, Wan Ngah Wan Zurinah, Damanhuri Hanafi Ahmad, Tooyama Ikuo	4. 巻 72
2. 論文標題 Modulation of Proteome Profile in A PP/PS1 Mice Hippocampus, Medial Prefrontal Cortex, and Striatum by Palm Oil Derived Tocotrienol-Rich Fraction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 229 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-181171	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 該当する
1. 著者名 Seita Yasunari, Morimura Toshifumi, Watanabe Naoki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakamura Shinichiro, Suzuki Toshiharu, Yanagisawa Daijiro, Tsukiyama Tomoyuki, Nakaya Masataka, Okamura Eiichi, Muto Masanaga, Ema Masatsugu, Nishimura Masaki, Tooyama Ikuo	4. 巻 75
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 45 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-191081	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 Buyandelger Undral, Walker Douglas G., Yanagisawa Daijiro, Morimura Toshifumi, Tooyama Ikuo	4. 巻 21
2. 論文標題 Effects of FTMT Expression by Retinal Pigment Epithelial Cells on Features of Angiogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3635 ~ 3635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21103635	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 Yanagisawa Daijiro, Hamezah Hamizah Shahirah, Durani Lina Wati, Taguchi Hiroyasu, Tooyama Ikuo	4. 巻 13
2. 論文標題 Study of tau pathology in male rTg4510 mice fed with a curcumin derivative Shiga-Y5	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0208440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0208440	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 Hamezah Hamizah Shahirah, Durani Lina Wati, Yanagisawa Daijiro, Ibrahim Nor Faeizah, Aizat Wan Mohd, Bellier Jean Pierre, Makpol Suzana, Ngah Wan Zurinah Wan, Damanhuri Hanafi Ahmad, Tooyama Ikuo	4. 巻 111
2. 論文標題 Proteome profiling in the hippocampus, medial prefrontal cortex, and striatum of aging rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 53 ~ 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2018.07.002	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 該当する

1. 著者名 Durani Lina Wati, Hamezah Hamizah Shahirah, Ibrahim Nor Faeizah, Yanagisawa Daijiro, Nasaruddin Muhammad Luqman, Mori Masaki, Azizan Kamalrul Azlan, Damanhuri Hanafi Ahmad, Makpol Suzana, Wan Ngah Wan Zurinah, Tooyama Ikuo	4. 巻 64
2. 論文標題 Tocotrienol-Rich Fraction of Palm Oil Improves Behavioral Impairments and Regulates Metabolic Pathways in APP/PS1 Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 249 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-170880	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 該当する

1. 著者名 Yanagisawa Daijiro, Ibrahim Nor Faeizah, Taguchi Hiroyasu, Morikawa Shigehiro, Kato Tomoko, Hirao Koichi, Shirai Nobuaki, Sogabe Takayuki, Tooyama Ikuo	4. 巻 96
2. 論文標題 Fluorine-19 magnetic resonance imaging probe for the detection of tau pathology in female rTg4510 mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 841 ~ 851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jnr.24188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Durani Lina Wati, Hamezah Hamizah Shahirah, Ibrahim Nor Faeizah, Yanagisawa Daijiro, Makpol Suzana, Damanhuri Hanafi Ahmad, Tooyama Ikuo	4. 巻 493
2. 論文標題 Age-related changes in the metabolic profiles of rat hippocampus, medial prefrontal cortex and striatum	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1356 ~ 1363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.09.164	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 該当する

1. 著者名 Hamezah Hamizah Shahirah, Durani Lina Wati, Ibrahim Nor Faeizah, Yanagisawa Daijiro, Kato Tomoko, Shiino Akihiko, Tanaka Sachiko, Damanhuri Hanafi Ahmad, Ngah Wan Zurinah Wan, Tooyama Ikuo	4. 巻 99
2. 論文標題 Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Experimental Gerontology	6. 最初と最後の頁 69 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exger.2017.09.008	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 該当する

1. 著者名 Hijioka Masanori, Inden Masatoshi, Yanagisawa Daijiro, Kitamura Yoshihisa	4. 巻 40
2. 論文標題 DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 548 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b16-01006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Therapeutic effects of a curcumin derivative Shiga-Y5 in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease
3. 学会等名 The 13th Japan-China Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳沢大治郎, Hamizah Shahirah Hamezah, Aslina Pahrudin Arrozi, 遠山育夫
2. 発表標題 rTg4510マウスのタウ蓄積量を変動させる因子の探索
3. 学会等名 第38回日本認知症学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柳沢大治郎、Hamizah Shahirah Hamezah、Aslina Pahrudin Arrozi、田口弘康、遠山育夫
2. 発表標題 タウ遺伝子改変マウスrTg4510のタウ蓄積における遺伝的背景の影響
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Detection of abnormal protein accumulation in Alzheimer 's disease using magnetic resonance imaging
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of Mongolian Neuroscience Society MULTIDISCIPLINARY BRAIN SCIENCE 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Lina Wati Durani, Hamizah Shahirah, Hamezah, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Curcumin derivative with C-4 substituent attenuated amyloid deposition, but did not affect tau pathology in mouse models
3. 学会等名 Alzheimer 's Association International Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳沢大治郎、田口弘康、遠山育夫
2. 発表標題 MRIによるタウ病変の検出法の開発
3. 学会等名 第45回日本脳科学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳沢大治郎、Hamizah Shahirah Hamezah、田口弘康、遠山育夫
2. 発表標題 クルクミン誘導体Shiga-Y5はA の蓄積を抑制するが、タウの蓄積には作用しない
3. 学会等名 第37回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、加藤智子、遠山育夫
2. 発表標題 フッ素MRIによる脳内タウ凝集体の検出
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa, Hiroyasu Taguchi, Shigehiro Morikawa, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Fluorine-19 magnetic resonance imaging to detect tau pathology in rTg4510 mice
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa, Nor Faeizah Ibrahim, Hiroyasu Taguchi, Shigehiro Morikawa, Koichi Hirao, Nobuaki Shirai, Takayuki Sogabe, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 Tau imaging using fluorine-19 MRI in a mouse model of tauopathy
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、加藤智子、遠山育夫
2. 発表標題 フッ素MRIによる脳内タウ凝集体の検出
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 柳沢大治郎、田口弘康、森川茂廣、遠山育夫
2. 発表標題 フッ素MRIによるタウ病変のイメージング
3. 学会等名 第36回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa
2. 発表標題 Keto-enol tautomerism of curcumin upon binding to amyloid fibrils
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daijiro Yanagisawa, Nor Faeizah Ibrahim, Hiroyasu Taguchi, Shigehiro Morikawa, Ikuo Tooyama
2. 発表標題 In vivo detection of tau pathology by fluorine-19 MR imaging in a mouse model of tauopathy
3. 学会等名 第12回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミロイドオリゴマーの画像診断薬	発明者 遠山育夫、田口弘 康、柳沢大治郎、加 藤智子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-033405	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----