

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02338

研究課題名(和文)原因蛋白質の生物種差解析による神経変性疾患の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathomechanism of neurodegenerative diseases by comparing the causative proteins between species

研究代表者

チェンバース ジェームズ (Chambers, James)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：00621682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経変性疾患の原因蛋白質の性質と病変形成との関連性を生物種間で比較した。その結果、アシカなど複数の動物種においてヒトのアルツハイマー病と同様の病変が脳に形成されることを発見した。そして原因蛋白質の性質(アミノ酸配列、発現アイソフォーム、凝集性など)が、動物種ごとの病変形成の違いと関連することを明らかにした。また、異なる原因蛋白質が、リン酸化酵素の活性化を介して相互作用し、病変形成を促進することを実験的に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病などの神経変性疾患では、脳の神経細胞内に蛋白質の凝集がみられるが、その原因は解明されていない。本研究では、それらの蛋白質のアミノ酸配列に生物種差があり、病変形成と関連していることを明らかにした。また、2種類の蛋白質が相互作用し、それぞれの凝集を促進することを実験的に明らかにした。すなわち、神経細胞内の蛋白質凝集性は、進化の過程で生物種ごとに規定されており、それらの蛋白質の相互作用をコントロールすることが疾患の予防および進行の抑制に重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Causative proteins of neurodegenerative diseases and their associated lesions were examined in animal brains and compared between different species. Lesions comparable to human Alzheimer's disease were found in the brains of sea lions and other several species. We found that the nature of the proteins, such as amino acid sequence, expressed isoforms, and aggregability, were associated with different lesions in the brain among species. Also, results of experimental studies have shown that different causative proteins interact with each other via activation of kinase, and promote lesion formation.

研究分野：獣医病理学

キーワード：神経変性疾患 生物種差 プロテノパシー -amyloid -synuclein Tau

## 1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患では、凝集した蛋白質が中枢神経に蓄積し、進行性に神経細胞が脱落する。これまでに、アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、前頭側頭葉型認知症 (FTD) の患者の脳や脊髄において  $\alpha$ -amyloid、Tau、 $\alpha$ -synuclein、TDP-43、FUS 等の蓄積蛋白質が同定されている。また、これらの蛋白質をマウスの脳において過剰発現させることで、神経細胞が傷害されるメカニズムについて研究されてきた。しかしながら、なぜ特定の蛋白質が蓄積するようになるのかについてアプローチする研究は少なく、原因が解明されていないため根本的な治療法が開発されていない。

神経変性疾患の 90%以上は孤発性 (特定の遺伝子変異によらない) であり、それぞれの生物種の野生型遺伝子から翻訳された蛋白質が蓄積する。その他の遺伝性 (特定の遺伝子変異による) 神経変性疾患については、動物において原因遺伝子が特定されていない疾患が多い。そこで本研究では、孤発性神経変性疾患において蓄積する野生型蛋白質およびその蓄積に關与する因子の生物種差に着目した。また、遺伝性神経変性疾患については、原因遺伝子の変異箇所をヒトと動物で比較し、病変形成との関連性を調べた。

## 2. 研究の目的

本研究は、神経変性疾患に關連した病変の動物種差を明らかにし、それが生じる原因を探索することにより、神経細胞において物質が蓄積するメカニズムを解明することを目的とした。具体的には、自然症例および遺伝子改変マウスの脳において凝集する野生型蛋白質のアミノ酸配列、凝集の程度およびリン酸化を解析し、病変形成の動物種差との関連性を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 自然症例の研究

当研究室で病理解剖を実施した動物の脳を採材し、 $\alpha$ -amyloid、Tau、 $\alpha$ -synuclein、TDP-43 の蓄積を網羅的に解析した。ホルマリン固定組織の免疫染色を実施し、凝集物が観察された症例については凍結組織から蛋白質を抽出しウェスタンブロットを実施した。また凍結組織から DNA を抽出し、遺伝子のシーケンス解析を実施した。Tau oligomer を検出するために Tau-proximity ligation assay を行い、凝集の程度を評価するために proteinase K 処理抵抗性を調べた。

### (2) 遺伝子改変マウスの研究

ヒト型 Tau を過剰発現する 2 系統の遺伝子改変マウス (rTg4510 および PS19) について、複数のタイムポイントにおける脳のホルマリン固定組織および凍結組織を用いて免疫染色およびウェスタンブロットを実施した。また、 $\alpha$ -synuclein 凝集物の proteinase K 処理抵抗性を評価した。rTg4510 マウスについては、ドキシサイクリン投与により Tau 発現を抑制し、それによる  $\alpha$ -synuclein 凝集への影響を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 高齢動物の脳における蛋白質凝集の解析

本研究では、高齢の鰭脚類の脳において  $\alpha$ -amyloid と Tau が凝集することを初めて明らかにした。また、それらの病変をイヌおよびネコと比較し、以下の研究成果が得られた。

#### 鰭脚類の脳における $\alpha$ -amyloid と Tau の凝集

これまでにネコ科動物の脳において加齢性に Tau が神経細胞内に凝集することを報告しており (Chambers JK et al. Acta Neuropathol Commun. 2015)、本研究では新たに鰭脚類 (アシカ、アザラシ、セイウチ) の脳において加齢性に Tau が凝集することを明らかにした。また、ネコ科動物の  $\alpha$ -amyloid はアミノ酸配列がヒトの  $\alpha$ -amyloid と異なっており、ネコ科動物では老人斑が形成されないが、鰭脚類の  $\alpha$ -amyloid はヒト型  $\alpha$ -amyloid と相同であり脳に老人斑を形成することが分かった。また、老人斑の周囲に炎症細胞の反応および軸索の腫大が観察され、ヒトのアルツハイマー病と同様の病変が観察された (Takaichi Y et al. Acta Neuropathol Commun. 2021)。

#### 動物の脳におけるリン酸化酵素の活性化と Tau oligomer の蓄積

ネコとアシカでは加齢性に Tau が神経細胞内に凝集するが、イヌでは Tau の凝集物はほとんど観察されない。本研究では、これらの動物種について脳の神経細胞内における Tau の oligomer 化を観察した。その結果、いずれの動物種においても加齢性に神経細胞内に Tau oligomer が観察され、同細胞では活性化型のリン酸化酵素 (GSK-3 $\beta$ ) の発現を認めた。ネコおよびアシカの Tau oligomer は proteinase K 処理に抵抗性を示したが、イヌでは同処理によって分解された。以上のことから、いずれの動物種においても、神経細胞内において Tau がリン酸化され oligomer 化するが、その凝集程度 (proteinase K 抵抗性) がイヌと比較してアシカとネコで高いことが示唆された (Takaichi Y et al. 論文投稿中)。

イヌの脳における  $\beta$ -amyloid oligomer およびリン酸化 Tau の蓄積と認知機能障害

これまでに高齢のイヌにおいて認知機能障害がみられることを報告した(Ozawa M et al. J Vet Med Sci. 2016)。また、イヌの  $\beta$ -amyloid のアミノ酸配列はヒト型と相同であり、老人斑を形成することが知られている。本研究では、それらのイヌの脳において神経細胞内に  $\beta$ -amyloid oligomer とともにリン酸化 Tau が蓄積することを明らかにした(Habiba U et al. J Alzheimers Dis Rep. 2021)。

以上の研究成果から、ヒトのアルツハイマー病患者の脳で観察される老人斑の形成については、 $\beta$ -amyloid のアミノ酸配列が重要であると考えられた。すなわち、 $\beta$ -amyloid がヒトと相同である齧脚類および犬では加齢性に老人斑が形成されるが、 $\beta$ -amyloid のアミノ酸配列が異なるネコ科動物では老人斑が形成されないことが分かった。一方で、神経細胞内における  $\beta$ -amyloid oligomer の蓄積が Tau のリン酸化および oligomer 化に関与することが示唆された。Tau については、アミノ酸配列および発現アイソフォームに動物種間の多様性があり、神経細胞内における Tau の凝集との関連性について今後解析する予定である。

## (2) Tau に関連した $\alpha$ -synuclein 凝集の解析

本研究では、ヒト型 Tau を過剰発現するマウスの脳において、マウスの野生型  $\alpha$ -synuclein が凝集することを初めて明らかにした。具体的には、以下の研究結果から Tau の凝集に関連してリン酸化酵素が活性化し、 $\alpha$ -synuclein のリン酸化および oligomer 化が促進されることが示唆された。

PS19 マウスの脳における  $\alpha$ -synuclein の凝集

ヒトの変異型 Tau(P301S)を過剰発現する PS19 マウスの大脳において、リン酸化 Tau が蓄積した神経細胞内にリン酸化  $\alpha$ -synuclein の凝集物が形成されることを明らかにした。 $\alpha$ -synuclein 凝集物は加齢性に増加し、脳内における分布が Tau の蓄積程度と相関した(Takaichi Y et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2021)。

rTg4510 マウスの脳における  $\alpha$ -synuclein の凝集

ヒトの変異型 Tau(P301L)を過剰発現する rTg4510 マウスの大脳において、リン酸化 Tau が蓄積した神経細胞内にリン酸化  $\alpha$ -synuclein の凝集物が形成されることを明らかにした。 $\alpha$ -synuclein 凝集物は加齢性に増加し、脳内における分布が Tau の蓄積程度と相関した。また、ドキサイクリン投与により Tau 発現を抑制したところ、 $\alpha$ -synuclein の凝集が抑制された(Takaichi Y et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2018)。

$\alpha$ -synuclein のリン酸化および oligomer 化

rTg4510 マウスの神経細胞に凝集する  $\alpha$ -synuclein が proteinase K 処理に抵抗性を示すことを明らかにした。さらに、大脳のサルコシル不溶性分画(凝集蛋白質を含む分画)において、rTg4510 マウスでは  $\alpha$ -synuclein oligomer が有意に増加しており、それらがユビキチン化されていることを確認した。また、Tau および  $\alpha$ -synuclein の凝集が見られた神経細胞において活性化型のリン酸化酵素(GSK-3 $\beta$ )が発現していることが分かった(Takaichi Y et al. Acta Neuropathol Commun. 2020)。

以上の研究成果から、リン酸化酵素の活性化を介して Tau と  $\alpha$ -synuclein が相互作用することにより、両蛋白質の凝集が促進されることが考えられた。最近の海外の報告においても、Tau をノックアウトしたマウスでは  $\alpha$ -synuclein の凝集が抑制されることが示されている(Pan L et al. Brain. 2022)。この相互作用のメカニズムを解明することで予防法の開発が期待される。

## (3) 動物の遺伝性神経変性疾患の遺伝子変異および病態の解析

本研究では、ヒトのニーマンピック病およびカナバン病に相当する疾患をネコにおいて発見し、その原因である遺伝子変異を同定した。また、イヌのラフォラ病およびネコの海馬硬化の病態を解析し、以下の成果が得られた。

ネコの海綿状脳症における ASPA 遺伝子の変異

これまでネコの海綿状脳症と呼ばれていた疾患について、Aspartoacylase 遺伝子の変異を発見した。Aspartoacylase は N-acetylaspartate の加水分解酵素であり、罹患ネコの尿中における N-acetylaspartate が有意に増加していた。Aspartoacylase 遺伝子の変異はヒトのカナバン病で報告されており、同様の病態と考えられた(Takaichi Y et al. Vet Pathol. 2021)。

ネコのニーマンピック病における SMPD1 遺伝子の変異

ヒトのニーマンピック病 A 型と同様の疾患をネコにおいて発見し、acid sphingomyelinase 遺伝子の変異および発現量低下により神経細胞内に sphingomyelin が蓄積することを明らかにした(Takaichi Y et al. Vet Pathol. 2020)。

イヌのラフォラ病における Laforin 蛋白質の蓄積

イヌのラフォラ病において、神経細胞および神経突起に Laforin 蛋白質が蓄積し、同じ細胞においてオートファジー関連蛋白質の発現が亢進することを明らかにした(Chambers JK et al. Vet Pathol. 2018)。

ネコの海馬硬化における神経細胞の脱落に関する研究

ネコの薬物抵抗性のてんかん症例において、海馬の形成異常に関連して神経細胞が脱落することを明らかにした(Chambers JK et al. J Vet Med Sci. 2022)。

以上の研究成果から、動物における一部の遺伝性神経変性疾患について、ヒトの遺伝性神経変性疾患のモデルとして有用であることが示され、治療法開発への応用が期待される。

## 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 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takaichi Yuta, Chambers James K., Shiroma-Kohyama Moeko, Haritani Makoto, Une Yumi, Yamato Osamu, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 58
2. 論文標題 Feline Spongy Encephalopathy With a Mutation in the <i>ASPA</i> Gene	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 705 ~ 712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/03009858211002176	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 Takaichi Yuta, Chambers James K., Takahashi Kei, Soeda Yoshiyuki, Koike Riki, Katsumata Etsuko, Kita Chiaki, Matsuda Fuko, Haritani Makoto, Takashima Akihiko, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Amyloid and tau pathology in brains of aged pinniped species (sea lion, seal, and walrus)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01104-3	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 Takaichi Yuta, Chambers James K., Kok Mun Keong, Uchiyama Hiroki, Haritani Makoto, Hasegawa Daisuke, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 57
2. 論文標題 Feline Niemann-Pick Disease With a Novel Mutation of <i>SMPD1</i> Gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 559 ~ 564
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985820921810	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 Takaichi Yuta, Chambers James K., Inoue Hiroyuki, Ano Yasuhisa, Takashima Akihiko, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphorylation and oligomerization of -synuclein associated with GSK-3 activation in the rTg4510 mouse model of tauopathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-00969-8	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 Takaichi Yuta, Chambers James K., Kok Mun Keong, Uchiyama Hiroki, Haritani Makoto, Hasegawa Daisuke, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Feline Niemann-Pick Disease With a Novel Mutation of SMPD1 Gene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985820921810	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 該当する

1. 著者名 Takaichi Yuta, Ano Yasuhisa, Chambers James K, Uchida Kazuyuki, Takashima Akihiko, Nakayama Hiroyuki	4. 巻 77
2. 論文標題 Deposition of Phosphorylated $\tau$ -Synuclein in the rTg4510 Mouse Model of Tauopathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology and Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 920 ~ 928
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nly070	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 Chambers James K., Thongtharb Atigan, Shiga Takanori, Azakami Daigo, Saito Miyoko, Sato Masumi, Morozumi Motoji, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 55
2. 論文標題 Accumulation of Laforin and Other Related Proteins in Canine Lafora Disease With <i>EPM2B</i> Repeat Expansion	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 543 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985818758471	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 Takaichi Yuta, Chambers James K, Ano Yasuhisa, Takashima Akihiko, Nakayama Hiroyuki, Uchida Kazuyuki	4. 巻 80
2. 論文標題 Deposition of Phosphorylated $\tau$ -Synuclein and Activation of GSK-3 and PP2A in the PS19 Mouse Model of Tauopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology and Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 731 ~ 740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlab054	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 Habiba Umma, Ozawa Makiko, Chambers James K., Uchida Kazuyuki, Descallar Joseph, Nakayama Hiroyuki, Summers Brian A., Morley John W., Tayebi Mourad	4. 巻 5
2. 論文標題 Neuronal Deposition of Amyloid- Oligomers and Hyperphosphorylated Tau Is Closely Connected with Cognitive Dysfunction in Aged Dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease Reports	6. 最初と最後の頁 749 ~ 760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/ADR-210035	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 CHAMBERS James K., IWASAKI Shinya, IMAMOTO Shigeki, NAKAMOTO Yuya, UCHIDA Kazuyuki	4. 巻 84
2. 論文標題 A case of feline temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis and dentate gyrus malformation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 634 ~ 637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0006	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10件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Takaichi Y, Washinuma T, Inoue H, Ano Y, Chambers JK, Uchida K, Takashima A, Nakayama H
2. 発表標題 Detection of alpha-synuclein aggregates in the brain of two different mouse strains of tauopathy model, rTg4510 and PS19
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 高市雄太、チェンバースジェームズ、内田和幸、播谷亮、中山裕之
2. 発表標題 ニーマンピック病が疑われた猫の全身性脂質蓄積症の1例
3. 学会等名 第6回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 小川瑞恵、チェンパースジェームズ、内田和幸、中山裕之
2. 発表標題 ペンブローク・ウェルシュ・コーギー犬の変性性脊髄症の脊髄における空胞病変に関する病理学的検索
3. 学会等名 第60回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Chambers JK
2. 発表標題 Aging brain of various species: Comparative pathology of Alzheimer ' s disease
3. 学会等名 The 12th Asian Society of Conservation Medicine Conference 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 高市雄太、チェンパースジェームズ、内田和幸、城間萌子、中山裕之
2. 発表標題 ASPA遺伝子にc.859G>C変異を有する猫の海綿状脳症の病理学的検索
3. 学会等名 第7回日本獣医病理学専門家協会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Chambers JK
2. 発表標題 Aging-related brain changes and neurodegenerative disorders in animals
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Takaichi Y, Ano Y, Chambers JK, Uchida K, Takashima A, Nakayama H
2. 発表標題 Immunohistochemical detection of phosphorylated alpha-synuclein in the brain of a tauopathy model rTg4510 mice
3. 学会等名 19th International Congress of Neuropathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Watanabe K, Yokoyama M, Uchida K, Chambers JK, Nakayama H, Horiuchi N, Furuoka H, Matsui T, Miller A, Kobayashi Y
2. 発表標題 Neuropathological study of inclusion body disease of Japanese brown cattle
3. 学会等名 2018 ACVP and ASVCP concurrent annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 チェンバースジェームズ
2. 発表標題 スライドカンファレンス 神経系
3. 学会等名 日本毒性病理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 チェンバースジェームズ、高市雄太、立山優里子、三輪恭嗣、佐々木伸雄、中山裕之、兼子明久、宮部貴子、内田 和幸
2. 発表標題 33歳のオランウータンにみられた大脳白質ジストロフィーの1例
3. 学会等名 サル疾病ワークショップ
4. 発表年 2021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	内田 和幸  (Uchida Kazuyuki)  (10223554)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------