

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06542

研究課題名(和文) 生体マイクロイメージングによるタウおよび シヌクレイン病変の脳内伝播メカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanism for the propagation and clearance of tau and alpha-synuclein proteins in neurodegenerative disease

研究代表者

田桑 弘之 (Takuwa, Hiroyuki)

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・研究員(任常)

研究者番号：40508347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タウや シヌクレインなどの病原性蛋白質の脳内蓄積と脳外排出メカニズムの解明を目的として以下の研究を実施した。まず、生きた疾患モデル動物の脳内のタウや シヌクレインを蛍光標識して2光子顕微鏡による1細胞レベルの解像度で観察する計測系を構築し、それらが脳内に蓄積する様子を明らかにした。さらに、この生体脳イメージング系を用いて、タウ病変モデルマウスの脳内のタウ凝集体とアデノ随伴ウイルスにより蛍光標識した神経細胞とミクログリアを長期追跡的に観察した。その結果、ミクログリアがタウ凝集体を有する神経細胞を貪食して脳実質外に輸送する新たなクリアランスシステムの存在が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症は、病態進行とともに多くの医療費と介護を必要とし、患者本人にも社会的にも負荷が大きい疾患であり、一刻も早い治療法の開発が期待されている。本研究では、神経変性疾患発症の引き金となる病原性蛋白質の脳内蓄積および脳外排出メカニズムの一端を明らかにした。これらの病態メカニズムを基盤として、現在、病原性タンパクの蓄積・排出制御の実現のための研究を進めている。このような生体本来の機能を利用した治療法は、介入に伴う副次的な身体への負荷が小さくしながら、病気の原因を完全に除去することで大きな治療効果を生み出すことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To better understand the mechanism of intracerebral accumulation and clearance of pathogenic proteins that cause neurodegenerative diseases, we performed in vivo brain imaging of disease model animals. We developed an experimental system for visualizing tau and -synuclein at micrometer resolution using a two-photon microscope, and succeeded in longitudinally observing the accumulation of these pathogenic proteins in neurons. Moreover, we have longitudinally tracked neurons, microglia and aggregated tau with two-photon imaging. Neurons bearing tau fibrils underwent primary phagocytosis by activated microglia, followed by the transport of vesicles containing the neuronal fragments to the brain surface through vertical processes of the microglial cells. We observed that the microglia eventually released the neuronal fragments into the cerebrospinal fluid. Our findings indicate a newly microglial pathway for the clearance of misfolded proteins and neurons from the brain.

研究分野：神経科学

キーワード：タウ 神経変性疾患 クリアランス ミクログリア 神経細胞 二光子顕微鏡 PET

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、タウや α シヌクレインなどの病原性蛋白質の脳内への蓄積が引き金となり神経細胞死から著しい脳萎縮に至ると考えられている。そのため病態進行を防ぐには、病原性蛋白質が神経細胞内外に蓄積するメカニズムを理解することが重要といえる。また、近年の研究において、病原性蛋白質は脳内に蓄積するだけでなく、脳外へと排出されていくことが報告されている¹。例えば Nedergaard 博士らが提唱する Glymphatic system 仮説では、心拍や血管の拍動を駆動力として脳脊髄液が動脈周囲腔から脳実質内へと流入して静脈周囲腔をへてリンパ管および血管へと排出される。この脳実質内に流入する水が駆動力となり、細胞外の微細な老廃物を脳外へと排出すると考えられている。この Glymphatic system が加齢や疾患により障害されると、脳内への病原性蛋白質の蓄積が加速して神経変性疾患が発症すると主張している。

Glymphatic system 仮説では、細胞外に存在する微細な老廃物を水動態で排出することは説明できるが、神経細胞死で生じる細胞自体(病原性蛋白質を含む)の脳外への排出については説明できない。しかし、脳萎縮を起こすには必然的に病原性蛋白質を有する神経細胞を脳外へと排出しなければならいことから、新たな脳外排出系の存在の可能性が考えられた。もし、このような脳萎縮を引き起こす主要メカニズムを解明できれば、それを制御することで萎縮を伴う脳疾患の有効な治療になりうると考える。

2. 研究の目的

本研究では、神経変性疾患の引き金と考えられる病原性蛋白質の脳内への蓄積と、さらに脳外へと排出されていく過程の全容を明らかにしようと考えた。病原性蛋白質の蓄積と排出のメカニズムが明らかとなれば、それを制御することで病原性蛋白質を脳より排除して神経変性疾患を克服できる可能性も見えてくる。その為に以下の2つの課題を実施した。課題1)神経変性疾患の原因となるタウや α シヌクレインに特異的に結合する蛍光トレーサーを開発し、2光子顕微鏡によるマウスの生体脳イメージングを実現する。これによりタウや α シヌクレインが脳神経細胞に蓄積していく過程を追跡的に明らかにする。課題2)本研究の計画段階では、Glymphatic system による病原性蛋白質の脳外排出を想定しており、課題1で構築した生体脳イメージング系を用いて、脳内の病原性蛋白質がリンパ流により排出されていく過程を明らかにしようと考えていた。しかし、本研究を進めていく中で、脳実質内のミクログリアがタウ凝集体を有する神経細胞を貪食し、さらに脳外へと排出する手がかりを得た。そこで、既存の仮説と異なる新たな病原性蛋白質の脳外排出メカニズムの解明を進めた。

3. 研究の方法

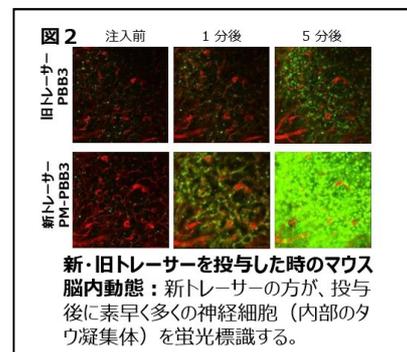
本研究では、病原性蛋白質の脳内蓄積を Positron emission tomography (以下、PET:陽電子放出断層撮影)を用いて全脳レベルのマクロな視点で評価し、さらに2光子励起レーザー顕微鏡(以下、2光子顕微鏡)を用いて1細胞レベルのミクロな視点で評価することで空間的にマルチスケールに病態進行を可視化した。特に、タウ凝集体のトレーサーである PBB3(または PM-PBB3)は、PETと2光子顕微鏡の両方で用いることができるマルチトレーサーであり、タウのマルチスケールイメージングに有効である。さらにPETと2光子顕微鏡は、同一個体から数ヶ月間以上の長期にわたり繰り返し測定することができるため、病態発症前後や治療介入前後などによる経時変化を同じ計測部位、または同一細胞より計測することができる。これに加えて、神

経炎症についてもPETと2光子顕微鏡（アデノ随伴ウイルスによりミクログリアを蛍光標識して観察）を用いてマルチスケールに評価した。

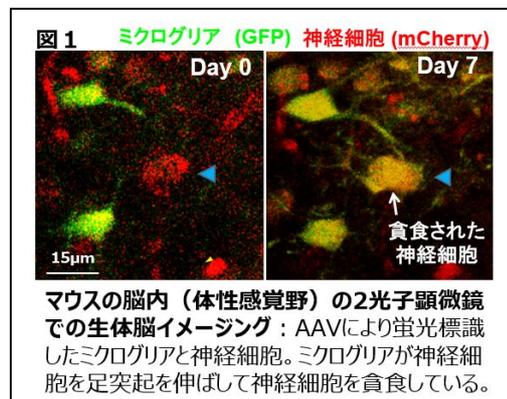
動物は、rTg4510 マウスを用いた。この遺伝子改変マウスは、脳神経細胞にタウ凝集体が蓄積して著しい脳萎縮を引き起こす。また、正常なB6マウスに病原性蛋白質を微小ガラス管で注入する方法も行った。2光子顕微鏡の撮像の準備として、これらのモデルマウスの頭部に頭蓋窓（頭蓋骨を円形に除去してガラスプレートで密閉）を設置した。撮像時は、対物レンズを頭蓋窓上部に設置して、脳表にレーザー照射して蛍光標識した細胞と病原性蛋白質から蛍光シグナルを検出した。

4. 研究成果

課題1) タウは微小管結合タンパクの1つで、微小管の形成と安定化に寄与するが、タウオパチーの脳では多くの部位で異常なリン酸化が生じて繊維状に凝集する。以前の研究で、この神経細胞内のタウ凝集体をPETと2光子顕微鏡の両方で検出可能なマルチモーダルトレーサーであるPBB3を報告している。今回は、このPBB3よりも高感度にタウ凝集体を検出可能なトレーサー（PM-PBB3）の開発している（図1）²。また、シヌクレインについて選択的に結合するトレーサーを用いて2光子顕微鏡を用いて観察が可能になった。これによりタウやシヌクレインなどの病原性蛋白質をマクロからミクロまで観察可能な評価系が構築され、脳神経細胞内への病原性蛋白質に蓄積の過程の観察に成功した。これらのマルチスケールな病態評価系は、現在、病原性蛋白質の蓄積に関連した治療法評価への応用を進めている。



課題2) rTg4510 マウスは、3~4ヶ月齢において2光子顕微鏡とPM-PBB3のイメージング技術を用いた神経細胞内のタウ凝集体の観察が可能になる。この2光子顕微鏡で検出されるタウ凝集体を有する神経細胞の数は、6~7ヶ月齢まで右肩上がりに増加するが、その後は顕著な増加を示さない。小動物PETによるマクロ（全脳）レベルでのタウ蓄積量評価においても、同様の傾向が見られた。さらにこの6~7ヶ月齢のrTg4510マウスにおいて、タウ凝集体を有する神経細胞を追跡的に長期観察すると至る所で細胞消失が起きていることがわかった。すなわち、6~7ヶ月齢以降の脳内ではタウ凝集体を有する神経細胞は増加する一方で、同時に神経細胞消失も起きるというターンオーバーが生じているため、脳内のタウ蓄積量は結果として一定になるという事が分かった。さらに、rTg4510マウスにおいて、蛍光蛋白質で標識したミクログリアと神経細胞を2光子顕微鏡により長期追跡的に観察した。その結果、タウ凝集体を有する神経細胞をミクログリアが貪食して消失させることが分かった（図2）。このミクログリアによる神経細胞の消失時に何が起きているのかを、さらに追跡的に観察した。その結果、ミクログリアが足突起を脳表方向に脳表（脳実質外）まで進展させ、その足突起内を神経細胞断片が脳表方向に輸送されて、脳実質外に放出することがわかった。このようなタウ凝集体を有する神経細胞を脳実質外に排出するミクログリアの働きは、神経変性疾患における脳萎縮の主要なメカニズムの1つである可能性が考えられる。現在このミクログリアによる老廃物（病原性蛋



白質)の脳外排出機構の制御方法の開発を進めており、これが実現されれば脳萎縮を抑制して機能を保持する治療法につながることを期待できる。

参考文献:1) J. J. Iliff et al., *Sci Transl Med* **4**, 147ra111 (2012), 2) Tagai et al., *Neuron* (2020).

doi:10.1016/j.neuron.2020.09.042

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hatakeyama N, Unekawa M, Murata J, Tomita Y, Suzuki N, Nakahara J, Takuwa H, Kanno I, Matsui K, Tanaka F K, Masamoto K	4. 巻 in press
2. 論文標題 Differential pial and penetrating arterial responses examined by optogenetic activation of astrocytes and neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism	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） なし	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 IkomaY, Takuwa H, Nishino A, Maeda J, Kawamura K, Obata T, Zhang M R, Higuchi M, Suhara, T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Measurement of changes in endogenous serotonin level by positron emission tomography with [18F]altanserin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nuclear Medicine	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） なし	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 Shimojo M, Takuwa H, Takado Y, Tokunaga M, Tsukamoto S, Minatohara K, Ono M, Seki C, Maeda J, Urushihata T, Minamihisamatsu T, Aoki I, Kawamura K, Zhang MR, Suhara T, Sahara N, Higuchi M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Selective Disruption of Inhibitory Synapses Leading to Neuronal Hyperexcitability at an Early Stage of Tau Pathogenesis in a Mouse Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosci.	6. 最初と最後の頁 3491-3501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI	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 Nagai Y. et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Deschloroclozapine: a potent and selective chemogenetic actuator enables rapid neuronal and behavioral modulations in mice and monkeys	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Obata Takayuki, Kershaw Jeff, Tachibana Yasuhiko, Miyauchi Takayuki, Abe Yoichiro, Shibata Sayaka, Kawaguchi Hiroshi, Ikoma Yoko, Takuwa Hiroyuki, Aoki Ichio, Yasui Masato	4. 巻 8
2. 論文標題 Comparison of diffusion-weighted MRI and anti-Stokes Raman scattering (CARS) measurements of the inter-compartmental exchange-time of water in expression-controlled aquaporin-4 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18;8(1):17954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-36264-9	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 Yoshii Yukie, Yoshimoto Mitsuyoshi, Matsumoto Hiroki, Tashima Hideaki, Iwao Yuma, Takuwa Hiroyuki, Yoshida Eiji, Wakizaka Hidekatsu, Yamaya Taiga, Zhang Ming-Rong, Sugyo Aya, Hanadate Sayaka, Tsuji Atsushi B., Higashi Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Integrated treatment using intraperitoneal radioimmunotherapy and positron emission tomography-guided surgery with ⁶⁴ Cu-labeled cetuximab to treat early- and late-phase peritoneal dissemination in human gastrointestinal cancer xenografts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 28935-28950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25649	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 Urushihata Takuya, Takuwa Hiroyuki, Seki Chie, Tachibana Yasuhiko, Takahashi Manami, Kershaw Jeff, Takado Yuhei, Aoki Ichio, Higuchi Makoto, Ito Hiroshi, Obata Takayuki	4. 巻 17
2. 論文標題 Water Diffusion in the Brain of Chronic Hypoperfusion Model Mice: A Study Considering the Effect of Blood Flow	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance in Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 318 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2463/mrms.mp.2017-0149	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 Takahashi Manami, Urushihata Takuya, Takuwa Hiroyuki, Sakata Kazumi, Takado Yuhei, Shimizu Eiji, Suhara Tetsuya, Higuchi Makoto, Ito Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Imaging of Neuronal Activity in Awake Mice by Measurements of Flavoprotein Autofluorescence Corrected for Cerebral Blood Flow	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 4;11:723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2017.00723	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3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroyuki Takawa
2. 発表標題 In vivo multiscale imaging of glymphatic clearance of tau and alpha-synuclein from the brain
3. 学会等名 Neuro 2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田桑弘之
2. 発表標題 In vivo multi-scale brain imaging with the Multiphoton Mesoscope
3. 学会等名 Neuro 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田桑弘之
2. 発表標題 脳の自浄システムとしてのアストロサイトとglymphaticシステム
3. 学会等名 日本認知症学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 樋口真人 田桑弘之	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 6
3. 書名 実験医学 vol137 No6	

1. 著者名 田桑弘之 加納正道	4. 発行年 2019年
2. 出版社 日本比較生理生化学会	5. 総ページ数 9
3. 書名 比較生理生化学 vol137 no1	

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

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
---------	---------