

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07456

研究課題名(和文) アルツハイマー病におけるタウ蛋白伝播機構の解明と治療ターゲットの研究

研究課題名(英文) Tau propagation mechanism and therapeutic target in Alzheimer's disease

研究代表者

本井 ゆみ子 (Yumiko, Motoi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60338407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：タウオバチーにおいてタウ蛋白が正常可溶性タウ蛋白を巻き込み、細胞から他の細胞へとプリオン蛋白のように伝播し病変が広がると考えられている。本研究では、アルツハイマー病脳ホモジネートを2ヶ月齢の野生型タウ過剰発現マウスTg601マウスの一側海馬に注入した。17～19ヶ月後、脳海馬にリン酸化タウおよび銀染色陽性のタウ病理およびミクログリアの増殖と、バーンスメイズテストにて学習障害を認めた。タウ病理とミクログリアの増殖はTg601マウスにて正常マウスよりも顕著であったが、学習障害には大きな差を認めなかった。長期間、老齢マウスで伝播を観察しえたことが行動障害をひきおこしやすい病態に結び付いたと考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ヒトアルツハイマー病をマウス脳に注入することによりヒトアルツハイマー病類似の脳変化および症状を再現することを示すことができた。本マウスモデルをアルツハイマー病の薬剤探索に使用することができるであろう。

研究成果の概要(英文)：Human tauopathy brain injections into the mouse brain induce the development of tau aggregates; however, the features of this neurotoxicity remain unclear. One reason may be short observational periods because previous studies mostly used mutated-tau transgenic mice and needed to complete the study before these mice developed neurofibrillary tangles. To examine whether long-term incubation of Alzheimer's disease (AD) brain in the mouse brain cause functional decline. We herein used Tg601 mice, which overexpress wild-type human tau, and non-transgenic littermates (NTg) and injected an insoluble fraction of the AD brain into the unilateral hippocampus. After a long-term (17-19 months) post-injection, mice exhibited learning deficits detected by the Barnes maze test, Aggregated tau pathology and increased Iba-1-positive microglia in the hippocampus. These results potentially implicate that long-term changes in non-mutated tau mice may reflect human pathological conditions.

研究分野：神経科学

キーワード：タウ蛋白 アルツハイマー病 プリオン様伝播 学習障害

1. 研究開始当初の背景

全認知症の60%を占めるアルツハイマー病では、変性部位の神経細胞内にタウ蛋白の凝集体である神経原線維変化(NFT)が観察される。近年、タウ蛋白が正常可溶性タウ蛋白を巻き込み凝集体を拡大させながら、細胞から他の細胞へとプリオン蛋白のように伝播し病変が広がる可能性が考えられるようになった。不溶性タウ蛋白を脳内に注入することによりNFTが形成されるが、使用するマウスや注入するタウ蛋白の性質により異なる結果が得られている。

2. 研究の目的

(1) 申請者らが作成した Tg601 マウスを用いてタウ伝播マウスモデルを確立する。タウ伝播マウスは多く再現されているが、使用したトランスジェニックマウスの種によって異なる結果がでていいる。本研究では私たちが作成した Tg601 マウスを用いることが特徴である。Tg601 マウスは既報のマウスと異なり、脊髄病変がなく、NFT が出現しないことから伝播により形成されたNFTによる影響が長期間観察でき、行動障害も評価できる。これまで、アルツハイマー病に特徴的な学習障害を示したアルツハイマー病脳注入マウスはみられていない。

(2) 凝集に関与する配列として PHF6(306-311)が同定されているが、伝播に寄与する配列の報告はない。本研究ではNFTの構成部分であるC末端に焦点をあて、20アミノ酸残基ずつ欠損変異体を作成し、伝播に最も関与する配列を同定し、免疫療法のターゲットとする。

3. 研究の方法

(1) Tg601 マウスによる伝播マウス作成：ヒトAD脳ホモジネートのTg601マウスおよび正常B6J/BLマウス2~4カ月齢の側海馬に注入した。19~21ヶ月齢で学習障害を評価するためにバーンズメイズテストを行った。終了後サクリファイし、抗リン酸化タウ抗体AT8および銀染色にて伝播の広がりを組織学的に評価した。神経変性の評価にはNeuN抗体、アストロサイトの評価にGFAP抗体、ミクログリアの評価にはIba-1抗体を用い、海馬切片でカウントした。

(2) タウ蛋白C末端(243-406)を20アミノ酸残基ずつ10カ所の欠損変異体を作成し、培養細胞に導入、タウオパチー脳(AD, 進行性核上性麻痺(PSP), 皮質基底核変性症(CBD))をseedとして添加しタウ凝集体を作成させ、凝集抑制配列の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) AD脳注入17ヶ月後、学習障害を示す

AD脳注入17ヶ月によりTg601にも正常マウス(NTg)の両方ともバーンズメイズテストにて第3施行($F[3, 61] = 4.1277, p = 0.0469$)と第5施行($F[3, 61] = 5.6253, p = 0.021$)において潜時が遅延しておりAD脳注入による学習障害が認められた(図1)。マウス表現型の有意差は第5施行においてのみ認められた($F[3, 61] = 8.9882, p = 0.0040$)が、相互作用はどの施行においてもなかった。第5施行トレーニング終了48時間後に回避ゲージをとりはずし、2分間探索を行った。標的四半円に存在するホール探索回数はAD脳注入群では減少していた($F[3, 57] = 9.2362, p = 0.0036$)。対側の四半円でのホール探索回数は逆に増加しており($F[3, 58] = 4.9642, p = 0.0298$)、AD脳一側海馬注入により、学習障害を示すことがわかった。

(2) AD脳注入17ヶ月~19ヶ月後のタウ病理はTgマウスでは正常マウスより顕著である。

リン酸化タウ(AT8)陽性神経細胞は歯状回顆粒細胞層では(図2a)、AD脳注入Tg601とNTgマウスの両方に認められ、Tgに多い傾向にあったが、有意差はなかった。海馬采のAT8陽性スレッズはAD脳注入群では有意に多かった($p < 0.05$) (図2b)。海馬錐体細胞層では、AD脳注入およびTg群で陽性細胞数は有意に多かった($P < 0.05$) (図2c)。海馬以外には青斑核、内側ラ

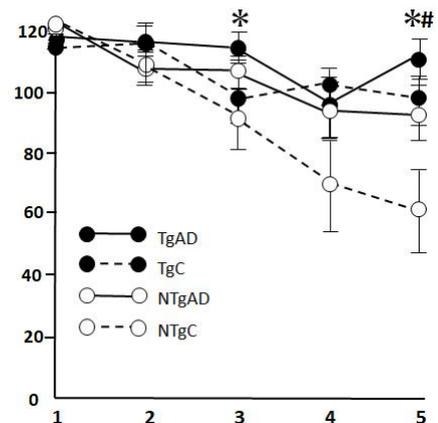


図1. バーンズメイズテスト
* <0.05 ADの注入効果
<0.05 マウス表現型効果
2元配置分散分析

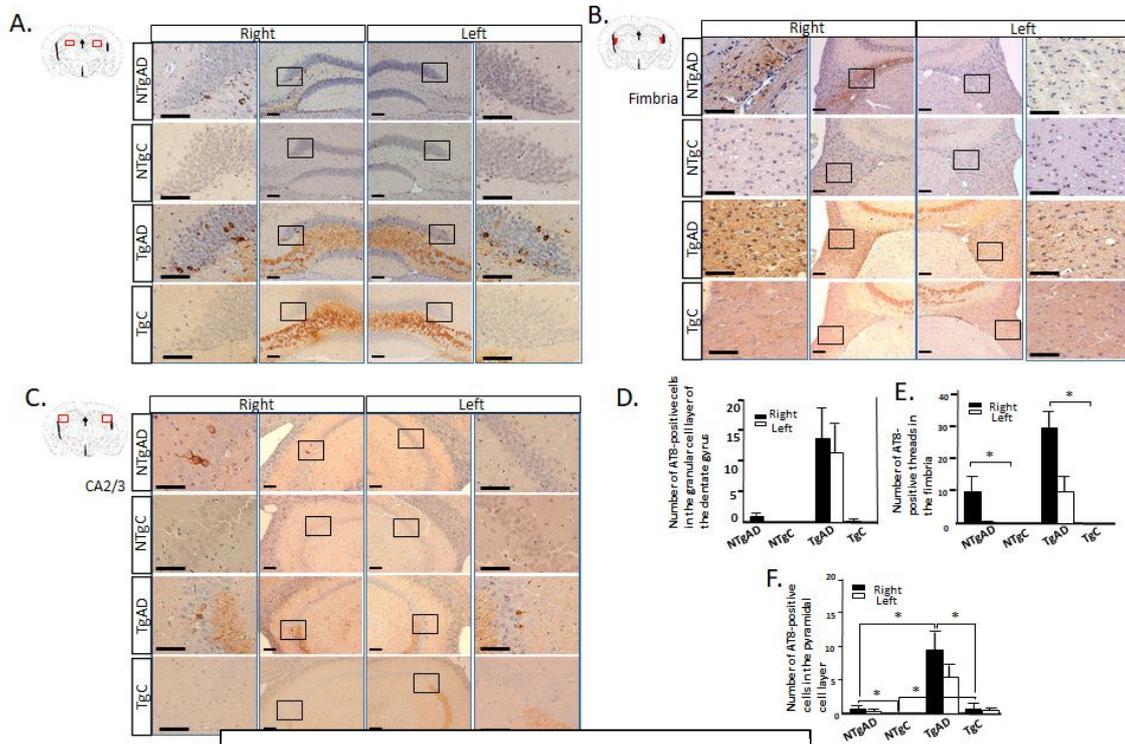


図 2. AD 脳注入後のリン酸化タウ陽性病理

ーフェ核で AT8 陽性構造を認めたが、個体のばらつきが強く統計学的有意差は得られなかった。これらの構造の多くはガリヤスブランク銀染色でも陽性だった。

(3) AD 脳注入はミクログリアの増殖を示す

ミクログリアマーカーの Iba1 抗体を用いてミクログリアの増殖を評価したところ、AD 脳注入群において優位にミクログリア数の増加を認めた(図 3)。アストロサイト細胞数を GFAP 抗体で神経細胞数を NeuN 抗体で評価したが、差はなかった。当研究では高齢マウスで検討したことが海馬ミクログリアの老化の影響が強くなり(1)、行動障害をひきおこしたと考えた。本マウスは高齢であり、行動障害も軽度であること、アミロイドは存在しないことからアルツハイマー病というよりも、primary age-related tauopathy (PART)の病態に近いと考えた(2)。また、Tg601ではタウを過剰発現していたことから伝播されたタウ病理も多かったと考えられるが、病理像の差ほど、学習障害は Tg と NTg で差がないように思われた。

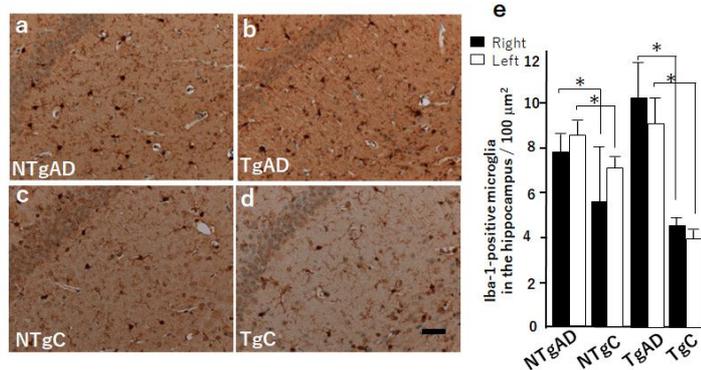


図 3 海馬におけるミクログリア数

(4) シード依存性凝集関連配列

AD 脳をシードとした凝集に関する配列として C 末端(243-406)部分が最も関与していた。同部位に対する抗体を作成し、培養細胞にシードとともに添加したが、凝集抑制効果はみられなかった。脅威深いことに CBD 脳をシードとした場合には異なる結果であった。

< 参考文献 >

(1) Grabert K, Michael T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, McColl BW (2016) Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* **19**, 504-516.

(2) Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, et al. (2014) Primary age-related tauopathy (PART): A common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol* **128**, 755-766.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Tetsuo, Shimonaka Shotaro, Elahi Montasir, Matsumoto Shin-Ei, Ishiguro Koichi, Takanashi Masashi, Hattori Nobutaka, Motoi Yumiko	4. 巻 79
2. 論文標題 Learning Deficits Accompanied by Microglial Proliferation After the Long-Term Post-Injection of Alzheimer's Disease Brain Extract in Mouse Brains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 1701 ~ 1711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/JAD-201002	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 Shimonaka Shotaro, Matsumoto Shin-Ei, Elahi Montasir, Ishiguro Koichi, Hasegawa Masato, Hattori Nobutaka, Motoi Yumiko	4. 巻 295
2. 論文標題 Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer's disease tau strain-specific aggregation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13996 ~ 14014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013271	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 Uddin Mohammad Nasir, Elahi Montasir, Shimonaka Shotaro, Kakuta Soichiro, Ishiguro Koichi, Motoi Yumiko, Hattori Nobutaka	4. 巻 543
2. 論文標題 Strain-specific clearance of seed-dependent tau aggregation by lithium-induced autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 65 ~ 71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.113	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 Motoi Yumiko, Hanger Diane P., Hasegawa Masato	4. 巻 14
2. 論文標題 Editorial: Tau Propagation Mechanisms: Cell Models, Animal Models, and Beyond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1 ~ 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.00456	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 Nakayama Sachiko, Shimonaka Shotaro, Elahi Montasir, Nishioka Kenya, Oji Yutaka, Matsumoto Shin-Ei, Li Yuanzhe, Yoshino Hiroyo, Mogushi Kaoru, Hatano Taku, Sato Takeshi, Ikura Teikichi, Ito Nobutoshi, Motoi Yumiko, Hattori Nobutaka	4. 巻 84
2. 論文標題 Tau aggregation and seeding analyses of two novel MAPT variants found in patients with motor neuron disease and progressive parkinsonism	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurobiology of Aging	6. 最初と最後の頁 240.e13 ~ 240.e22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.016	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Motoi Y, Uddin MN, Elahi M, Shimonaka S, Hattori N
2. 発表標題 Role of Lithium on autophagy in tau propagation cell model
3. 学会等名 日本神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimonaka S, Elahi M, Matsumoto SE, Hasegawa M, Hattori N, Motoi Y
2. 発表標題 Asparagine residue 368 is involved in Alzheimer's disease tau strain-specific aggregation
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uddin MN, Elahi M, Shimonaka S, Kakuta S, Ishiguro K, Motoi Y, Hattori N
2. 発表標題 Strain-specific Clearance of Tauopathy Seed-mediated Tau Aggregation by Lithium Induced Autophagy
3. 学会等名 Alzheimer's Association International Conference (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	下中 翔太郎 (Shimonaka Shotaro) (90778747)	順天堂大学・老年疾患研究センター・特任助教 (32620)	
研究協力者	エラヒ モンタシル (Elahi Montasir) (30750905)	順天堂大学・認知症・診断・予防治療学講座・特任助教 (32620)	

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