

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07825

研究課題名（和文）凝集タウの伝播におけるミクログリアの役割の解明

研究課題名（英文）The role of microglia in the propagation of tau aggregates

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病（AD）を含むタウオパチーにおいて、タウの凝集・伝播が病態の進行に深く関わっていることが示されている。また、微小管結合領域を含むタウのC末端断片（CTF）は全長タウよりも凝集しやすいことが報告されている。一方、ミクログリアがADのリスク因子であるTREM2を介してタウの伝播に關与する可能性が示唆されている。本研究では、新たなタウオパチーモデルマウスとして、Tau-CTFを発現するトランスジェニックマウスを作製し、解析を試みた。また、タウ伝播モデルにおけるTREM2の役割を解明するために、ゲノム編集によりTREM2欠損マウスおよびTREM2 R47Hノックインマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウオパチーにおける凝集タウの伝播のメカニズムはほとんど不明でありTREM2およびミクログリアの關与についても不明な点が多い。本研究で確立したTREM2ノックアウトマウスおよびTREM2 R47Hノックインマウスは、タウオパチーの病態におけるTREM2の役割の解明に非常に有用であると考えられる。一方、最近の報告では神経変性疾患だけではなく肥満やがんなど他の疾患においてもTREM2が重要な役割を果たしている可能性が示されており、本研究結果はタウオパチーのみならずTREM2が關与する様々な疾患の機序解明および治療法の開発に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that tau aggregation and propagation are closely related to the progression of tauopathies including Alzheimer's disease (AD). It has also been reported that the C-terminal fragment (CTF) of tau, which contains the microtubule-binding domain, is more easily aggregated than full-length tau. On the other hand, it has been suggested that microglia may be involved in tau propagation via TREM2, a risk factor for AD. In this study, we attempted to generate transgenic mice expressing Tau-CTF as a new tauopathy model mouse by genome editing and analyze them. In addition, to elucidate the role of TREM2 in the tau propagation model, we generated TREM2-deficient and TREM2 R47H knock-in mice by genome editing and analyzed them.

研究分野：病態神経科学、免疫学

キーワード：タウオパチー ミクログリア TREM2 タウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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ウ凝集体の細胞間伝播の可能性が注目されている。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; Tarutani et al, J. Biol. Chem. 2016)。本応募者も、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-CTF) が増加することを見出し、培養細胞モデルにおいてタウ凝集体をシードとして導入すると、Tau-CTF 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)。この細胞間伝播仮説はタウオパチーの病態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。

一方、近年の大規模ゲノム解析から、孤発性 AD の遺伝学的危険因子として triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) の R47H 変異が報告された。TREM2 は MG 表面に発現している自然免疫受容体であり貪食と炎症抑制に関与する。TREM2 の変異は 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)。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、研究課題の核心をなす学術的「問い」として、「MG がタウ凝集体の伝播と蓄積にどのように関与するのか」を設定し、培養細胞およびマウスの伝播モデルを用いて、課題の解明に取り組む。

2. 研究の目的

本研究では、MG が発現する TREM2 をはじめとする自然免疫受容体や、サイトカイン等の液性因子がタウオパチー病態の進行に果たす役割を明らかにするために、培養細胞を用いた凝集タウの伝播モデルを確立する。また、伝播における TREM2 の役割を検討するために、Tau-CTF トランスジェニックマウス、TREM2 欠損マウス、および TREM2 R47H ノックインマウスを作製し、これらのマウスを用いた伝播モデルを確立する。

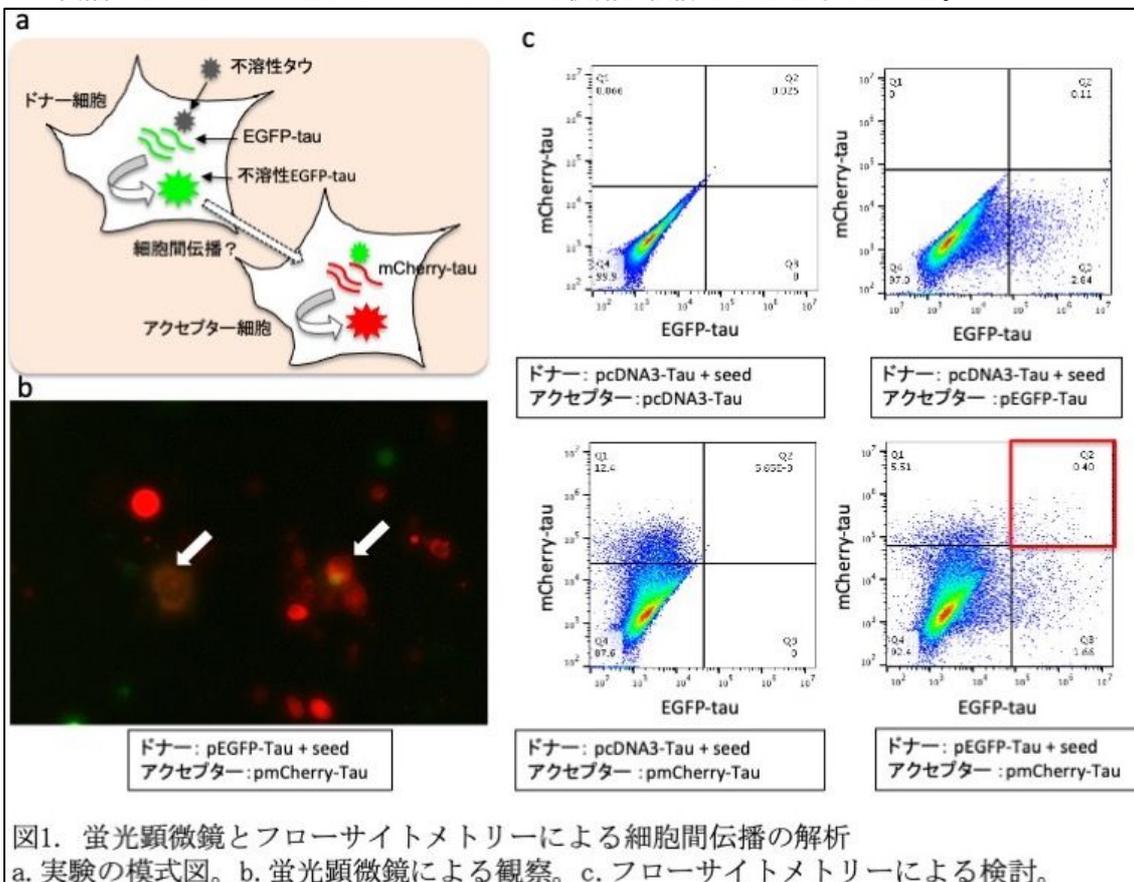
3. 研究の方法

- (1) 神経系細胞株 SH-SY5Y を用いたタウ伝播モデルを確立し、MG がタウの細胞間伝播に与える影響を検討する。さらに、MG において TREM2 のノックアウト、R47H 変異のノックイン等を行い、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。また、MG 表面に発現する自然免疫受容体や、培養上清中に分泌されるサイトカインやの定量等を行い、これらの因子が細胞内タウのリン酸化・凝集・蓄積にどのような影響を与えるか検討する。
- (2) タウ凝集体をマウスの脳内に投与することで *in vivo* 伝播モデルを作製することが可能である (Clavaguera et al, Nat. Cell. Biol. 2009)。Tau-FL よりも凝集しやすい Tau-CTF を発現する Tau-CTF マウスを作出することにより、より早期にタウの伝播を検討できるモデルの確立を目指した。さらに TREM2 欠損マウスおよび TREM2 R47H 変異マウスを作出し、Tau-CTF マウスと交配することで *in vivo* 伝播モデルを作製し、伝播における TREM2 および MG の役割を生化学的解析や免疫組織染色により検討する。

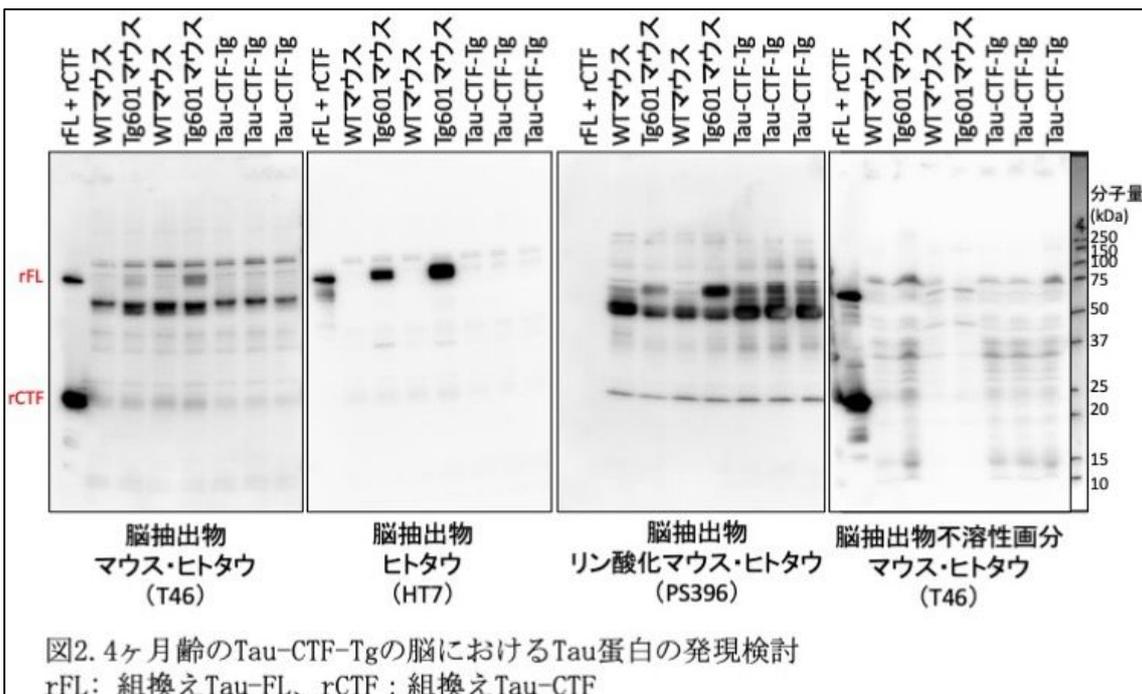
4. 研究成果

- (1) 細胞間伝播モデルの確立：蛍光蛋白と融合させたタウ蛋白 (EGFP-Tau) を過剰発現させた SH-SY5Y 細胞株に、*in vitro* で凝集させたりコンビナント Tau を導入することで細胞内に不溶性 EGFP-Tau の蓄積を誘導した。これに異なる蛍光蛋白を融合させたタウ蛋白 (mCherry-Tau) を発現させた SH-SY5Y 細胞を混合培養することで細胞間伝播モデルを作製した (図 1a)。蛍光顕微鏡によって EGFP-Tau と mCherry-Tau の局在を検討した結果、いくつかの細胞では EGFP-Tau と mCherry-Tau とが同じ細胞に共局在していることを確認できた (図 1b、白矢印)。また、フローサイトメトリーによっても EGFP-Tau と mCherry-Tau とが共に陽性である細胞が存在することを確認できた (図 1c、赤四角)。以上のことから、EGFP-Tau あるいは mCherry-Tau が何らかの機構で異なる細胞間を伝播していると考えられた。今後、この細胞間伝播モデルに、野生型マウス、TREM2 欠損マウス、TREM2 R47H ノックインマウスから調製した初代培養ミクログリアあるいは骨髄由来マクロファージ等を共培養することで、タウの細胞間

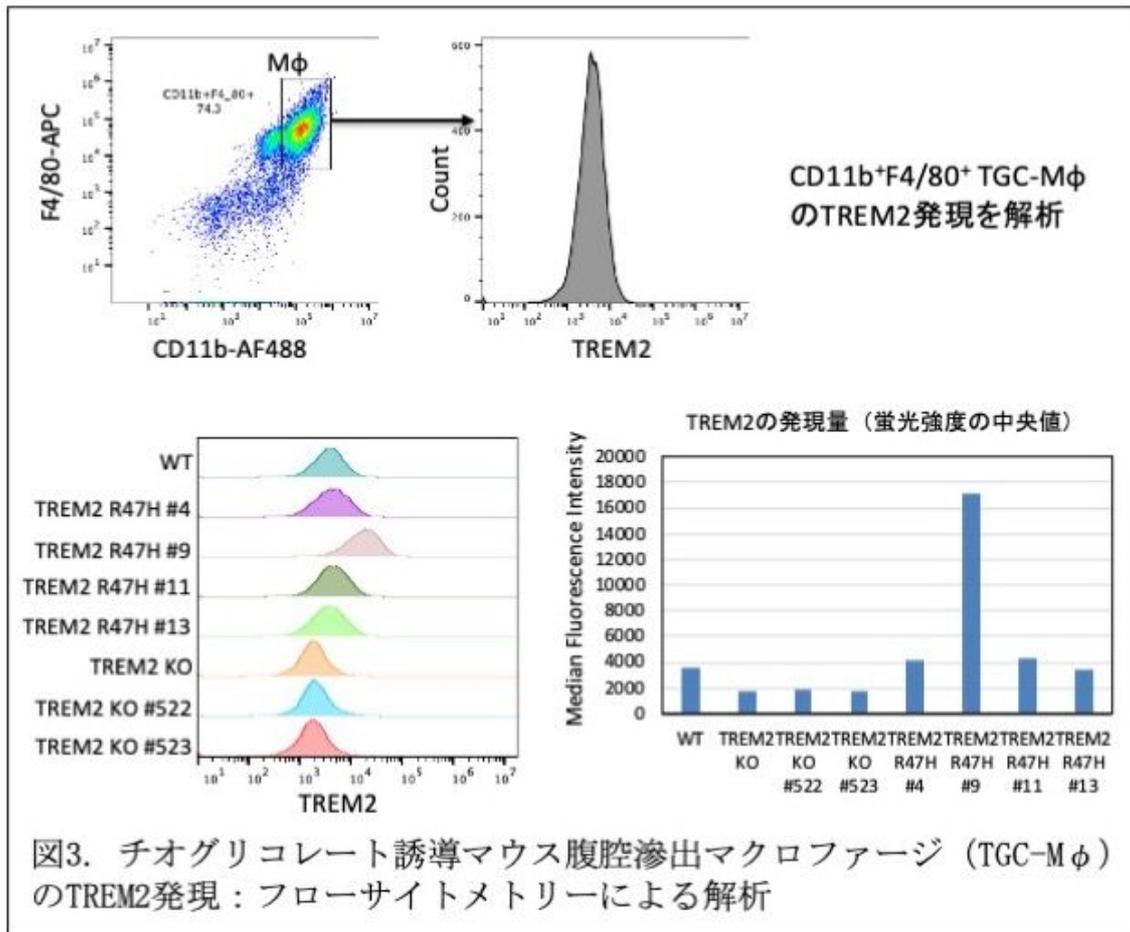
伝播における TREM2 およびミクログリアの役割を検討できると考えられる。



- (2) ヒトの Tau-FL を過剰発現するトランスジェニックマウス Tg601 にゲノム編集を施すことにより、Tau-CTF を過剰発現するトランスジェニックマウス Tau-CTF-Tg の作出を試みた。出生した 4 匹のマウスのうち 1 匹のみで目的の Tau-CTF の cDNA を確認することができた。このマウスの次世代 (F1) のマウスの脳における Tau-CTF 蛋白の発現をウエスタンブロッティングにより解析した結果、不溶性画分における内在性マウスタウの増加やリン酸化増強が見られたものの、Tau-CTF そのものの発現を確認することができず (図 2)、時間や費用の制約から、Tau-CTF-Tg マウスの作出は断念した。



一方、ゲノム編集により TREM2 欠損マウス 2 系統および TREM2 R47H 変異マウス 4 系統を作出した。それぞれのマウスよりチオグリコレート誘導腹腔滲出マクロファージ (TGC-M ϕ) を調製し、フローサイトメトリーにより TREM2 の発現量を検討し、TREM2 KO #523、TREM2 R47H #4 をそれぞれ適切な系統として選択した (図 3)。今後、これらのマウスを用いてタウ伝播モデルを構築することにより、タウ伝播における TREM2 および MG の役割を検討する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本信英、立部誉、原博満
2. 発表標題 神経変性疾患のリスクバリエーションTREM2 R47Hノックインマウスの作出
3. 学会等名 第12回鹿児島神経科学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本信英
2. 発表標題 Characterization of lipid-induced macrophages derived from bone marrow
3. 学会等名 9th ITAM workshop
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
---------------------------	-----------------------	----

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