

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20670

研究課題名(和文) 多重フッ素MR画像法によるタウオリゴマーの画像化とタウ病変進展機構の解明

研究課題名(英文) Imaging of tau oligomers by multiple fluorine MR imaging and elucidation of tau lesion progression mechanism

研究代表者

加藤 智子 (Kato, Tomoko)

滋賀医科大学・神経難病研究センター・特任助教

研究者番号：90754367

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)や前頭側頭葉変性症などのタウオパチーと呼ばれる認知症疾患においては、異常にリン酸化されたタウ蛋白が神経原線維変化となって蓄積し、その度合いが認知症の進行度と強く相関することが知られている。そこで、本研究ではヒト剖検脳組織標本を使った結合試験を用いて、アルツハイマー病の異常リン酸化タウ蛋白凝集体に結合する化合物をスクリーニングした。さらに、化合物の結合部位と抗リン酸化タウ抗体や抗タウオリゴマー抗体との共存関係を調べた。また、変異型ヒトタウ遺伝子改変モデルマウスを用いて、タウ結合候補化合物を投与し、フッ素MR画像法による脳内タウイメージングを目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADの確定診断は、神経病理学的に老人斑と神経原線維変化の存在を証明することであるが、患者さんの脳生検を行うことは困難であり、体外から老人斑や神経原線維変化を検出する画像診断法が重要である。現在、陽電子放出断層撮影法(PET)を用いて老人斑を画像化するアミロイドイメージング法の開発が進められているが、アミロイドイメージング法はADの早期診断には有効であるが、老人斑の数は病気の発症や重症度と比例しないことから、ADの発症や重症度を反映するタウイメージング法の開発が必要とされている。その画像化法の開発は、タウオパチーの病態解明や診断治療法の開発にとって有力なツールになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is known that abnormally phosphorylated tau protein accumulation in neurofibrillary tangle strongly correlates with the degree of progression of dementia in neurodegenerative diseases known as tauopathies such as Alzheimer's disease (AD) and frontotemporal lobar degeneration. In this study, we screened compounds that bind to abnormal phosphorylated tau protein aggregates using Alzheimer's disease human autopsy brain tissue. Furthermore, the colocalization of the binding site of compound with anti-phosphorylated tau antibody and anti-tau oligomer antibody was investigated. In addition, the tau binding compound was administered in a mouse model of a mutant human tau accumulation to aim at intracerebral tau imaging by fluorine MR imaging.

研究分野：神経科学

キーワード：アルツハイマー病 タウ MRイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) や前頭側頭葉変性症などのタウオパチーと呼ばれる認知症疾患においては、異常にリン酸化されたタウ蛋白が神経原線維変化となって蓄積し、その度合いが認知症の進行度と強く相関することが知られている。その早期にタウ凝集体形成に先立って起こる現象は、タウオリゴマーの出現である。AD ではアミロイド凝集体よりもアミロイドオリゴマーが神経毒性と相関していると考えられているように、タウオリゴマーも疾患の発症や毒性と強く関わっている可能性がある。タウオリゴマーは、強い神経傷害性を有するとともに、タウ蛋白凝集体 (神経原線維変化) の形成を促し、その脳内伝搬にも深く関わるとされる。すなわち、異常タウ蛋白の形成、その伝搬の機構を解明し、それを防止することができれば、認知症の治療に繋がる。しかしながら、「タウオリゴマーが脳のどこに出現し、タウ凝集体がどのように形成されて広がっていくのか」、その詳細は全く不明である。

たとえば、AD の確定診断は、神経病理学的に老人斑と神経原線維変化の存在を証明することであるが、患者さんの脳生検を行うことは困難であり、体外から老人斑や神経原線維変化を検出する画像診断法が重要である。現在、陽電子放出断層撮影法 (PET) を用いて老人斑を画像化するアミロイドイメージング法の開発が進められている。しかしながら、AD の診断において、アミロイドイメージング法は早期診断には有効であるが、老人斑の数は病気の発症や重症度と比例しないことから、AD の発症や重症度を反映するタウイメージング法の開発が必要とされている。これまでに滋賀医科大学・神経難病研究センターでは、AD の診断をめざし、老人斑のベータアミロイド (A β) に結合するプローブを開発し、フッ素を用いた MR 画像法の研究を行ってきた。フッ素 MR 画像法では、¹⁹F は天然では他の同位体が存在せず、生体内でのバックグラウンドノイズが低く、PET に比べて生体に非侵襲で、費用も安い。タウイメージングについては、異常リン酸化タウ蛋白凝集体に結合する Shiga-X35 を rTg4510 マウスに投与してフッ素 MR 画像による脳内のタウイメージングに成功して特許を出願 (特願 2017-046350) するとともに、国際学術誌に発表した (J Neurosci Res, 96:841-851, 2018)。しかし、タウオリゴマーに特異的に結合する低分子化合物は見つかっておらず、タウオリゴマーを *in vivo* で可視化する技術は、まだ確立されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、タウオリゴマーに特異的に結合する低分子化合物を見つけ出し、フッ素 MR 画像法の特徴を活かしてタウオリゴマーを *in vivo* で可視化する世界初の技術を開発するとともに、多重フッ素 MR 画像法を用いてタウオリゴマーとタウ蛋白凝集体を同時画像化し、変異タウ遺伝子改変モデルマウスを用いて、タウオパチーの発症メカニズムを解明することである。その画像化法の開発は、タウオパチーの病態解明や診断治療法の開発にとって有力なツールになる可能性がある。本研究では、以下のように研究を進める。

(1) タウオリゴマー、タウ凝集体結合候補化合物の開発

(2) タウ遺伝子改変モデルマウスを用いた *in vivo* 実験

モデルマウス脳内に生じるタウオリゴマーやタウ凝集体を同時に画像化し、マウスを生かしたまま経時的に観察する方法をめざす。すなわち、probe のケミカルシフトの違いを利用して複数の化合物を同時投与して、タウオリゴマーと神経原線維変化など複数の病変が同時に検出可能かを探る。また、同時画像化により、これまで不可能であった両者の関係を経時的に解析する方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) タウオリゴマー、タウ凝集体結合候補化合物の開発

これまでに滋賀医科大学・遠山研究室で開発、合成してきた Shiga-X (ベンゾオキサゾール誘導体)、Shiga-Y (クルクミン誘導体) 系などの約 200 種類の化合物、さらに、タウイメージング試薬として報告されている PET リガンドなども参考にして、新しいタウ蛋白凝集体結合物質として Shiga-T 化合物の合成も行った。

(2) ヒト剖検脳組織標本を使った結合試験

滋賀医科大学倫理審査委員会の承認を受けた後、滋賀医科大学ブレインバンクのヒト剖検脳組織標本を用いて、タウ蛋白と結合する化合物をスクリーニングした。アルツハイマー病ヒト組織切片で組織化学的に異常リン酸化タウ蛋白凝集体と結合すると考えられたものについて、ジメチルスルホキシド中に溶解した化合物を 50% エタノール中に 200 μ M または 400 μ M の濃度で溶解し、TrueBlack (Biotium 社) で自家蛍光を抑制した脳切片と 30 分間反応させた。洗浄後、顕微鏡で蛍光を観察した。

(3) 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 測定装置を用いた *in vitro* 結合試験

タウのオリゴマーおよびフィブリルのどちらに結合しやすいかを測定装置を用いた *in vitro* アッセイで検討した。QCM 法は、水晶発振子の金属薄膜上にタウタンパク質を固定し、その表面に化合物が吸着するとその質量に応じて、共鳴振動数が減少することから、タウタンパク質に対する化合物の結合量を調べることができる。まず、タウタンパク質として、リコンビナントヒト TAU441 を原料にタウモノマーからタウオリゴマーを作成した (文献 1)。タウフィブリルはヘパリンを使用し、生成条件を添加物や反応温度等の面から検討した。作成したタウオリゴマーおよびタウフィブリルと化合物との結合を QCM 法で評価した。具体的には、ジメチルスルホキシド中に溶解した化合物を、水晶発振子上のタウオリゴマーあるいはタウフィブリルとリン酸緩衝食塩水中で結合させ、結合量を求めた。タウフィブリルとの結合はチオフラビン T との結合を参考にした。

(4) タウ遺伝子改変モデルマウスを用いた *in vivo* 実験

滋賀医科大学遺伝子組換え実験安全委員会、動物実験委員会の承認を得て、ジャクソン研究所 (米国) が販売している変異型ヒトタウ遺伝子改変モデルマウス (rTg4510) にタウ結合化合物の候補薬を投与し、フッ素 MR 画像法によるタウイメージングを行った。麻酔下にマウスの尾静脈から、尾静脈から候補薬を約 90 分かけて静注する。10 分間のシングルパルス測定と 50 分間のフッ素 MR 画像を繰り返し行い、経時的にタウイメージングを行った。野生型マウスをコントロールとした。

MR 測定後にマウスを安楽死させ、脳を取り出して固定した。組織標本を作製し、試薬の持つ蛍光とタウ免疫組織化学法による蛍光染色を組み合わせ、候補薬が神経原線維変化に結合しているか確認した。

4. 研究成果

(1) タウ凝集体結合候補化合物の開発とヒト剖検脳組織標本を使った結合試験

これまでに当研究室で合成した Shiga-X、Shiga-Y、Shiga-T 系などの 200 以上の化合物の中から、アルツハイマー病の病理組織と反応させ神経原線維変化と結合する Shiga-X34、Shiga-T12 など数種類の化合物を得た (図 1)。これらの中には、免疫組織化学的に異常リン酸化タウ蛋白凝集体と結合する化合物とタウオリゴマーにも結合すると思われる化合物も含まれた (図 2)。

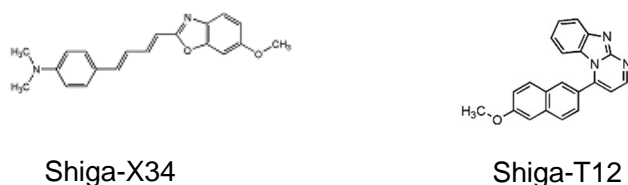


図 1 タウ結合候補化合物の構造式

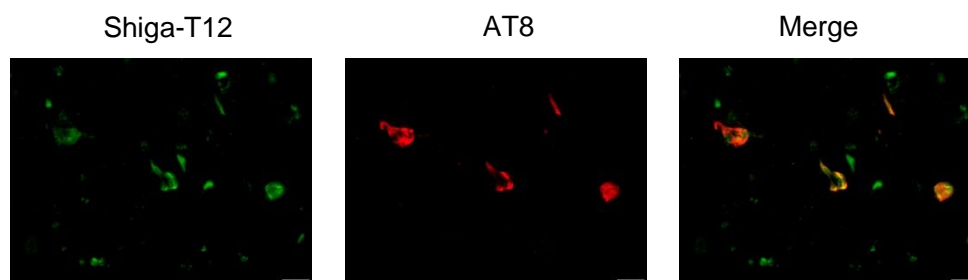


図 2 ヒト剖検脳組織 (AD) と Shiga-T12 の結合試験

さらに Shiga-X34、Shiga-T12 について、ピック病や大脳皮質基底核変性症 (CBD) のタウ病変との結合を調べた。その結果、Shiga-X34 は AD の神経原線維変化のみならず老人斑にも結合し、ピック病のタウ病変にも結合したが、CBD のタウ病変には結合しなかった。Shiga-T12 は AD の神経原線維変化に結合が認められ、老人斑には結合しなかった。さらにピック病、CBD のタウ病変には結合しなかった。これらのことから、タウの異常構造は疾患により異なり、Shiga-T12 は AD の神経原線維変化に最も特異性が高いと思われ、プローブの母核としてタウイメージングに有用であることが示唆された。

(2) 水晶発振子マイクロバランス (QCM) 測定装置を用いた in vitro 結合試験

ジメチルスルホキシド中に溶解した化合物を、水晶発振子上のタウオリゴマーあるいはタウフィブリルとリン酸緩衝食塩水中で結合させ、結合量を求めた。その結果、Shiga-T12 はタウフィブリルでは共鳴振動数が減少したことから、タウフィブリルに結合することがわかった(図3)。しかしながら、タウオリゴマーとの結合については、タウオリゴマーだけを抽出することが困難でモノマーも多く含んだ混合物を実験に使用したため、最終的な判定はできなかった。

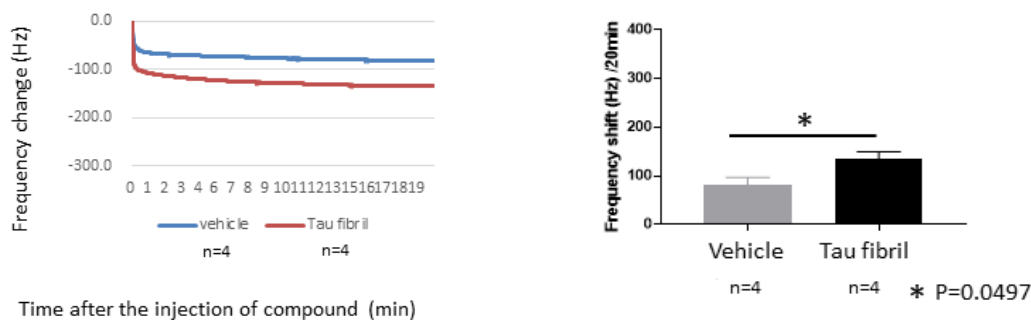


図3, Shiga-T12 とタウ凝集体 (フィブリル) の QCM 法を用いた結合試験

そこで、Shiga-X34、Shiga-T12 について、ヒト脳組織切片抗リン酸化タウ抗体 (AT8) や抗タウオリゴマー抗体 (T22) との共存関係を調べた結果、Shiga-X34 と Shiga-T12 はヒト脳組織切片で抗リン酸化タウ抗体 AT8 と一部共存していた。さらに、Shiga-T12 は抗タウオリゴマー抗体と一部共存していた (図4)。

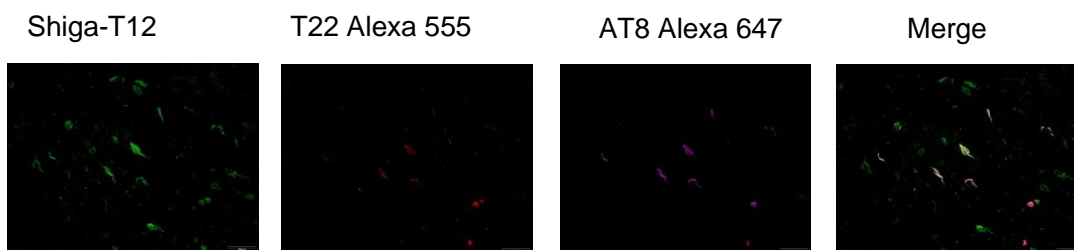


図4, Shiga-T12 と免疫組織化学法を用いた AD ヒト脳組織におけるタウ凝集体との共局在

(3) タウ遺伝子改変モデルマウスを用いた in vivo 実験

タウ結合候補薬である Shiga-T12 にフッ素 MR 画像法のために、フッ素を付けて合成した Shiga-T13 を変異型ヒトタウ発現モデルマウス rTg4510 に投与し、フッ素 MR イメージングを行った。マウスの脳を取り出して固定し、組織標本を作製し、試薬の持つ蛍光とタウ免疫組織化学法による蛍光染色を組み合わせて、候補薬が神経原線維変化に結合しているか確認した。組織切片にして観察したところ、Shiga-T13 は脳に入り、モデルマウスのタウに結合していた (図5)。

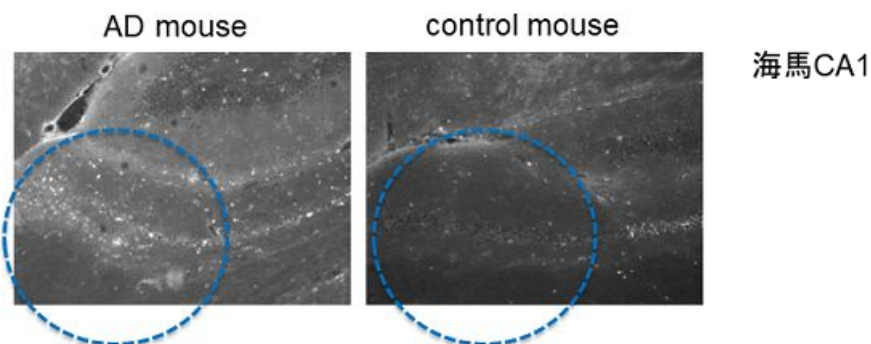


図5 Shiga-T13 投与 (100mg/Kg) におけるタウ遺伝子改変モデルマウスの海馬組織への移行

Shiga-T13 をタウ遺伝子改変モデルマウスに投与して、フッ素 MR 画像法によるタウイメージング画像を得るために必要な投与量では、毒性が出やすいことがわかった。今後、毒性が少なく、感度も高く、タウオリゴマーに選択性の高い試薬の開発を目指す必要がある。

本研究の結果、タウオリゴマーに結合する可能性のある複数の化合物を同定することができた。しかしながら、タウオリゴマーに特異的に結合しているかは、判定できなかった。候補化合物のひとつである Shiga-T13 をタウ遺伝子改変モデルマウスに投与して、フッ素 MR 画像法によるタウイメージに挑戦したが、タウイメージング画像を得るために必要な投与量では、毒性が出やすいことがわかった。今後、毒性が少なく、感度も高く、タウオリゴマーに選択性の高い試薬の開発を目指す必要がある。

文献 1 . Cristian A. Lasagna-Reeves, et al. Preparation and Characterization of Neurotoxic Tau Oligomers *Biochemistry* 2010, 49, 10039-10041

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Pahrudin Arrozi A, Yanagisawa D, Kato T, Akatsu H, Hashizume Y, Kaneda D, Tooyama I.	4. 巻 5
2. 論文標題 Nasal extracts from patients with Alzheimer's disease induce aggregates in a cellular model of tau propagation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Alzheimers Dis Rep.	6. 最初と最後の頁 263-274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/ADR-210298.	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 Zulzikry Hafiz Abu Bakar, Tomoko Kato, Daijiro Yanagisawa, Jean-Pierre Bellier, Ken-ichi Mukaisho, Ikuo Tooyama	4. 巻 3
2. 論文標題 Immunohistochemical Study of Mitochondrial Ferritin in the Midbrain of Patients with Progressive Supranuclear Palsy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Histochem Cytochem.	6. 最初と最後の頁 97-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.21-00019	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 Daijiro Yanagisawa, Tomoko Kato, Hiroyasu Taguchi, Nobuaki Shirai, Koichi Hirao, Takayuki Sogabe, Takami Tomiyama, Keizo Gamo, Yukie Hirahara, Masaaki Kitada, Ikuo Tooyama	4. 巻 270
2. 論文標題 Keto form of curcumin derivatives strongly binds to A oligomers but not fibrils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2021.120686	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤智子、柳沢大治郎、田口弘康、北田容章、平原幸恵、蒲生恵三、富山貴美、白井伸明、平尾浩一、曾我部孝行、遠山育夫
2. 発表標題 アルツハイマー病におけるAオリゴマーに結合するケト型クルクミン化合物の可能性
3. 学会等名 第40回日本認知症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤 智子、柳沢大治郎、田口 弘康、遠山 育夫
2. 発表標題 ヒト組織切片を用いたアルツハイマー病の 神経原線維変化に結合する新規化合物の探索
3. 学会等名 第38回日本認知症学会
4. 発表年 2019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 滋賀医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、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

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