

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20696

研究課題名（和文）大脳皮質基底核変性症の病態機序解明とそれに基づく創薬探索系の構築

研究課題名（英文）Pathophysiological analysis of corticobasal degeneration and development of drug screening platform for tauopathy

研究代表者

谷口 大祐（Taniguchi, Daisuke）

順天堂大学・医学部・助手

研究者番号：70908946

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：人工的に増幅した大脳皮質基底核変性症（CBD）型タウをマウスに移植することで、新規CBDマウスモデルを作製することに成功した。このCBDマウスモデルはCBD患者脳の病理学的、生化学的特徴を保持しており、患者脳シードを移植する従来の方法と比較して、患者脳サンプルの消費を大幅に減らすことができる点で優れていた。

また、CBD患者脳シードを移植したマウスを用いて、タウ病理が出現した領域で空間トランスクリプトーム解析を行った。いくつかの発現変動遺伝子を同定し、細胞実験系にてタウ凝集に与える影響を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質基底核変性症（CBD）はパーキンソン病症状と高次脳機能障害を主症状とするタウオパチーの一種である。平均罹病期間は約6年と予後不良で根本的治療がなく、アルツハイマー病など他のタウオパチーと比べて病態解明が進んでいない。本研究で新たなCBDモデルマウスの作製に成功した。さらにこれらのマウスモデルを用いてタウ凝集に影響を与える可能性がある遺伝子をいくつか同定し、細胞実験系でタウ凝集に与える影響を解析した。これらの成果はCBDの治療薬を探索するための、ドラッグスクリーニングの基盤になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel mouse model for corticobasal degeneration (CBD) using tau seeds amplified in cultured cells. Mice injected with CBD-type cellular seeds maintained CBD-type neuropathology and biochemical property. This mouse model is considered to be superior to the previous models in terms of low consumption of human brain samples. We also performed spatial transcriptome to the CBD-type and Alzheimer's disease (AD)-type mouse models. We detected differentially expressed genes (DEGs) in CBD-type or AD-type tau inclusion-positive regions. We are now analyzing the effects of these DEGs on disease-specific tau aggregation using a cell-based assay.

研究分野：Neuropathology

キーワード：大脳皮質基底核変性症 タウ蛋白 タウオパチー マウスモデル 空間トランスクリプトーム解析 伝播

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質基底核変性症 (CBD) はパーキンソン病症状と高次脳機能障害を主症状とする神経変性疾患であり、アルツハイマー病 (AD) や進行性核上性麻痺 (PSP) と同様に、脳内に異常リン酸化タウが蓄積するタウオパチーの一種である。本邦の患者数は約 3500 人であるが、いまだ根治的治療はなく平均罹病期間は約 6 年と予後不良である。タウオパチーの病態は主に症例数が多い AD で研究されているが、CBD の病態解明は進んでいないのが現状だった。従来の CBD に関する研究は、臨床型の分類や画像解析、バイオマーカーに関するものが多く、本邦から少数の生化学的な解析が報告されているのみだった。そのため、CBD の病態に迫る研究が必要だと考えた。

2. 研究の目的

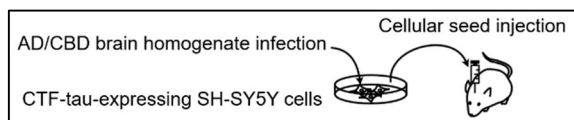
研究代表者は、CBD 型タウにはリソソーム酵素の一種であるレグマインに対する切断抵抗性があることを見出しており、この特性を利用した CBD 型タウの生化学的判定法を確立していた。この知見を元に、本研究ではレグマイン抵抗性を持つ CBD 型タウ凝集体を用いて、培養細胞・マウスモデルを用いた凝集・伝播実験を行い、CBD 病態の再現を試みた。さらに、CBD 病態の進行を抑制する化合物のスクリーニング系の構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新規 CBD マウスモデルの作製

CBD 患者脳と AD 患者脳タウを鋳型とし、SH-SY5Y 細胞を用いてタウ凝集体を増幅した。回収した細胞の不溶画分を細胞シードとした。この細胞シードにレグマイン抵抗性があること(すなわち CBD 型タウであること)を確認し、マウス線条体と直上皮質の 2 か所に注入し CBD 型タウの伝播が起こるかを確認した(図 1)。注入した 3、6、9 か月後に、マウス脳内に CBD で特徴的なアストロサイト斑が再現できるか、また生じた凝集体にレグマイン切断抵抗性があるかを、免疫組織染色と生化学的解析を用いて確認した。

図 1. CBD モデルマウス



(2) CBD 型タウ凝集体形成機序の解明
CBD 患者脳と AD 患者脳タウシードをマウス線条体に注入し、注入 6 か月後に空間トランスクリプトーム解析を行った。空間トランスクリプトーム解析には紫外線を当てた領域内で RNA 解析を行う Photo Isolation Chemistry: PIC 法で行った。解析は、CBD 注入側、AD 注入側、AD 非注入側の 3 群、n=4 で行い、発現変動遺伝子 (Differentially expressed genes: DEGs) を同定した。

(3) ドラッグスクリーニング系の樹立

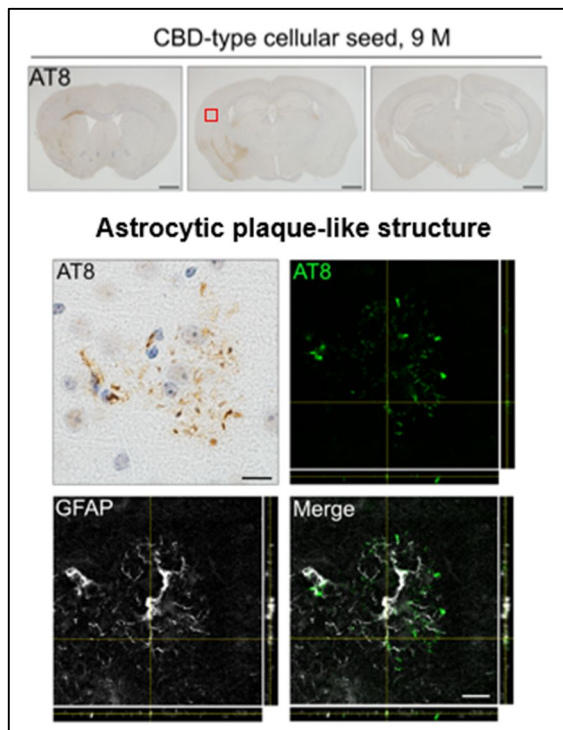
GFP タグのタウ断片を安定発現する SH-SY5Y 細胞株に、(2) で同定した DEGs を過剰発現し、CBD/AD シードを処置した際の凝集体形成の増減を評価した。

4. 研究成果

(1) CBD マウスモデルの作製

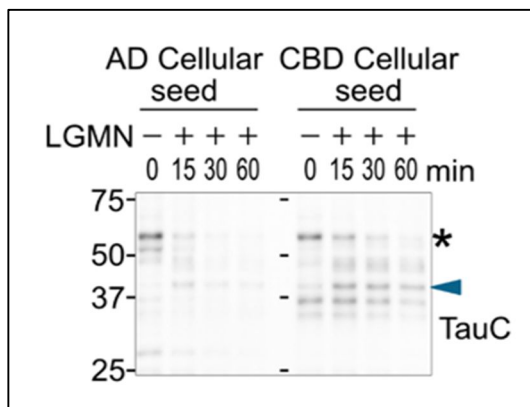
CBD/AD 患者脳タウを鋳型に細胞シードを作製した。各細胞シードをレグマインで処置すると、CBD 型細胞シードでレグマイン切断耐性を認め、CBD 型タウであることが確認された。細胞シードをマウス脳に注入したところ、CBD 型細胞シード注入マウスでは、注入 6 か月までは神経細胞とオリゴデンドロサイトのタウ凝集体のみ認めたが、注入 9 か月後に皮質にアストロサイト斑様のタウ凝集体を認めた(図 2)。AD 型細胞シード注入マウスでは注入 9 か月後においてもアストロサイトにタウ凝集体は出現しなかった。また、注入 9 か月後のマウス脳から抽出したタウ凝集体をレグマインで処置すると、CBD 型細胞シード注入マウス由来のタウ凝集体でレグマイン切断耐性を認めた(図 3)。このことから、細胞シードを用いて CBD マウスモデルは CBD の病態を再現していると考えた。ただし、神経細胞やオリゴデンドロサイト内のタウ凝集体の免疫組織学的特徴が CBD 患者脳のタウ凝集体と若干異なっており、細胞シードには CBD 型タウの形をとらない不完全なシードが含まれている可能性が考えられた。

図 2. CBD モデルマウスの組織染色像



CBD 型細胞シードを注入したマウスでは、注入 9 か月後の皮質にアストロサイト斑様のタウ凝集体を認めた。下段は赤四角で囲んだ部位の拡大。AT8 (リン酸化タウ抗体)、GFAP (glial fibrillary acidic protein) による蛍光免疫染色。

図 3. AD/CBD モデルマウスから抽出したタウ凝集体のレグマイン切断実験

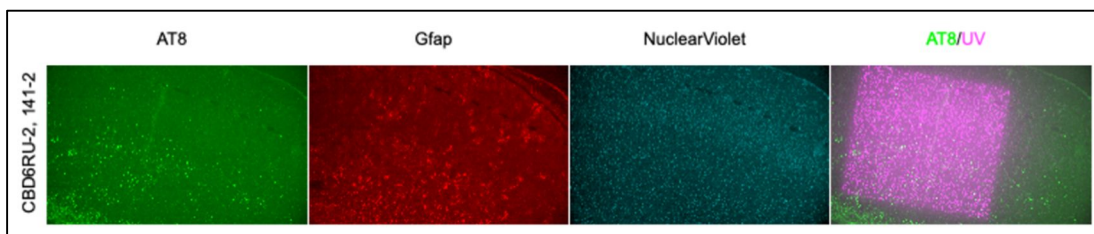


細胞シード注入 9 か月後のマウス脳から抽出した凝集体をレグマイン(LGMN)で処置した。経時的に全長タウ (*) のバンドが消失してタウ断片が出現するが、CBD 型細胞シード注入マウスではレグマイン切断耐性バンド (青矢頭)が出現する。TauC: タウ C 末端を認識する抗体。

(2) CBD 型タウ凝集体形成機序の解明

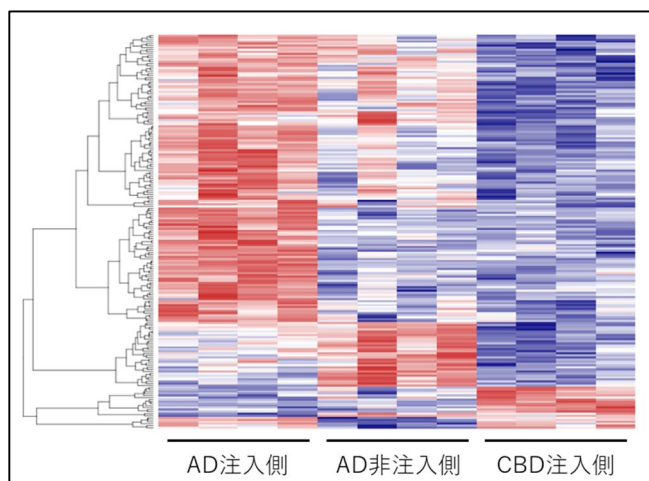
CBD/AD 患者脳と AD 患者脳タウシードをマウス線条体に注入し、注入 6 か月後に CBD 患者脳シード注入マウスの注入側皮質にアストロサイト斑様のタウ凝集体を確認した。AD 患者脳シード注入マウスでは注入側皮質に神経原線維変化とスレズを認め、非注入側にはタウ病理を認めなかった。CBD 注入側、AD 注入側、AD 非注入側の 3 群で図 4 のように皮質に ROI を設定し PIC 解析を行うと、図 5 のヒートマップの示したように CBD 注入側、AD 注入側に特異的な DEGs を同定した。得られた DEGs の中には既知の疾患リスク遺伝子が含まれており、解析の信頼性は高いと考えられた。

図 4. 空間トランスクリプトーム解析の解析部位 (CBD 患者脳シード注入側)



大脳皮質には緑の蛍光染色で陽性となるタウ凝集体を認める。この部位に ROI (紫色で示した長方形の領域) を設定し、空間トランスクリプトーム解析を行った。AT8 (リン酸化タウ抗体)、GFAP (glial fibrillary acidic protein)、Nuclear Violet (核染色)、UV (紫外線)。

図 5. 空間トランスクリプトーム解析のヒートマップ



CBD 注入側、AD 注入側に特異的な DEGs を同定した。

(3) ドラッグスクリーニング系の樹立

GFP タグのタウ断片を安定発現する SH-SY5Y 細胞株に、AD/CBD シードを処置すると、凝集体が形成される。この条件において、(2)で同定した DEGs を過剰発現させたところ、凝集体形成を促進、または抑制する遺伝子を認めた。これらについては、タウ凝集を抑制する疾患修飾治療法の候補遺伝子として現在解析中である。

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 谷口大祐 |
| 2. 発表標題 Legmain-resistant tau fibril fold produces CBD-specific C-terminal tau fragment |
| 3. 学会等名 第64回日本神経学会学術大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 谷口大祐 |
| 2. 発表標題 タウ凝集体の立体構造に注目した大脳皮質基底核変性症の病態解明 |
| 3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------|---------|
|---------|---------|