

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591735

研究課題名(和文) タウオパチーにおけるエンドサイト シス障害とビトロネクチン蓄積機構の解明

研究課題名(英文) An exploration for the reason about accumulation of Vitronectin in the mouse model of Tauopathy

研究代表者

丸山 将浩 (maruyama, masahiro)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：80396481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：PS19タウオパチーモデルマウスでは、海馬貫通線維領域において過剰リン酸化したタウ病変を形成する。タウ病変の進行に伴い、海馬萎縮することが知られている。当研究において、同領域に病初期よりビトロネクチン(Vn)が蓄積していることを確認した。当マウスは海馬萎縮が強まるほどVn蓄積量が低下すること、Vnを欠損させたタウマウスでは萎縮が加速することを明らかにした。従って当マウスにおいてVnは、神経保護作用を担っているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The accumulation of vitronectin(Vn) in the perforant pathway of hippocampal area was found in PS19 tau mice. The hippocampus of PS19 mice has been known as the primary region of pathology with hyperphosphorylated tau accumulation. Interestingly, less Vn showed more hippocampal atrophy in the PS19 mice. Crossbreeding of the PS19 mice with Vn null mice confirmed the enhanced hippocampal atrophy. These findings suggest that Vn may have a protective function against the neuronal loss in PS19 mice.

研究分野：精神神経科学

科研費の分科・細目：老年精神医学

キーワード：ビトロネクチン タウモデルマウス 脳萎縮 ビトロネクチン受容体

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病を含むタウオパチーは、線維性タウ封入体形成と神経細胞死に伴う脳萎縮を引き起こすことが知られている。申請者はタウ封入体イメージングの基礎的研究開発から行い、ヒト臨床応用に繋げた(Maruyama M, et al. Neuron. 2013.). タウモデルマウスの海馬領域における経時的な病変形成過程の確認作業を通じて、線維性封入体形成に向かわずに死に至る細胞が存在する事と、ある特定領域の神経線維層には病早期よりピトロネクチン(Vn)が蓄積している事、マウス海馬萎縮の程度に個体差が生じることを確認した。Vn蓄積がタウオパチー病態に影響するのかを明らかにすることを通じて、蓄積する意義を解明したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究で使用するタウモデルマウス(PS19 line)は、海馬領域における神経細胞構成タンパクであるタウのリン酸化が引き金となり神経細胞死する結果、同領域の脳萎縮に至ること、また当該領域においては神経細胞死を免れたとしても線維性封入体形成するのに15月齢程まで要することが既に明らかにされている(Yoshiyama Y, et al. Neuron. 2007., Maruyama M, et al. Neuron. 2013.). Vnは組織修復過程で機能を発揮する細胞外マトリクスタンパクであることが知られている。当マウスにおけるタウ病変並びにVn蓄積時期や蓄積脳領域との関係を免疫組織学的に時系列評価することや、Vn産生部位の同定やVn受容体はITGB5なのか等を遺伝子レベルで確認すること、作成したVn欠損掛け合わせタウマウスとの脳萎縮程度をin-vivo MRIイメージングで比較することによって、タウオパチー病変部位にVnが蓄積することの病

態への影響を解明することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 免疫組織学的手法による、Vn蓄積の開始時期並びに、蓄積脳領域の評価

4、9、14月齢のタウマウス並びに野生型マウスの脳組織切片を作成する。リン酸化タウ抗体とVn抗体による二重染色を行い、共焦点顕微鏡下に観察して染色領域の関連性を評価する。また、Vn受容体抗体(integrin alpha V : ITGAV 抗体)を用いてVn蓄積領域との関連性を評価する。

(2) In-situ hybridization(ISH)法による、Vnと受容体遺伝子発現脳部位の検討

Vn蓄積が既に認められている月齢のタウモデルマウスと、野生型マウス脳組織を用いる。Vnとintegrin beta5(ITGB5)受容体各遺伝子発現の局在をISH法によって確認し、Vn蓄積との関連性を評価する。発現したmRNAを染色し明視野条件で観察し、同一切片にVn、PDGFRB、NeuN、Iba1抗体蛍光染色を施し、蛍光観察を組み合わせることによって遺伝子・タンパク間の局在対応性を確認する。遺伝子レベルでITGB5受容体評価を選択した理由は、ITGAVにヘテロカップリングする候補として見込んだことと、ITGB5タンパクを検出し得る適当な抗体が見出せなかったことによる。

(3) In-vivo イメージング技術と免疫組織学的手法による、作成したVn欠損掛け合わせタウマウスとの比較を通じたVn蓄積意義の検討

Vn欠損マウス(Zheng X, Ginsburg D, et al. 1995.)を導入し、交配によってVn欠損タウモデルマウスを作

成する。14 月齢におけるタウモデルマウスと掛け合わせマウスを麻酔下にて in-vivo MRI 撮影評価し、解剖して脳組織切片を作成する。脳画像解析ソフトを用いて Vn 蓄積脳領域の容積を計測し、群間比較する。また共焦点蛍光顕微鏡撮影によって得られた染色切片の Vn シグナル値と脳容積との関連性を評価する。

4. 研究成果

(1) 免疫組織学的手法による、Vn 蓄積の開始時期並びに、蓄積脳領域の評価

4 月齢のタウモデルマウス海馬領域には野生型マウス同様、血管周囲に Vn 染色が認められるも、タウのリン酸化や Vn 蓄積を認めなかった。9 月齢においてリン酸化タウ抗体陽性化に対応して、小顆粒状に染色される Vn 蓄積像が出現することを確認した。このリン酸化タウ抗体陽性細胞は線維化には至っていないこともタウ封入体を認識する FSB 染色によって確認した。また、リン酸化タウ陽性領域は嗅内野や投射経路である歯状回分子層と歯状回顆粒細胞、CA3～CA1、海馬台の細胞体および神経線維に渡るも、Vn 蓄積は嗅内野や歯状回神経線維層に局在していた。その反面、CA1 領域の線維層においては 14 月齢に至っても Vn の蓄積を認めなかった。そこで Vn 受容体である ITGAV 抗体染色評価したところ、Vn 蓄積線維層には陽性であるに対して、CA1 領域線維層には染色が弱いことが明らかとなった(図 1.) Vn が蓄積する分子層を拡大観察すると Vn と ITGAV の染色像が部分的に重複することを確認した。

これらのことから、Vn の蓄積はタウ封入体形成する以前の段階である

タウがリン酸化する最初期段階に起こり始めていることと、リン酸化タウに晒され、ITGAV 受容体が存在する脳領域に蓄積することを明らかにした。歯状回分子層におけるタウのリン酸化は 4～9 月齢の間にかかる訳だが、個々の病理像を観察する限り、リン酸化タウ陽性線維出現に対応して Vn 蓄積が起こるものと推察する。蓄積した Vn は神経線維の外側に沈着しているのか、線維内に取り込まれているのかについては明らかにできていない。

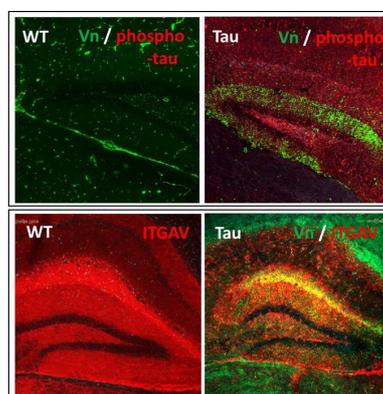


図1. 上段：野生型マウスでは血管領域にVn染色を認め、PS19タウマウスは、神経のタウリン酸化に伴い線維領域に小顆粒状の染色を認める。
下段：歯状回分子層にITGAV受容体染色を認める。PS19タウマウスは同領域にVnの蓄積を認める。

(2) ISH 法による、Vn とその受容体遺伝子発現部位の検討

十分な Vn 蓄積が見込まれる 12 月齢のタウマウスと同齢野生型マウス脳を用いて ISH 法による Vn、ITGB5 両遺伝子の発現局在評価を行った。発現した mRNA を染色した切片に Vn、PDGFRB、NeuN、Iba1 抗体染色を施し、遺伝子とタンパク発現局在の相同性有無を確認した。Vn mRNA の発現は主に PDGFRB をマーカーとする血管周皮と、軟膜細胞に認めた。顆粒状 Vn 蓄積を認めぬ CA1～2 領域の Vn mRNA 発現は両マウス共に同程度確認された。Vn 抗体、NeuN 抗体染色によるタンパ

ク発現との局在の比較を行ったが、Vn タンパクは蓄積部位に存在する神経細胞体で産生されたものでないことを確認した。また Vn タンパク蓄積は活性化アストログリアやミクログリア細胞体とも一致しなかった。これらのことから血中または周皮細胞から送達された Vn は神経線維領域に蓄積するものと思われた。引き続き同マウスの ITGB5 mRNA 発現の確認を行った。ITGB5 の mRNA は歯状回分子層だけでなく歯状回神経細胞層や CA1 にもタウ病変に晒された領域に発現を認めた。ITGB5 mRNA 発現はニューロンにではなくミクログリアに一致すること(図 2.) Vn 蓄積とは一致しないことをタウマウス、野生型共に確認した。歯状回分子層における Vn 蓄積には、神経線維に発現した ITGB5 以外の subunit 受容体タンパクが関わっているものと思われる。

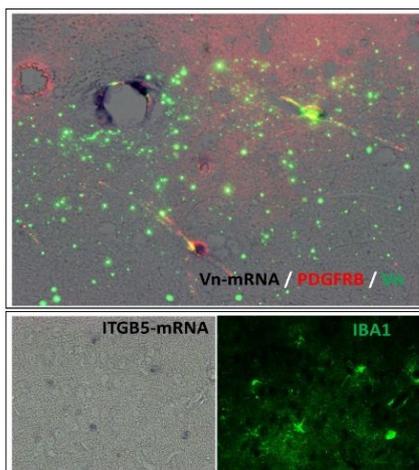


図2. 上段：PS19タウマウス歯状回分子層でのVn mRNAは血管周皮細胞に局在し、顆粒状Vn蓄積局所で産生されているのではない。
下段：ITGB5受容体のm-RNAは活性化ミクログリアに局在する。

(3) In-vivo イメージング技術と免疫組織学的手法による、作成した Vn 欠損掛け合わせタウマウスとの比較を通じた Vn 蓄積意義の検討

Vn 欠損掛け合わせタウマウスを作成し、タウマウスと共に 14 月齢にて

高磁場 MRI 撮影を行った。撮影後、脳摘出し染色用切片を作成した。得られた各マウスの冠状断 T2 強調画像データから歯状回分子層の容積測定を行い比較した。Vn 欠損掛け合わせタウマウス群は一様に強度な萎縮を認め、一方タウマウス群は萎縮程度にばらつきを認めた。組織切片に Vn 抗体染色を施し歯状回分子層の Vn シグナル値と分子層の容積を比較したところ、シグナル値が低い程、容積低下を認めた(図 3.)。またリン酸化タウ陽性の歯状回顆粒細胞の割合が多い程、Vn シグナルが低下した。リン酸化タウ陽性細胞体は早期エンドソームマーカーの発現が低下しており、同細胞が多数発現している領域においては樹状突起や軸索からなる神経線維マーカーも低下していた。これらの結果から推察するに、タウ病変に晒された組織に Vn が蓄積することは受容体を介した神経細胞保護作用を発揮するものと思われる。タウ病変局所への Vn 送達量や蓄積持続期間、受容体発現量等様々な因子が Vn 蓄積量に影響すると見込まれ、蓄積量の違いが脳萎縮の個体差をもたらすものと考えられた。

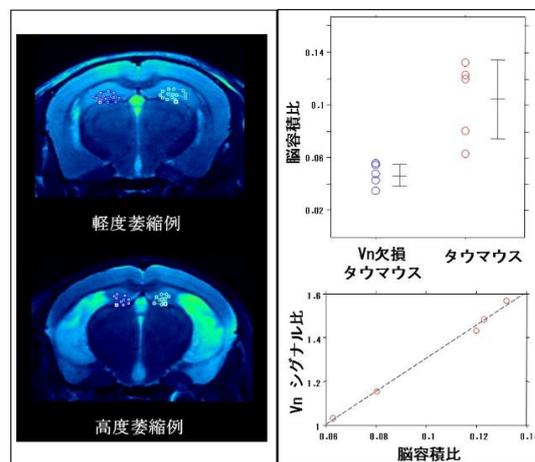


図3. 左図：14月齢PS19タウマウスのMRI T2強調画像。歯状回分子層の萎縮程度に個体差が生じる。
右図：Vn欠損タウマウスは一様に強度の歯状回分子層萎縮を認める。タウマウス歯状回分子層の萎縮が強いほどVnシグナルが弱くなる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

- 1) Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang MR, Trojanowski JQ, Lee VM, Ono M, Masamoto K, Takano H, Sahara N, Iwata N, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Chang Q, Saido TC, Takashima A, Lewis J, Jang MK, Aoki I, Ito H, Higuchi M. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron*. 79: 1094-108. 2013. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.037. (査読有)
- 2) Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Maruyama M, Higuchi M, Yoshikawa T, Arai H, Iwata R, Kudo Y, Yanai K. Comparison of the binding characteristics of [18F]THK-523 and other amyloid imaging tracers to Alzheimer's disease pathology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 40: 125-32. 2013. doi: 10.1007/s00259-012-2261-2. (査読有)

[学会発表](計2件)

- 1) 丸山 将浩, 接着分子ビトロネクチンによるタウ病態の制御, 2013 タウ研究ミーティング, 2013年08月09日, 愛知.
- 2) 丸山 将浩, 接着性タンパク vitronectin がタウ病理と神経変性に及ぼす影響, 2012 タウ研究ミーティング, 2012年06月10日, 京都.

6. 研究組織
(1)研究代表者

丸山 将浩 (MARUYAMA
MASAHIRO)

独立行政法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号: 80396481