

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659434

研究課題名(和文)マイクロダイアリシスを用いたアルツハイマー病病理のトランスミッション

研究課題名(英文)Transmission study of Alzheimer pathology using brain microdialysis

研究代表者

富山 貴美(Tomiya, Takami)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10305633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、脳内マイクロダイアリシスを用いて、神経細胞から分泌されたA $\beta$ やタウに病理を伝播させる能力があるかどうかを明らかにすることである。申請者らのタウトランスジェニック(Tg)マウスで予備実験を行ったところ、あまり良い結果は得られなかった。そこで、よりドナーに適したモデルマウスを得るために、申請者らのOsaka変異APP Tgマウスと野生型タウTgマウスを交配したところ、6カ月齢でA $\beta$ オリゴマーの蓄積、タウの異常リン酸化、シナプス消失、記憶障害を示し、18カ月齢で神経原線維変化とニューロン消失を示した。今後は、このより完全なモデルマウスを用いて病理の伝播実験を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to examine the possible roles of soluble A $\beta$  and tau released from neurons into the extracellular space in the transmission of Alzheimer pathology using the brain microdialysis technique. In a preliminary experiment, only very low levels of tau were detected by microdialysis in the hippocampus of our tau transgenic (Tg) mice. To generate a better donor of soluble A $\beta$  and tau, we crossbred our APP Osaka mutant Tg mice and wild-type tau Tg mice. The resultant double Tg mice showed A $\beta$  oligomer accumulation, tau hyperphosphorylation, synapse loss, and memory impairment at 6 months, and neurofibrillary tangle formation and neuronal loss at 18 months in the absence of tau mutations, all of which appeared earlier than in the parent Tg mice. This mouse model would be a useful tool for investigation of the intercellular propagation of amyloid and tau pathologies.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：マイクロダイアリシス アルツハイマー病 トランスジェニックマウス A $\beta$  タウ

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は老人斑と神経原線維変化を二大病理変化とする神経変性疾患である。細胞から分泌されたアミロイド (A $\beta$ ) が細胞外で凝集・沈着して老人斑を形成し、タウ蛋白質が細胞内で凝集して神経原線維変化となる。最近、タウ病理が脳内の神経ネットワークに沿って拡がること、培養細胞にタウ凝集体を添加すると細胞に取り込まれて新たなタウ凝集を引き起こすことなどから、タウ病理の脳内伝播の可能性が指摘されている。また、アミロイド病理やタウ病理を呈するトランスジェニックマウスの脳抽出物を別のマウスの脳に注入すると、注入部位とその近辺でアミロイド病理やタウ病理が誘導されることから、AD 病理はプリオン病と同様、ある条件下では個体間で伝播可能であることも示唆されている。

ここで問題となるのは、どのような分子形態をとる蛋白質が病理伝播の担い手となっているかである。モデルマウスを用いたこれまでの研究結果は主に不溶性の線維状凝集体がその担い手であることを示唆しているが、神経原線維変化について言えば、神経細胞が死なない限り細胞から外に出ることはない。一方、脳内マイクロダイアリシスを用いた最近の研究では、A $\beta$  ばかりでなく、タウも神経細胞から生理的に分泌されていることが確認された (Yamada et al. J. Neurosci. 2011)。AD でのシナプス機能障害や記憶障害、細胞障害は A $\beta$  やタウの可溶性のオリゴマーが原因であると考えられており (Tomiya et al. J. Neurosci. 2010; Berger et al. J. Neurosci. 2007)、少なくとも初期の病理に関しては、不溶性の線維状凝集体よりもむしろ、脳内を自由に拡散できる可溶性のオリゴマーがその伝播を担っている可能性が考えられる。老人斑や神経原線維変化は、オリゴマーが作用した後、その凝集体が seed となって形成されるのかもしれ

ない。最近の報告によれば、マウス脳抽出物中の可溶性の A $\beta$  にも老人斑形成を誘導する強い活性があったという。しかし、この論文で使われた A $\beta$  は native な状態のものではない点に疑問が残る。また、どのサイズのオリゴマーが病理の形成に重要なのかという問題は、依然として未解決のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、脳内マイクロダイアリシスを用いて、神経細胞から分泌された native な可溶性の A $\beta$  やタウに病理を伝播させる能力があるかどうかを明らかにする。また、ポアサイズの異なる透析膜を用いることで、どのサイズのオリゴマーが病理の伝播に重要かも調べる。

## 3. 研究の方法

マイクロダイアリシスは、通常、組織内の物質を濃度勾配により還流透析液中に回収しその量を定量する、あるいは、還流透析液中に含まれる薬剤を濃度勾配により組織へ送り届けるのに使われる。AD の研究では、脳内マイクロダイアリシスを用いて、A $\beta$  やタウが生理的に、あるいは神経細胞の活動に応じて細胞から分泌されることが示されている。

一方、アミロイド病理やタウ病理の伝播実験では、モデルマウスの脳抽出物をそのまま、あるいは遠心操作で可溶性のものと不溶性のものに分けて、別のマウスの脳にシリンジを使って注入する。A $\beta$  オリゴマーの毒性を見る実験では、脳から抽出した A $\beta$  や細胞から分泌された A $\beta$ 、あるいは合成 A $\beta$  をサイズ排除クロマトグラフィーで分画し、それをラットの脳にシリンジを使って注入する。これらの実験では、脳ホモジナイズやカラムでの分画操作により、A $\beta$  は細胞から分泌されたときの生理的な濃度、native な状態ではなくなっている。

本研究では、2匹のマウスの脳にマイクロダイアリシスをセットし、それをチューブで連絡して、一方のマウスの神経細胞から分泌された可溶性の A $\beta$  やタウを別のマウスの脳へ直接還流させる(図1)。この方法を採用することにより、細胞から分泌された native な状態でこれら蛋白質の活性を見ることができ、しかも、用いる透析膜のポアサイズを変えれば、どのサイズのオリゴマーが病理の伝播に重要かも調べることができる。マイクロダイアリシスの物質回収・薬剤デリバリーという2つの働きを、それぞれ別のマウスの脳で同時に利用するという点が斬新である。

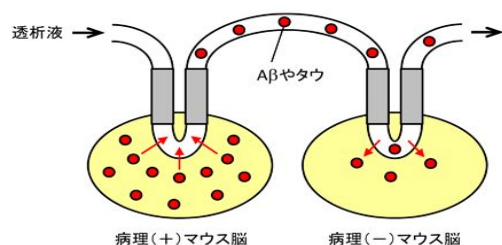


図1. マイクロダイアリシスを用いたAD病理の伝播実験系

A およびタウのドナーとしては、申請者らが作製した、E693 (Osaka)変異 APP-Tg マウス(Tomiyama et al. J. Neurosci. 2010) およびイントロン変異タウ Tg マウス (Umeda et al. Am. J. Pathol. 2013) を用いる。

まず、これらのマウスの脳にマイクロダイアリシスをセットし、実際に A $\beta$  やタウが細胞外に分泌されていることを、脳還流液を回収して ELISA で測定する。次に、2匹のマウスの脳にマイクロダイアリシスをセットし、それをチューブで連絡して、一方のマウスの脳還流液を別のマウスの脳へ還流する実験を行う。3日間ほど還流を行い、数日後に脳を取り出して、免疫組織化学により病理伝播の有無を確認する。

#### 4. 研究成果

平成24度はドナー側マウスの月齢の選定を行う予定であったが、タウのドナーとなるイントロン変異タウ Tg マウスの解析に時間がかかり、マイクロダイアリシスの実験そのものはあまり進まなかった。

我々が作製したイントロン変異タウ Tg マウスは、幼若期には3リピート、4リピート両方のタウを発現するが、4カ月齢ですでに4リピートタウ優位となり、6カ月齢からタウの異常リン酸化とともにシナプス機能障害や認知機能障害、シナプス消失がみられ、12カ月齢でミクログリアの活性化、24カ月齢でアストロサイトの活性化や Gallias 染色陽性となるタウ封入体の形成、ニューロン消失が起こることがわかった。以上の成果を論文発表した (Umeda et al. Am. J. Pathol. 2013)。

この結果によれば、病理伝播の実験には24カ月齢のマウスを使えば確実であろうが、マウスの飼育には多大な費用と労力が要求されるので、次善の策としてミクログリアの活性化がみられる12カ月齢以降のマウスをタウのドナーとして用いることにした。

平成25度は、12カ月齢のイントロン変異タウ Tg マウスの脳にマイクロダイアリシスをセットし、実際にタウが細胞外に分泌されているかどうかを ELISA で測定した。その結果、回収された脳還流液中にタウが検出されたが、その値は徐々に低下し、神経活動に伴ってタウが定常的に分泌されていることを示すデータは得られなかった。また、その値の下降の様子から、最初に測定されたタウは手術による脳傷害の結果放出されたものであろうと考えられた。

タウ分泌量の低さはおそらく、我々が用いたマウスのタウ発現量の低さや病理の進行の遅さに由来すると考えられる。そこで、よりドナーに適したモデルマウスを得るために、早期から A $\beta$  とタウの両方の病理を呈するモデルの作製に注力することにした。

申請者らの Osaka 変異 APP-Tg マウスとイントロン変異タウ Tg マウスを交配し、経時的に病理を観察したところ、生まれたマウスは4カ月齢で A オリゴマーの蓄積とタウの異常リン酸化、シナプス消失を示した。これらの病理は親の APP-Tg マウスでは8カ月齢から見られるもので、APP とタウの共発現により病理が早まることが示された。

次に、Osaka 変異 APP-Tg マウスと野生型タウ Tg マウスとを交配し同様の実験を行った。生まれたマウスは6カ月齢で A オリゴマーの蓄積とタウの異常リン酸化、シナプス消失、記憶障害を示し、18カ月齢で神経原線維変化とニューロン消失を示した(図2)。

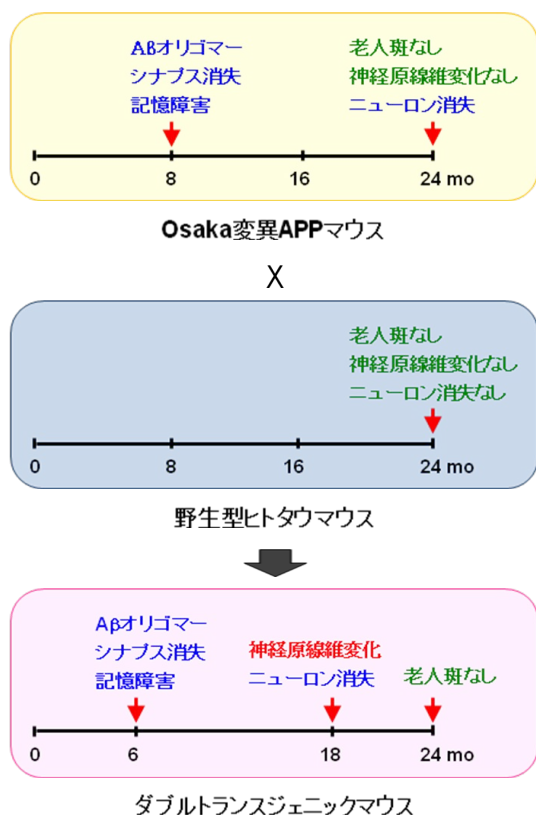


図2 . タウの変異なしに A 蓄積、神経原線維変化、ニューロン消失を示すより完全な AD モデルマウスの作製

この結果は、タウの変異がなくても、A オリゴマーとヒトタウがあればアルツハイマー病の3大病理変化、すなわち A の蓄積(通常は老人斑の形成)、神経原線維変化、

ニューロン消失を再現できることを示している。以上の成果を論文発表した(Umeda et al. Acta Neuropathol. 2014)。

今後は、このより完全なモデルマウスを用いて病理の伝播実験を行っていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- 1) Umeda T, Maekawa S, Kimura T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H. Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice. Acta Neuropathol, 127, 685-698, 2014.
- 2) Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17 related tau intron 10 +16C T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. Am J Pathol, 183, 211-225, 2013.

[学会発表](計1件)

- 1) Tomiyama T, Umeda T, Yamashita T, Ohnishi K, Takuma H, Mori H. FTDP-17 related tau intron 10 +16C T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD2013), Florence, Italy, 2013.3. 6-10.

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

富山 貴美 (TOMIYAMA Takami)  
大阪市立大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：10305633

(2)研究分担者

梅田 知宙 (UMEDA Tomohiro)

大阪市立大学・医学研究科・助教  
研究者番号：70549790