

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893337

研究課題名(和文) 認知症治療薬の開発を見据えたTauのクリアランス機序の解明

研究課題名(英文) Vascular mediated tau clearance: the role of CAA in tau metabolism.

研究代表者

齊藤 聡 (Saito, Satoshi)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：40732996

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで主たるAmyloid (A β)の除去機構としてPerivascular lymphatic drainage pathway(PVD)が知られていた。本研究ではPVDの障害を伴うCAAモデルマウス(Tg-SwDI)と変異Tau過剰発現マウス(PS19)を掛け合わせ、ダブルトランスジェニックマウス(double-Tg)を作成したところ、double-TgマウスはPS19マウスに比して、Tauの蓄積が増加した。さらに、double-TgマウスではTg-SwDIマウスに比して、A β の蓄積も増加していた。TauもA β 同様、PVDを介して除去されている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： β -amyloid (A β) is partially cleared through perivascular drainage pathway (PVD). The disturbance of PVD is a common finding in sporadic Alzheimer's disease (AD) and cerebral amyloid angiopathy (CAA) patients. We hypothesized that tau is eliminated through PVD, and investigated the role of CAA in the tau metabolism.

We developed double transgenic mice by crossbreeding PS19 mice carrying the MAPT gene with P301S mutation with CAA model mice expressing the APP gene with Swedish-Dutch-Iowa mutations, in which A β clearance was severely impaired. Immunohistochemical staining showed that the amount of A β , total tau, 4 repeat tau, and hyperphosphorylated tau was significantly elevated in the double Tg mice compared with the other mouse groups.

Tau metabolism is closely associated with cerebrovascular integrity. Neurovascular approach is warranted for AD and CAA treatment.

研究分野：神経内科

キーワード：アルツハイマー型認知症 A β Tau 脳アミロイド血管症 クリアランス

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー型認知症は、主要な認知症の原因疾患である。病理学的には、アミロイドβが蓄積する老人斑や脳アミロイド血管症と、タウが蓄積する神経原線維変化によって特徴付けられる。アルツハイマー型認知症の大部分を占める孤発性アルツハイマー病では、アミロイドβの過剰産生に比べ、排泄障害がより重度であることが多く、アミロイドβ排泄促進薬の開発が求められている。

主たるアミロイドβの除去機構の一つとして、血管周囲ドレナージ経路が知られている。そして、この排泄システムの障害が脳アミロイド血管症の本態であると考えられている (Weller et al., *Acta Neuropathol* 2009)。

一方、タウは微小管結合蛋白質の一種で、微小管の重合促進と安定化に作用する。タウはリン酸化によって、微小管重合促進能が低下し、脳内に蓄積しやすくなる。そのため、タウを標的としたアルツハイマー型認知症の治療薬の開発は、これまでリチウムやバルプロ酸などのタウのリン酸化酵素の阻害薬や、メチレンブルーなどのタウの凝集阻害薬などが主流であった。

近年、細胞から細胞にタウが伝播する可能性について、多数の報告がなされた。細胞から細胞にタウが伝播する過程で、アミロイドβと同様、タウも細胞内から細胞外へと放出される。また、タウ過剰発現マウスでは、細胞内のタウ凝集体には影響を与えない抗タウ抗体の投与によって、タウ病理が改善したと報告され、俄かに細胞外のタウの動態が注目されるようになった。

アルツハイマー型認知症では脳脊髄液中のタウが上昇する。しかし、血管周囲ドレナージ経路が障害された脳アミロイド血管症では、アルツハイマー型認知症に比して脳脊髄液中のタウの上昇が軽微であると報告されている (Verbeek et al., *Ann Neurol* 2009)。これは脳アミロイド血管症のため、脳脊髄液へのタウの排泄が障害され、脳脊髄液中のタウの上昇が軽微であった、とも解釈できる。

細胞外タウの動態、特にそのクリアランスの機序については未だ不明な点が多い。そこで申請者らはタウのクリアランス、すなわちタウがどのような機序で脳外へ排泄されるのか、検討を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究では、「タウがアミロイドβと同様、血管周囲ドレナージ経路で排泄される」という作業仮説を設定した。そして、具体的には、以下の2点の検討を計画した。

- 1) 血管を介したタウの排泄機構の有無について、ヒト剖検脳で組織学的に解析する。
- 2) モデル動物を使用して、タウの排泄機構を明らかにするとともに、外科的処置によって血管周囲ドレナージ経路を抑制し、タウ病理への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト剖検脳の病理学的解析

孤発性アルツハイマー型認知症患者、アミロイド血管症患者の剖検脳を HE 染色、KB 染色、チオフラビン S 染色、鉄染色で解析した。

免疫染色では、抗アミロイドβ抗体、抗アミロイドβ₄₀抗体、抗アミロイドβ₄₂抗体、抗 Tau-1 抗体、抗リン酸化 Tau 抗体、抗 3-repeat Tau 抗体、抗 4-repeat Tau 抗体を用いた。

(2) モデル動物の病理組織学的解析

① 使用動物

本研究では、Swedish, Dutch, Iowa の 3 重変異を有するヒト APP 遺伝子を導入した脳アミロイド血管症モデルマウス (Davis et al., *J Biol Chem* 2004)、P301S 変異を有するヒト MAPT 遺伝子を導入したタウ過剰発現マウス (Yoshiyama et al., *Neuron* 2007) を使用した。更に、両者を交配し、Double transgenic マウスを作成し解析した。

これらのマウスを 8 ヶ月齢で安楽死させ、病理学的に解析した。

② 両側総頸動脈狭窄術

血管の拍動が、血管周囲ドレナージ経路の駆動力と考えられている。そのため、両側内頸動脈にマイクロコイルを留置し、血管の拍動を抑制させた。本モデル、即ち両側総頸動脈狭窄術は申請者らのグループで開発された手術法であり (Shibata et al., *Stroke* 2004)、最も信頼性の高い脳血管性認知症モデルと評価されている (Bink et al., *J Cereb Blood Flow Metab* 2013)。また、脳アミロイド血管症マウスにマイクロコイルを装着させることで、脳アミロイド血管症病理が悪化することも報告し、これまで多数の論文で引用されている (Okamoto et al., *Acta Neuropathol* 2012)。

本研究では、2 ヶ月齢においてマウスの両側総頸動脈に微小コイルを巻き付けると同時に、対照群に偽手術を行った。9 ヶ月齢でマウスを安楽死させ、病理学的に解析した。

③ 病理学的解析

脳アミロイド血管症モデルマウスは、海馬台において最も早期からアミロイドβが蓄積する。一方、タウ過剰発現マウスでは歯状回において、初期よりタウの蓄積が確認される。そこで、海馬体と歯状回を関心領域として設定した。

④ 脳血流量、脳血管反応性の測定

Laser speckle flowmetry によって、脳血流量を測定するとともに、それぞれにマウスに気管内挿管を行い、5% 二酸化炭素の吸入前後の脳血流変化量を測定し、血管反応性を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト剖検脳の病理学的解析

解析した大部分の症例において、血管壁のタウの蓄積は認められなかった。しかし、重度の脳アミロイド血管症の2症例において、図1のような血管壁のタウの沈着が観察された。

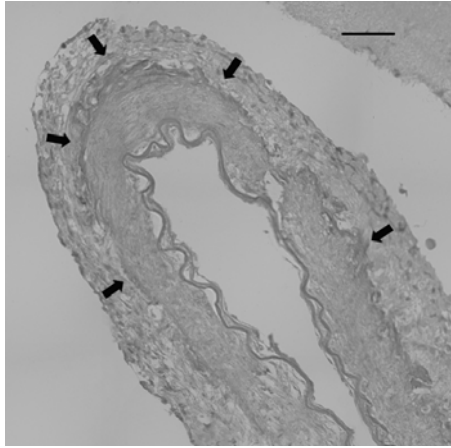


図1 脳アミロイド血管症剖検症例

髄膜動脈の中膜から外膜にかけて抗4-repeat tau抗体が陽性であった(矢印)。Bar=100um。

(2) モデル動物の解析

① 両側総頸動脈狭窄術

手術群と非手術群で生存率に差異はなかった。一方免疫染色では、図2の通り、偽手術群に比して手術群で、有意に海馬台のリン酸化タウ抗体の蓄積が亢進していた。

即ち、血管の拍動を抑制することによって、タウの蓄積が亢進することが確認された。

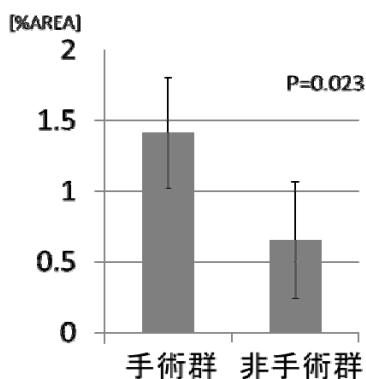


図2 海馬台におけるリン酸化タウ抗体陽性面積比。両側総頸動脈狭窄術によってタウの蓄積は亢進した。

② 脳アミロイド血管症モデルマウスとタウ過剰発現マウスとの交配

Double transgenic マウスはタウ過剰発現マウスに比して、総タウ、リン酸化タウ、4-repeat タウの沈着が、有意に亢進していた。

また、脳アミロイド血管症モデルマウスに比して、アミロイドβ、特にアミロイドβ₁₋₄₀の沈着が有意に亢進していた(図3)。

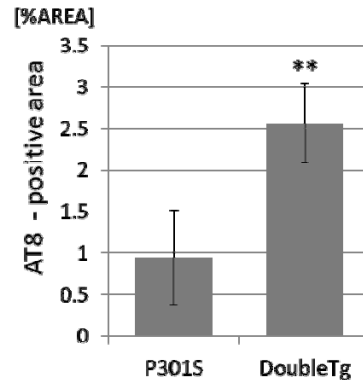


図3 海馬台におけるリン酸化タウ抗体(AT8)陽性面積比。P301S: Tau過剰発現マウス。Double Tg: CAAモデルマウスとP301Sマウスを交配したDouble Tg。**p<0.05。

Laser speckle flowmetryを用いた脳血流の解析では、脳アミロイド血管症モデルマウスやタウ過剰発現マウスでは、野生型マウスとの間に、有意な脳血流量の低下はなかった。しかし、Double transgenic マウスでは野生型マウスに比して、有意な脳血流量の低下を認めた。

さらに、5%二酸化炭素の吸入前後の脳血流変化量についても、脳アミロイド血管症モデルマウスやタウ過剰発現マウスでは、野生型マウスとの間に有意な差異はなかったが、Double transgenic マウスでは、野生型マウスに比して、有意な血管反応性の低下を認めた(図4)。

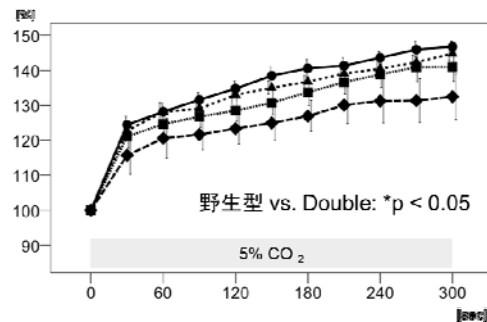


図4 炭酸ガス吸入試験 炭酸ガス吸入前の脳血流量を基準として、吸入後の脳血流量の変化の推移を表している。●:野生型マウス、■:脳アミロイド血管症モデルマウス、▲:タウ過剰発現マウス、◆:Double transgenicマウス。

以上の結果より、脳アミロイド血管症とタウ病理は相乗的に作用していることが示された。脳アミロイド血管症マウスでは、血管周囲ドレナージ経路が障害されているため、タウもまた、同経路の障害によって、病理変

化が悪化した可能性が考えられた。血管周囲ドレナージ経路の改善は、アミロイドβのみならず、タウ病理の改善にも有効である可能性が考えられた。

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 8 件)

- ① Tojima M, Saito S (correspondence), Yamamoto Y, Mizuno T, Ihara M, Fukuda H. Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy with a novel NOTCH3 Cys323Trp mutation presenting border zone infarcts: A case report and literature review. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 査読有. (in press). doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2016.05.013.
- ② Saito S, Ihara M. The interaction between cerebrovascular disease and Alzheimer pathology. *Curr Opin Psychiatry.* 査読有. 29: 168-173, 2016. doi: 10.1097/YCO.000000000000239.
- ③ Manousopoulou A, Saito S, Yamamoto Y, Al-Daghri NM, Ihara M, Carare RO, Garbis SD. Hemisphere asymmetry of response to treatment in an Alzheimer's disease mouse model. *J Alzheimers Dis.* 査読有. 51: 333-338, 2016. doi: 10.3233/JAD-151078.
- ④ 齊藤聡、山本由美、猪原匡史 ドラッグ・リポジショニングの新展開 日老医誌. 査読無. 52 :200-205, 2015. <http://ci.nii.ac.jp/naid/40020556143>
- ⑤ Saito S, Yamamoto Y, Ihara M. Mild cognitive impairment: at the crossroad of neurodegeneration and vascular dysfunction. *Curr Alzheimer Res.* 査読有. 12: 507-512, 2015. doi: 10.2174/1567205012666150530202508
- ⑥ Saito S, and Ihara M. New therapeutic approaches for Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy. *Front. Aging Neurosci.* 査読有. 6: 290, 2014. doi: 10.3389/fnagi.2014.00290.
- ⑦ Maki T, Okamoto Y, Carare R. O, Hase Y, Hattori Y, Hawkes C. A, Saito S, Yamamoto Y, Terasaki Y, Ishibashi-Ueda, H, Taguchi A, Takahashi R, Miyakawa T, Kalaria R. N, Lo E. H, Arai K and Ihara M. Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular β -amyloid. *Ann Clin Transl Neurol.* 査読有. 1: 519-533, 2014. doi: 10.1002/acn3.79.

- ⑧ Ihara M, Nishino M, Taguchi A, Yamamoto Y, Hattori Y, Saito S, Takahashi Y, Tsuji M, Kasahara Y, Takata Y, Okada M. Cilostazol add-on therapy in patients with mild dementia receiving donepezil: a retrospective study. *PLoS One.* 査読有. 9: e89516, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0089516.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Saito S, Yamamoto Y, Takahashi Y, Nakaoku Y, Maki T, Takahashi R, Ihara M. Downward spiral of CAA and tau pathology in Alzheimer's disease. 57th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology 2016-5-18. Kobe International Conference Center (Hyogo・Kobe).
- ② 齊藤聡、山本由美、高橋良輔、猪原匡史 脳アミロイド血管症はタウの蓄積によって増悪する 第 41 回日本脳卒中学会総会. 2016-4-16.ロイトン札幌 (北海道・札幌市).
- ③ Saito S, Ihara M, Okamoto Y, Hattori Y, Yamamoto Y, Kitamura A, Takahashi R. Vascular β amyloid and tau: bidirectional influence in APP and MAPT bigenic mice. Society for Neuroscience 2015 Annual Meeting. 2015-10-20. Chicago (USA).
- ④ 齊藤聡、岡本洋子、山本由美、高橋良輔、猪原匡史 脳アミロイド血管症はタウの沈着と神経細胞脱落を促進する 第 34 回日本認知症学会学術集会 2015-10-3. リンクステーションホール青森 (青森県・青森市).
- ⑤ 齊藤聡、岡本洋子、山本由美、服部頼都、北村彰浩、高橋良輔、猪原匡史 脳アミロイド血管症によるタウ病理の促進 VAS-COG Japan 2015 2015-9-19 東京ファッションタウン (東京都・江東区).
- ⑥ Saito S, Okamoto Y, Hattori Y, Yamamoto Y, Kitamura A, Takahashi R, Ihara M. Vascular β amyloid and tau: bidirectional influence in APP and MAPT bigenic mice. VAS-COG World 2015. 2015-9-17. TFT-building (Tokyo・Koto-Ku).
- ⑦ 齊藤聡、猪原匡史 MCI に対するシロスタゾール療法の多施設共同二重盲検試験: Protocol of COMCID study 第 56 回日本神経学会学術大会 2015-5-22. 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市).
- ⑧ 齊藤聡、猪原匡史 MCI に対するシロスタゾール療法の多施設共同二重盲検試験: Protocol of COMCID study 第 33 回日本認知症学会学術集会 2014-11-30. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等 なし.

6. 研究組織

(1)研究代表者

齊藤 聡 (SAITO, Satoshi)

国立循環器病研究センター・研究所・

流動研究員

研究者番号：40732996