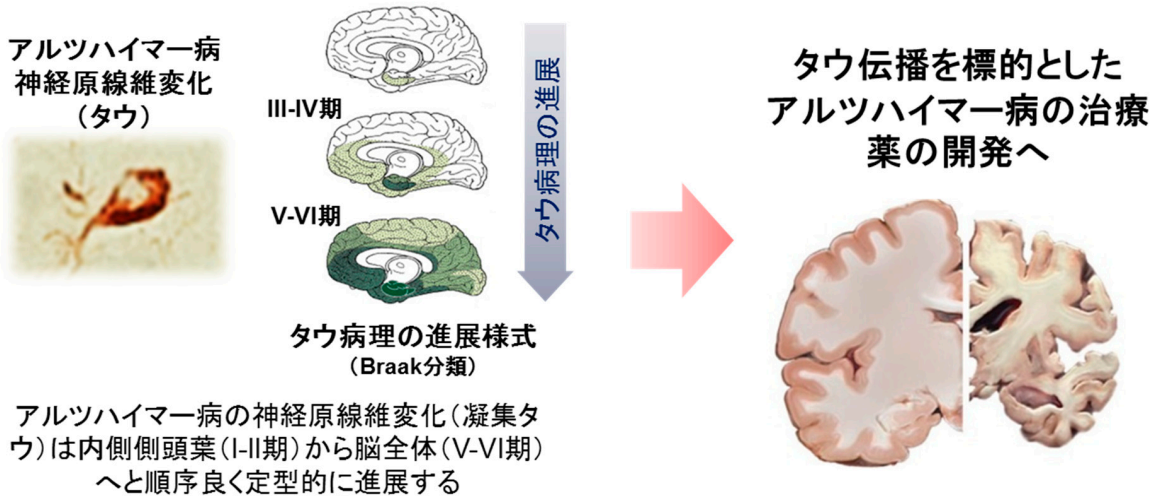
177　変性蛋白の細胞間伝播を標的とした認知症治療法の開発	武田　朱公

【目的】超高齢化社会における認知症患者の急増が深刻な社会問題となっている。認知症の原因で最も多いのがアルツハイマー病であるが、その根本的な病態の解明や治療法の開発には至っていない。アルツハイマー病では変性タウ蛋白の神経細胞内凝集体が脳内に出現し、時間の経過とともに一定の順序で脳内を徐々に広がっていく（下図）。脳内での進展過程は神経線維の連絡に沿った領域を順序良く進むことから、変性タウ蛋白が神経細胞間を伝播するというタウ伝播仮説が近年提唱されている。本研究ではアルツハイマー病の病態進行の基盤となっているタウ伝播の機序を明らかにし、アルツハイマー病新規治療法の開発のための基盤的研究を行うことを目的とした。

【方法】本研究は以下の 3 項目に分けて行った。1. 変性タウ蛋白の細胞間伝播能を評価するためのハイスループットスクリーニング系の構築。2. タウ関連髄液バイオマーカー探索のためのプレクリニカルモデルの開発。3. モデルマウスを用いた糖尿病がタウ伝播に与える影響の解析。

【結果】タウ伝播活性を *in vitro* で評価するためのアッセイ系の最適化を行い、コンパウンドライブラリーを用いてタウ伝播阻害因子の探索を開始した。また、覚醒・自由行動下でのマウス脳脊髄液持続回収系を確立した。この系は脳内タウ病理の進展をモニターするための髄液マーカーの開発に非常に有用であると考えられる。糖尿病とタウ病理に関するモデルマウスを用いた解析では、高脂肪食負荷による耐糖能異常はタウ Tg マウスの行動障害を促進することが示された。

アルツハイマー病におけるタウ脳内伝播と治療法の開発



177. 変性蛋白の細胞間伝播を標的とした認知症治療法の開発

武田　朱公

大阪大学 大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学寄附講座

Key words：認知症，アルツハイマー病，タウ，伝播，治療

緒　言

超高齢社会を迎え、認知症患者の急増は深刻な社会問題となっている。患者や家族への身体的・精神的負担の増加、さらには医療経済的にも社会的負担の増大が見込まれており、認知症に対する根本的治療法の確立は国家的緊急課題と言える。

認知症患者の脳内に出現する代表的な病理所見として、変性タウ蛋白の凝集体が知られている。認知症の原因として最も多いアルツハイマー病では「神経原線維変化」と呼ばれるタウ凝集体が出現し、認知機能障害に直接的に関与している。病的タウ蛋白の蓄積はアルツハイマー病のみならず、前頭側頭型認知症や大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺など、高齢者で頻度の高い他の認知症でもみられ、認知症の病態において非常に重要な役割を果たしている。

アルツハイマー病でみられる変性タウ蛋白凝集体は、初期には嗅内皮質の神経細胞に出現し、次に海馬領域、そして側頭・頭頂葉へと、神経線維の連絡に沿って定型的なパターンで進展することが知られている（Braak stage 分類[1]）。この定型的な病理進展過程の背景にあるメカニズムとして、病的な変性タウ蛋白が神経細胞間を移動（伝播）するという現象が知られるようになり注目を浴びている [2]。この変性蛋白の神経細胞間伝播は、新たな認知症治療法のターゲットとして期待され世界各国で精力的に研究が進められているが、その具体的なメカニズムは現時点でほとんど解明されていない。

タウ蛋白は生体内において、リン酸化や凝集など多くの翻訳後修飾を受け様々な形態で存在していることが知られている。申請者らはこれまでの研究で、アルツハイマー病患者脳組織やモデルマウス脳組織から、神経細胞間伝播を介在する特殊なタウ蛋白を単離・同定することに成功し、世界に先駆けて報告してきた [3]。また、この病的伝播タウが患者の脳脊髄液中にも存在することを証明し [4]、新たな病態バイオマーカーとしても期待される。

これらの研究成果を基盤として、病的変性蛋白（タウ）の細胞間伝播の詳細な分子メカニズムを解明し、さらにこの過程の修飾因子（伝播を促進/遅延させる因子）を探索・同定することで、認知症の進行を停止／遅延させる根本的治療法の開発に発展させることを本申請課題の目的とした。本研究ではそのための基盤的実験を行った。

方　法

1. 変性タウ蛋白の細胞間伝播能を評価するためのハイスループットスクリーニング系の構築

これまでに、タウの細胞内取込み活性および凝集活性を評価するための *in vitro* アッセイ系を用いて様々なタウ分子種の伝播活性を評価してきている（FRET を利用した細胞内タウ凝集アッセイ：Tau-biosensor 細胞）[1，2]。本研究ではこの系をより最適化し（最適タウシードの選定など）、タウ伝播を修飾する因子をコンパウンドライブラリーを用いて探索するための基盤整備を行った。

2. タウ関連髄液バイオマーカー探索のためのプレクリニカルモデルの開発

脳内タウ病理の変化（加齢に伴う自然経過および治療などの介入に伴う変化）を経時的にモニターするための髄液マーカー探索のためのプレクリニカルモデルの開発を行った。アルツハイマー病モデルマウス（タウ Tg マウス：PS19 モデル）の髄液中のタウを詳細に解析するためには、一個体のマウスから大量の髄液を回収する必要がある。本研究では、覚醒・自由行動下のマウスから持続的に脳脊髄液を回収するための新規モデルを構築した。

3. 糖尿病がタウ伝播に与える影響の解析

アルツハイマー病の後天的危険因子として糖尿病が知られているため、糖尿病病態がタウ脳内伝播に与える影響の解析を行った。アルツハイマー病モデルマウス（タウ Tg マウス：PS19 モデル）に高脂肪食負荷をかけて糖尿病病態を誘導し、通常食を与えたマウスと比較を行った。解析項目としては代謝系指標（体重、脂肪重量、血糖値、インスリン値、耐糖能など）の評価、、行動解析、脳組織の生化学的・組織学的解析、脳内変性タウの伝播活性の評価、を行った。

結　果

1. 変性タウ蛋白の細胞間伝播能を評価するためのハイスループットスクリーニング系の構築

Tau-biosensor 細胞を用いたタウ伝播活性の評価では、シード活性をもつタウを Tau-biosensor 細胞の培養液中に投与しそれによって誘導される細胞内タウ凝集体の数を測定する。このアッセイ系を用いてタウ伝播の阻害因子をコンパウンドライブラリーから効率よく探索するためには、シード活性の高いタウを使用する必要がある。タウ Tg マウス脳由来のタウのシード活性関して、脳を各領域に分けて採取しそれぞれの組織に含まれるタウのシード活性を評価した。嗅球、前能、海馬、小脳、延髄、脊髄からタウを抽出し、Tau-biosensor 細胞に投与して 2 日後に誘導された細胞内タウ凝集体の数を FACS を用いて解析した。図 1 に示すように、延髄および脊髄由来のタウは他の脳領域に含まれるタウよりも高いシード活性を持つことが明らかとなり、以後のスクリーニング実験においてはシードタウとして延髄・脊髄由来のタウを用いることとした。現在はこの実験条件に基づき、施設所有のコンパウンドライブラリーを用いてタウ伝播を阻害する活性を持つ因子の探索・同定を進めている（結果は未発表データに付き未掲載）。

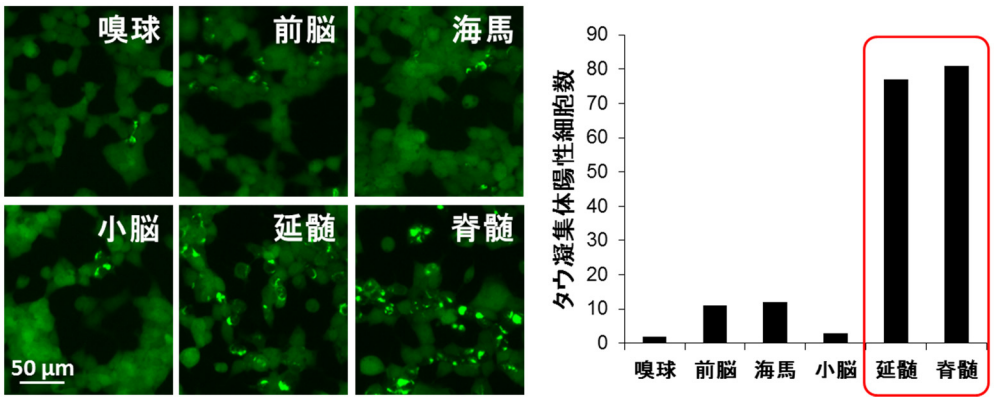


図 1. タウ Tg マウス脳由来のタウのシード活性

Tau-biosensor 細胞を用いたタウシード活性の評価。タウ Tg マウス脳由来のタウのシード活性を脳領域に分けて評価した。（左）Tau-biosensor 細胞内に誘導されたタウ凝集体の顕微鏡像（Treatment 後 2 日の時点）。（右）細胞内タウ凝集体の定量評価。

2. タウ関連髄液バイオマーカー探索のためのプレクリニカルモデルの開発

実験には3ヶ月齢の野生型雄マウスを使用し、後環椎後頭膜にあけた微小な穴上に細径チューブカニューレを留置・固定しローラーポンプを用いて低速持続吸引回収を行った。髄液持続回収は専用のケージングシステムを用い自由飲水・摂食下で行い、回収した髄液の一般組成を解析測定した。また血液成分の混入の有無を超微量分光光度計を用いた高感度法で評価した。髄液回収後、留置チューブカニューレによる脊髄への物理的損傷を組織学的に評価した。

回収チューブカニューレ留置によるマウスの明らかな行動変化は認めず、自由行動下で持続的に髄液回収が可能であった（図2）。回収された髄液は無色透明で、血液混入は0.1%未満であった。組織学的に評価では、脊髄への明らかな物理的損傷は認めなかった（未発表データのため未掲載）。

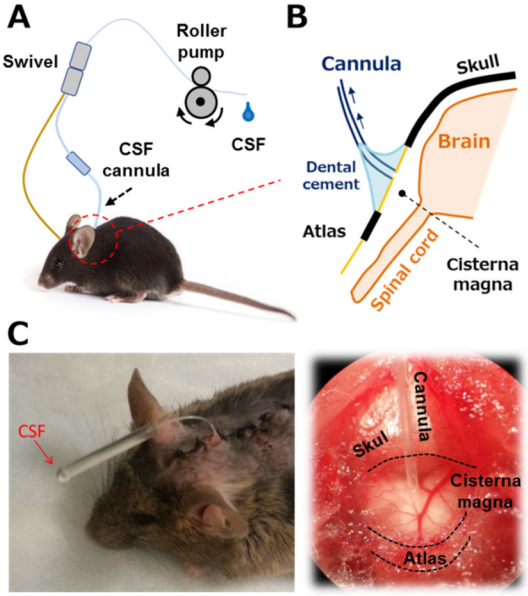


図2. 覚醒・自由行動下でのマウス脳脊髄液持続回収系の確立

（A、B）髄液回収用細径チューブをマウスのCisterna magnaにデンタルセメントで留置固定する。チューブ先端は髄液腔には侵入していないため、脳・脊髄組織への侵襲は最小限に抑えられる。（C）Cisterna magnaから導入されたチューブ先端から髄液（CSF）の導出が確認される。

3. 糖尿病がタウ伝播に与える影響の解析

タウTgマウスに高脂肪食負荷をかけることによって糖尿病病態を誘導した。高脂肪食負荷は、4ヶ月齢～9ヶ月齢までの短期負荷と、1.5ヶ月齢～9ヶ月齢までの長期負荷の2群に分けて行った（図3A）。短期負荷群においても有意な体重増加（$n = 5$ / group、$p < 0.05$、Tukey-Kramer test）、耐糖能異常などの糖尿病病態が誘導された（図3B）。高脂肪食負荷をかけた群では行動解析において早期から行動障害が観察された（$n = 5$ / group、$p < 0.05$、Tukey-Kramer test）（未発表データのため未掲載）。

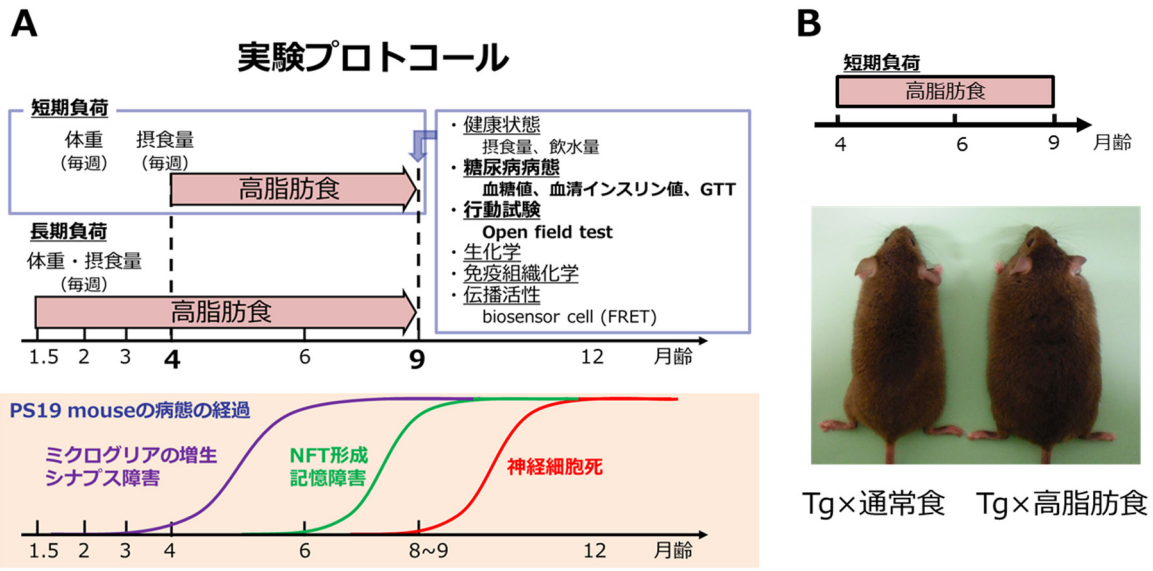


図 3. 糖尿病がタウ病理に与える影響

高脂肪食負荷によってタウ Tg マウスに糖尿病病態を誘導した（A）。通常食群と比較して高脂肪食群では優位な体重増加や耐糖能異常を示し（B）、行動異常が早期から出現していた（data not shown）。

考　察

タウ伝播の *in vivo* アッセイ系の最適化を行い、コンパウンドライブラリーを利用したタウ伝播阻害剤の探索を開始した。この条件検討の過程で、モデルマウス脳由来のタウのシード活性は脳領域によって大きく異なっていることが明らかとなり、このことはタウ伝播のメカニズム解明に示唆を与えるものであり、今後詳細な生化学的解析を進める予定である。

脳脊髄液バイオマーカー開発のためのプレクリニカルモデルとして、自由行動下でのマウス脳脊髄液持続回収系を確立した。この系はバイオマーカー開発のみならず、脳脊髄液の動態解析や治療実験など、非常に幅広い応用が可能と考えられる。

糖尿病はアルツハイマー病の危険因子であり、タウ伝播にも影響を与えている可能性がある。モデルマウスを用いた解析では、糖尿病はタウ Tg マウスの行動障害を促進させることが示された。今後これらのマウスの脳内病理を解析し、糖尿病がタウ伝播に与える影響とその分子レベルでのメカニズムを明らかにしていく。

共同研究者・謝辞

共同研究者の大阪大学大学院医学系研究科老年総合内科学の樂木宏実教授、および研究室の皆様に感謝申し上げます。

文　献

1）　Braak H, Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. Acta Neuropathol. 1991;82(4):239-59. PMID:1759558.

2) de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL, Hyman BT. Neuron. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. 2012 Feb 23;73(4):685-97. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.033.

3) Takeda S, Wegmann S, Cho H, DeVos SL, Commins C, Roe AD, Nicholls SB, Carlson GA, Pitstick R, Nobuhara CK, Costantino I, Frosch MP, Müller DJ, Irimia D, Hyman BT. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. Nat Commun. 2015 Oct 13;6:8490. doi: 10.1038/ncomms9490.

4) Takeda S, Commins C, DeVos SL, Nobuhara CK, Wegmann S, Roe AD, Costantino I, Fan Z, Nicholls SB, Sherman AE, Trisini Lipsanopoulos AT, Scherzer CR, Carlson GA, Pitstick R, Peskind ER, Raskind MA, Li G, Montine TJ, Frosch MP, Hyman BT. Seed-competent high-molecular-weight tau species accumulates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease mouse model and human patients. Ann Neurol. 2016 Sep;80(3):355-67. doi: 10.1002/ana.24716. Epub 2016 Aug 3.