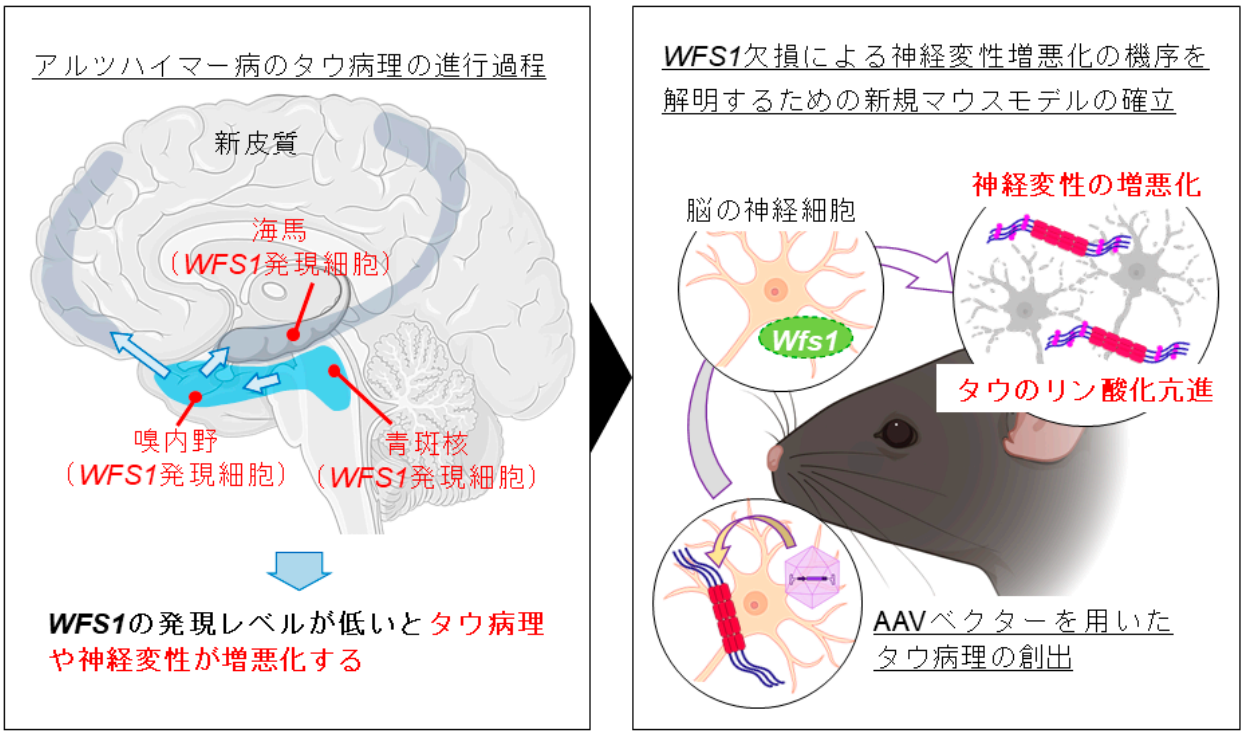
143　アルツハイマー病のタウ病理進行における*WFS1*の関与	榊原　泰史

【目的】糖尿病発症に関与する *WFS1* は、進行性の神経変性疾患であるウォルフラム症候群の原因遺伝子である。*WFS1* は神経細胞の生存や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆されており、私たちはショウジョウバエを用いてその可能性について検討し、*WFS1* の発現を抑制するとタウタンパク質による神経変性が増悪化することを明らかにした。アルツハイマー病において、タウ病理は最初期に青斑核、嗅内野に出現し、青斑核や嗅内野の神経細胞死に伴い海馬や大脳皮質へと拡大する。本研究では *WFS1* の発現レベルが低いと青斑核や嗅内野の神経細胞がタウ神経毒性に対して脆弱となり神経変性が増悪化するという仮説を立て、*WFS1* の発現レベルがアルツハイマー病のタウ病理進行と神経変性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】 *Wfs1* 欠損マウス脳で、青斑核の神経細胞に内在性タウ病理が出現している可能性を検討するため、リン酸化タウを認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。また、青斑核でタウ病理を創出するため、青斑核の神経細胞で特異的にヒトタウを発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを構築し、野生型マウスの青斑核に投与した後、タウ病理の出現について免疫組織化学染色にて調べた。

【結果】糖尿病がタウのリン酸化を亢進することから、加齢依存的に高血糖を呈する *Wfs1* 欠損マウスの脳では内在性にタウ病理が出現する可能性を想定し、*WFS1* 欠損による内在性タウ病理への影響について検討を行った。青斑核の神経細胞にリン酸化タウが蓄積しているかどうかを調べたが、15 ヶ月齢の個体では細胞体、神経軸索のいずれにおいてもリン酸化タウの蓄積は認められなかった。マウス脳内でタウ病理の進行過程を再現するため、青斑核の神経細胞で特異的にヒトタウを発現する AAV ベクターを構築し、野生型マウスの青斑核に投与した。投与 6 ヶ月後に、青斑核でヒトタウの発現、およびリン酸化タウの蓄積を検出した。これらの結果から、AAV ベクターを用いた遺伝子導入法によりタウ病理を創出できることが分かった。

タウ病理の進行に対する *WFS1* の関与を検証するための新規マウスモデルの確立



143. アルツハイマー病のタウ病理進行における *WFS1* の関与

榊原　泰史

国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター 神経遺伝学研究部

Key words：アルツハイマー病，タウ病理，神経変性，青斑核，マウスモデル

緒　言

WFS1 の遺伝子変異を病因とするウォルフラム症候群は、若年発症性の糖尿病と視神経萎縮を主徴とする進行性の神経変性疾患である。患者では髄鞘形成不全に続いて脳幹や小脳の著明な萎縮が認められ、病態の進行に伴い神経炎症、軸索変性と神経細胞脱落が生じるが［1]、*WFS1* の機能低下により神経変性が惹起される機序は明らかではない。

WFS1 は脳の神経細胞でも多く発現しており、神経細胞の生存や機能維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられたため、私たちはショウジョウバエを用いてその可能性について検討を行った。ショウジョウバエ複眼の神経細胞にタウタンパク質を過剰発現させると神経変性が惹起されるが、そのときに *WFS1* の発現レベルが増加することを見出した［2]。実際に、*WFS1* の発現レベルを抑制した状態ではタウタンパク質による神経変性の程度が増悪化したことから［2]、*WFS1* の発現レベルが減少するとタウ神経毒性に対して神経細胞が脆弱になることが示唆された。

アルツハイマー病の特徴的病理であり、過剰リン酸化タウを主成分とする神経原線維変化は、神経変性の程度と相関が高く［3]、最初期に青斑核、嗅内野に出現し、青斑核や嗅内野の神経細胞死に伴い海馬や大脳皮質へと拡大する。故に、タウ病理が初出する脳領域（青斑核や嗅内野）における神経細胞の脆弱性は、タウ病理の進行、および神経細胞脱落に影響を及ぼす可能性が考えられた。*WFS1* は青斑核ノルアドレナリン作動性神経細胞や嗅内野第Ⅱ層、海馬 CA1 野の錐体細胞に発現することから、本研究では *WFS1* の発現レベルが低いと青斑核や嗅内野の神経細胞がタウ神経毒性に対して脆弱となり神経変性が増悪化するという仮説を立て、*WFS1* の発現レベルがアルツハイマー病のタウ病理進行と神経変性に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

初めに、*WFS1* 欠損による内在性タウ病理への影響について検討を行ったが、15 ヶ月齢マウス脳では青斑核の神経細胞においてリン酸化タウの蓄積は認められなかった。そこで、マウス脳でタウ病理を創出するためには、人為的にタウの産生を加速させる必要があると考え、青斑核特異的にヒトタウを発現するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを構築し、その投与によりマウス脳内でタウ病理の創出に成功した。

方　法

1. 動物

Wfs1 欠損マウス［4]、およびヒトタウノックインマウス［5]（いずれも C57BL/6 マウスを遺伝的背景系統とする）について、外部機関より当研究センター内実験動物施設棟に導入した。施設棟内の飼育環境は常に一定（飼育温度 22±1℃、湿度 50～60%、点灯 7:00～消灯 19:00）に維持されており、自由に摂餌摂水できる環境であった。離乳後は、性別ごとに産仔を別ケージに分けて飼育を行った。本動物実験については、各種法令やセンター内の規定に則り、動物実験倫理委員会の承認を経て行った（承認番号：2-45)。

2. AAV ベクターの作製とマウス脳内への投与

青斑核にヒトタウ病理を創出するため、青斑核ノルアドレナリン作動性神経細胞にてヒトタウタンパク質（4 リピートタウ）を高発現するための AAV ベクターの作製を行った。ノルアドレナリン作動性神経細胞特異的に発現する PRS ×8 プロモーター下にヒトタウタンパク質をコードする配列を挿入したコンストラクトを構築し、このコンストラクト

を用いてウイルス粒子を調製した。

脳定位固定装置（成茂科学器械製作所製）を用いて野生型（C57BL/6J）マウスに対し、ヒトタウを高発現する AAV ベクターの投与を行った。吸入麻酔下（1.5%イソフルラン）にて装置にマウスを固定した後、頭部皮膚を切開し、AAV ベクター液を充填したハミルトンシリンジ（35 G 注射針付）を固定装置に装着した。右側青斑核に投与するため、ブレグマから見て、右側へ 0.9 mm、後方へ 5.4 mm の位置に注射針先端を移動させ、当該箇所の頭蓋骨を掘削し、針を貫入させるための穴を開けた。そこから、下方へ 3.7 mm の位置まで針先端を貫入させて、分速 0.1 μL にてヒトタウ発現 AAV ベクター液 1 μL を注入した（1.2×10^{13} vg/mL）。ベクター注入後のマウスについて、切開した頭部皮膚を縫合した後、体温を維持するため、麻酔から覚醒するまで保温シート上のケージに静置した。覚醒を確認後、元の飼育ケージにマウスを移動し、飼育室にて 6 ヶ月間、飼育を継続した後、脳組織を採取した。

3. 免疫組織化学染色

マウスに対し、三種混合麻酔（メデトミジン 0.3 mg/kg＋ミダゾラム 4 mg/kg＋ブトルファノール 5 mg/kg）を投与して麻酔を行った後、4%パラホルムアルデヒド溶液を心臓から灌流し固定を行った。その後、脳組織を摘出し、さらに 4%パラホルムアルデヒド溶液に一晩、浸漬して後固定を行った。固定後の脳組織はスクロース溶液に浸漬した後に凍結し、クリオスタット（Leica 社製）を用いて凍結切片（25 μm 厚）を作製した。

作製した切片を 48 穴プレートに回収し、以降の操作はプレート内で行った。PBS-T（0.1% TritonX-100 を添加したリン酸緩衝溶液）を用いて、穴内の切片を 3 回洗浄した後、ブロッキング溶液（5%正常ヤギ血清、0.5%ウシ清アルブミン、0.3% TritonX-100 を含むリン酸緩衝溶液）を添加し、室温で 1 時間以上、振とうした。その後、抗体希釈液（3%正常ヤギ血清、0.5%ウシ血清アルブミン、0.3% TritonX-100 を含むリン酸緩衝溶液）で一次抗体を希釈し、4℃で一晩、切片と反応させた。翌日、切片を PBS-T で 3 回洗浄した後、抗体希釈液で希釈した二次抗体を添加し、室温で 2～3 時間、反応させた。その後、切片を再び PBS-T で 3 回洗浄した後、DAPI（Molecular Probe 社、2 μg/ml）を用いて核染色を行い、切片をスライドガラスに貼付し、室温で 30 分～1 時間ほど乾燥させた。切片の乾燥後に、超純水でスライドガラスを軽く洗浄し、退色防止剤入封入剤を用いて封入した。

使用した一次抗体は、AT8 抗体（Thermo Fisher 社、1 : 500）、ドーパミン β 水酸化酵素（DBH）抗体（Immunostar 社、1 : 500）、ノルアドレナリントランスポーター（NET）抗体（Synaptic Systems 社、1 : 300）、ヒトタウ抗体（富士フィルム和光純薬社、1 : 300）であった（括弧内の数字は希釈倍率を示す）。また、二次抗体は Alexa Fluor 488 マウス IgG（Abcam 社、1 : 500）、Alexa Fluor 594 ウサギ IgG（Abcam 社、1 : 500）、Alexa Fluor 594 ラット IgG（Abcam 社、1 : 500）であった（括弧内の数字は希釈倍率を示す）。

作製したスライドガラス標本は、LSM780 共焦点レーザー顕微鏡（Carl Zeiss 社製）、および BZ-9000 蛍光顕微鏡（キーエンス社製）にて観察した。

結果および考察

1. 内在性タウ病理に対する *Wfs1* 欠損の影響についての検討

Wfs1 欠損マウスでは、ウォルフラム症候群の患者と同様に、膵 β 細胞が進行性に脱落し高血糖を呈する［4］。糖尿病が神経原線維変化の本態であるタウのリン酸化を亢進することから、*Wfs1* 欠損マウスにおいて、慢性的な高血糖により内在性のタウ病理が出現する可能性について検討することとした。

Wfs1 欠損マウスは 9 ヶ月齢で顕性糖尿病が認められ、高血糖による死亡事例が多発すると予想されたが、当研究センター実験動物施設棟では、15 ヶ月齢に到達するまで死亡事例なく飼育を継続することができた。この月齢の時点で約 6 ヶ月間、高血糖負荷状態にあったことから、青斑核や嗅内野でタウ病理が出現していると予想した。

そこで、過剰リン酸化タウが最も早期に検出される青斑核の神経細胞に着目し、15 ヶ月齢の *Wfs1* 欠損マウス脳内でタウ病理が出現しているかどうかについて検討を行った。しかし、青斑核の細胞体、および大脳皮質へ投射する神経軸索のいずれにおいても、AT8 抗体（タウの 202 番目のセリン残基と 205 番目のスレオニン残基のリン酸化を認識する）で標識されるリン酸化タウの蓄積は認められなかった（図 1）。これらの結果から、*Wfs1* 欠損により高血糖負荷が継続

しても、内在性タウ病理が出現するには至らないと推測された。

タウについて、マウスでは3種類のアイソフォーム（3リピートタウのみ）が存在するが、ヒトのタウ（4リピートタウと3リピートタウからなる6種類のアイソフォームが存在）と異なり凝集性が低いことから、ヒトタウの発現条件下（ヒトタウノックインマウス）において、*Wfs1* 欠損による内在性タウ病理への影響を検討する必要があると考えられる。昨年度に *Wfs1* 欠損・ヒトタウノックインマウスの系統を確立できたことから、このマウス系統を用いて、15ヶ月齢以降での内在性タウ病理について評価を進めている。

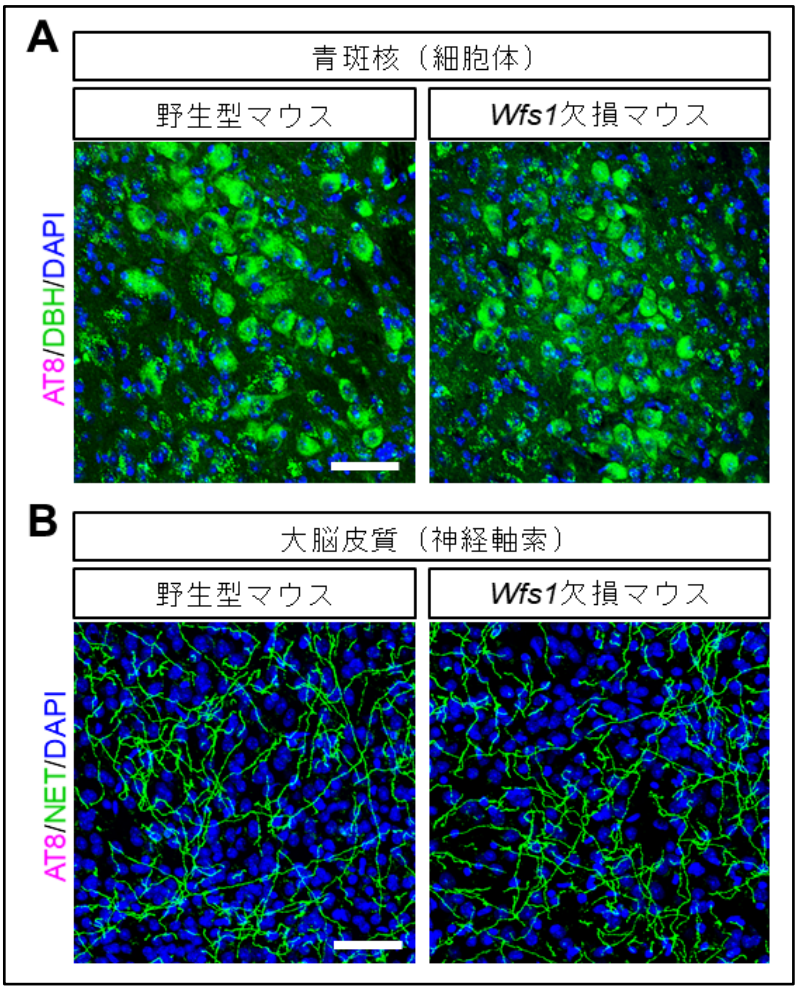


図1. 青斑核神経細胞の内在性タウ病理に対し *Wfs1* 欠損が及ぼす影響の検討

A) 15ヶ月齢の野生型マウスと *Wfs1* 欠損マウスの青斑核の染色画像。リン酸化タウを認識する抗体（AT8抗体、マゼンタで示す）、および青斑核の神経細胞を標識するドーパミンβ水酸化酵素（DBH）抗体（緑で示す）で染色した。青は、DAPIによる細胞核の染色を示す（スケールバー：50μm）。

B) 15ヶ月齢の野生型マウスと *Wfs1* 欠損マウスの大脳皮質の染色画像。リン酸化タウを認識する抗体（AT8抗体、マゼンタで示す）、および青斑核の神経軸索を標識するノルアドレナリントランスポーター（NET)抗体(緑で示す)で染色した。青は、DAPIによる細胞核の染色を示す（スケールバー：50μm）。

2. AAV ベクターを用いた青斑核タウ病理の創出

これまでの研究から、ヒト以外の動物種においてタウ病理を出現させるためには、寿命を延伸させる、あるいはタウの産生を加速させる必要があると考えられる。動物の寿命を大きく延伸させることは不可能であるため、遺伝子改変技術によりタウのリン酸化を亢進させ、マウス脳に病理を創出してきた［6］。これらのモデルマウスでは、アルツハイマー病ではなく、家族性前頭側頭型認知症に関連する変異型タウを過剰発現させることで、大脳皮質や海馬においてタウ病理が出現する。一方で、私たちは、アルツハイマー病におけるタウ病理の進行過程を忠実に再現するために、青斑核で特異的にタウの産生を加速し、タウ病理を創出する必要があると考え、ヒトタウ発現 AAV ベクターを構築した。

ここでは、野生型マウスの青斑核に対し、青斑核のノルアドレナリン作動性神経細胞特異的にヒトタウを発現する AAV ベクターを投与し、6 ヶ月後にヒトタウの発現や、タウのリン酸化の程度について調べた。AAV ベクターを投与していない左側青斑核と比較すると、ベクター投与を行った右側青斑核ではヒトタウが発現しており、AT8 抗体で標識されるリン酸化タウが検出された（図 2）。また、詳細な検証を行っているところであるが、青斑核から大脳皮質に投射する神経軸索においてもヒトタウ、およびリン酸化タウを検出できた。これらの結果から、AAV ベクターを用いることにより青斑核でタウの産生を加速させ、病理を創出できることが分かった。

本実験においては、青斑核の神経細胞におけるタウの凝集、また青斑核からの投射領域におけるタウ病理の拡大は認められなかったが、ヒトタウノックインマウスを用いることで、これらの病理学的変化を検出できると予想される。現在、確立した *Wfs1* 欠損・ヒトタウノックインマウスの青斑核に対して AAV ベクターを投与し、タウ病理の増悪化、および他の脳領域への病理拡大のメカニズムについて検討を進めている。

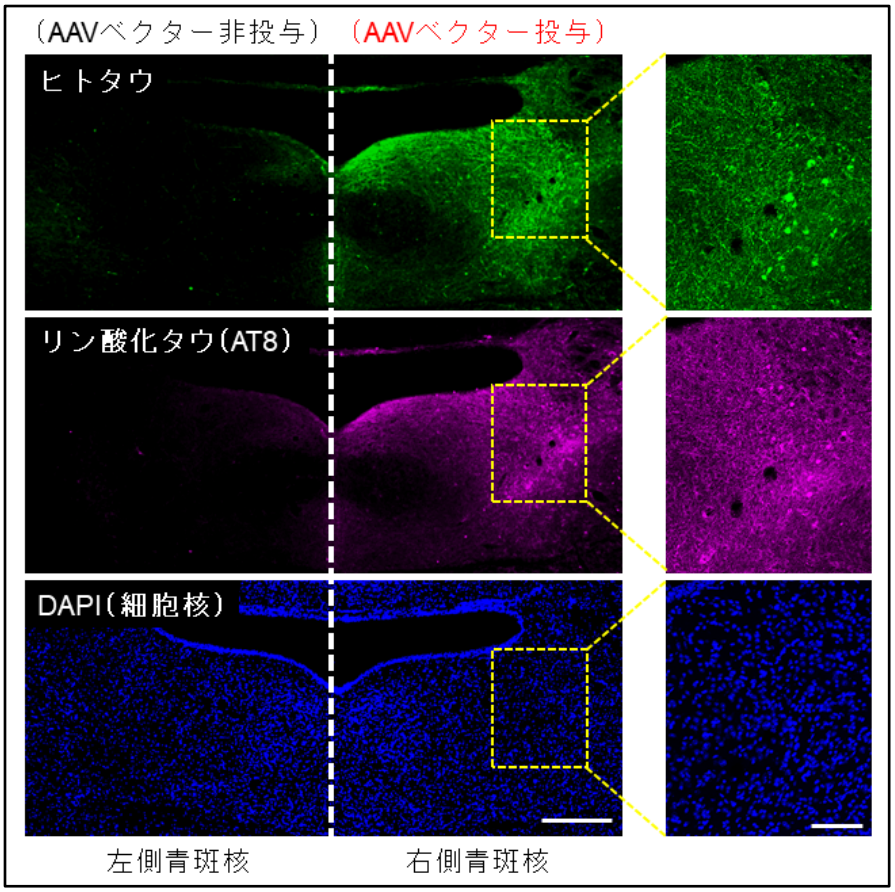


図 2. 青斑核への AAV ベクター投与によるタウ病理の創出
AAV ベクター投与マウスの青斑核を含む切片ついて、ヒトタウを特異的に認識する抗体（緑で示す）、リン酸化タウ抗体（AT8 抗体、マゼンタで示す）で染色した。青は、DAPI による細胞核の染色を示す（スケールバー：300 μm（左側の図）、100 μm（右側の図））。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、山口大学の谷澤幸生博士、田部勝也博士より *Wfs1* 欠損マウス、また理研脳神経科学研究センターの西道隆臣博士、名古屋市立大学の斉藤貴志博士よりヒトタウノックインマウスを分与いただきました。AAV ベクターの作製に関し、ノルアドレナリン作動性神経細胞特異的に発現する PRS×8 プロモーターを含むプラスミドについて、筑波大学の櫻井武博士、金沢大学の三枝理博博士より分与いただきました。また、生理学研究所の小林憲太博士にはウイルス粒子の調製を行っていただきました。この場をお借りしまして、ご協力を賜りました先生方に心より御礼を申し上げます。

また、国立長寿医療研究センター神経遺伝学研究の飯島浩一博士、関谷倫子博士には、研究立案から実際に研究を行う過程において多大なご支援を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Lugar HM, Koller JM, Rutlin J, Marshall BA, Kanekura K, Urano F, Bischoff AN, Shimony JS, Hershey T, Washington Univeristy Wolfram Syndrome Research Study Group. Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. Sci Rep. 2016 Feb 18; 6: 21167. DOI: 10.1038/srep21167.

2) Sakakibara Y, Sekiya M, Fujisaki N, Quan X, Iijima KM. Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. PLoS Genet. 2018 Jan 22; 14(1): e1007196. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007196.

3) Gómez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Ann Neurol. 1997 Jan; 41(1): 17-24. DOI: 10.1002/ana.410410106.

4) Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the *WFS1* gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. Hum Mol Genet. 2004 Jun 1; 13(11): 1159-1170. DOI: 10.1093/hmg/ddh125.

5) Saito T, Mihira N, Matsuba Y, Sasaguri H, Hashimoto S, Narasimhan S, Zhang B, Murayama S, Higuchi M, Lee VMY, Trojanowski JQ, Saido TC. Humanization of the entire murine *Mapt* gene provides a murine model of pathological human tau propagation. J Biol Chem. 2019 Aug 23; 294(34): 12754-12765. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009487.

6) Götz J, Bodea LG, Goedert M. Rodent models for Alzheimer disease. Nat Rev Neurosci. 2018 Oct; 19(10): 583-598. DOI: 10.1038/s41583-018-0054-8.