

<研究課題> アルツハイマー病の新たな発症メカニズムの解明と新規治療薬の創出

代表研究者 東京都医学総合研究所 認知症・高次脳機能研究分野
認知症プロジェクト 主席研究員 細川 雅人

【まとめ】

アルツハイマー病の新しい発症メカニズムとして、異常タンパク質が神経細胞間を伝播する「プリオン様伝播」という現象が報告されている。ヒトタウと同様の発現様式を持つマウスを作製し、そのマウスの脳内にアルツハイマー病患者脳から抽出した不溶性画分を接種した。接種後 8 ヶ月の脳を摘出し免疫組織化学的解析をおこなったところ、接種部位近傍および接種部位と神経連絡があると考えられる領域に異常タウが伝播していることが判明した。

1. 研究の目的

近年、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) を含む認知症などの神経変性疾患において、「線維化したタンパク異常凝集物が神経細胞間を伝播し、病理が広がっていく」という新しい考え方が注目を集めており、それを支持する報告が多数なされるようになってきた[1]。神経細胞やグリア細胞内に形成された凝集体が、プリオン病におけるプリオンタンパクのように細胞間を伝播する「プリオン様性質」は、凝集し線維を形成するタンパク質に普遍的に観察される可能性がある。そこで、ADの根本治療開発を目的とし、①ADの原因となる異常タンパクの脳内伝播に関するメカニズムの解明と、②神経変性疾患の原因タンパクの伝播あるいは凝集を阻害する新規ペプチドの創出を柱に研究を進めた。

2. 研究方法と経過

2-1 新規タウマウス (Tau 3R/4R) の作製

マウスは成体で微小管結合領域が 4 回繰り返しの 4-repeat (4R) タウのみを発現しているが、ヒトにおいては 3-repeat (3R) と 4R のタウを 1:1 で発現しているという違いがある。この違いを克服するため、ゲノム編集技術を用いてヒトタウと同様に内在性の 3R/4R タウを 1:1 で発現するマウス (Tau 3R/4R) の作製をおこなった。

2-2 AD 患者脳からの sarkosyl 不溶性画分の抽出

AD 患者脳 (0.2 g) を 1.8 mL の A68 buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.8 M NaCl, 1 mM

ethylene glycol bis-N, N, N', N'-tetraacetic acid, 10% sucrose) 中でホモジネートした。さらに A68 buffer を 1.8 mL、20% sarkosyl を 400 μ L 加え、37°C で 30 分インキュベーションをおこなった。15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心後、上清を回収し、さらに 50,000 rpm, 4°C, 20 分遠心した。ペレットを生理食塩水で洗浄し、30 μ L の 30 mM Tris-HCl (pH 7.5) を加えて超音波処理をおこなった[2]。

2-3 Tau 3R/4R マウスを用いた異常蓄積タンパクの脳内伝播モデルの作製

2-2 で抽出した AD 患者脳の sarkosyl 不溶性画分を Tau 3R/4R マウスの右側線条体 (ブレグマから Anterior-Posterior= +0.2 mm, Medial-Lateral= +2.0 mm, Dorsal-Ventral= -2.6 mm) へ接種した (5 μ L/mouse)。接種から 8 ヶ月後に抜脳し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、20%シュウクロース液に置換した。脳を凍結マイクロトームで 30 μ m に薄切し、免疫組織化学染色をおこなった。薄切切片を室温で 30 分間過酸化水素処理し、ビオチン化 AT8 抗体 (Innogenetics, Belgium) を 1,000 倍希釈で反応させた。その後アビジン-ビオチン化 horseradish peroxidase 複合体 (Vector Laboratories, USA) を反応させ、ジアミノベンジジン/硫酸ニッケルアンモニウムにて発色をおこなった。対比染色は Kernechtrot 液 (Merk, Germany) を用いた[3]。また、3R, 4R タウ特異抗体による染色は RD3 抗体 (Merck Millipore, USA, 1,000 倍希釈)、anti-4R 抗体 (当研究室で作製, 1,000 倍希釈) を用い、対比染色はヘマトキシリン液を使用した。

2-4 異常タンパク凝集抑制効果を持つペプチドの探索

アンチセンスホモロジーボックス理論 [4, 5] により検索・設計された α -synuclein (α -syn) の凝集を阻害する可能性がある相補性ペプチドを用いて、 α -syn の凝集阻害を試みた。 α -syn モノマーに KCl, Thioflavin T (ThT), 相補性ペプチドを加え、30 mM Tris-HCl (pH 7.5) 中で 4 日間、37°C でインキュベーションをおこない、6 分間隔で ThT の蛍光強度を Varioscan (ThermoFisher scientific) で計測

した。

3. 研究の成果

3-1 新規タウマウス (Tau 3R/4R) の作製

CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により、ヒトタウと同様に内在性の3R/4Rタウを1:1で発現するマウス (Tau 3R/4R) の作製をおこなった。ワイルドタイプマウス (WT) では4Rタウのみが発現しているため、イムノブロットで3本のバンドが検出されているが、Tau 3R/4R マウスでは3R, 4Rを含むタウの全アイソフォームが発現しているため、6本のバンドが検出された (図1)。

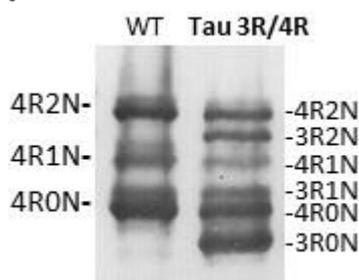


図1, 3R/4R タウを発現する新規マウスの作製。脳内でヒトと同様の発現パターンを示す。左: Wild type、右: Tau 3R/4R マウス

3-2 Tau 3R/4R マウスを用いた異常蓄積タンパクの脳内伝播

AD 患者脳の sarkosyl 不溶性画分を Tau 3R/4R マウスの右側線条体へ接種した。接種から8ヶ月後に抜脳し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、薄切し、抗リン酸化タウ抗体 (AT8) による免疫組織化学染色をおこなった。

リン酸化タウの蓄積は、接種部位である線条体 (図2)、大脳皮質、嗅内野皮質 (図3)、扁桃、黒質などに観察された。黒質に蓄積するタウは黒質-線条体経路を逆行性に、また線条体-黒質経路を順行性に、大脳皮質に蓄積するタウは大脳皮質-線条体経路を逆行性に伝播したと考えられた。

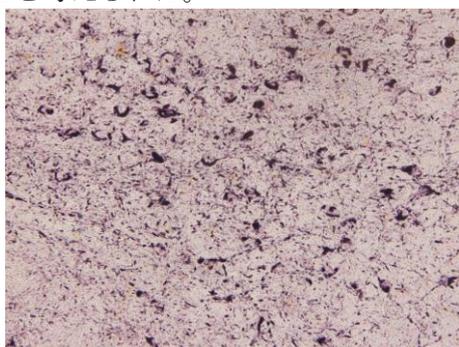


図2, 線条体 (接種部位) 近傍に蓄積する異常リン酸化タウ

また、脳切片を3R, 4Rタウ特異抗体を用いて免疫組織化学染色したところ、3R, 4Rタウそれぞれの陽性構造が観察された (図4)。3R, 4Rタウを同時に蓄積することができた初めてのモデルマウスである。異常タウの接種実験における従来のモデルと本研究との相違を図示した (図5)。

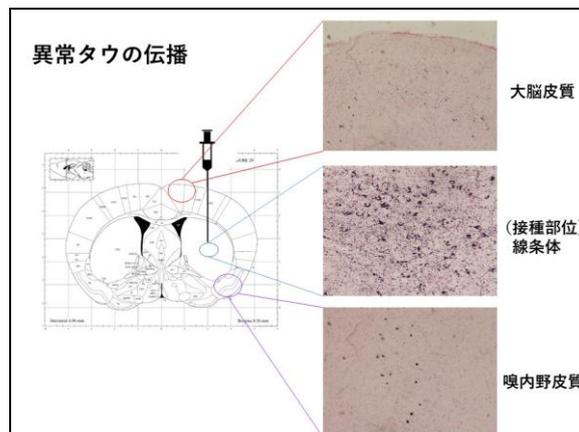


図3, 異常タウの伝播
大脳皮質や嗅内野皮質へ異常タウが伝播している。

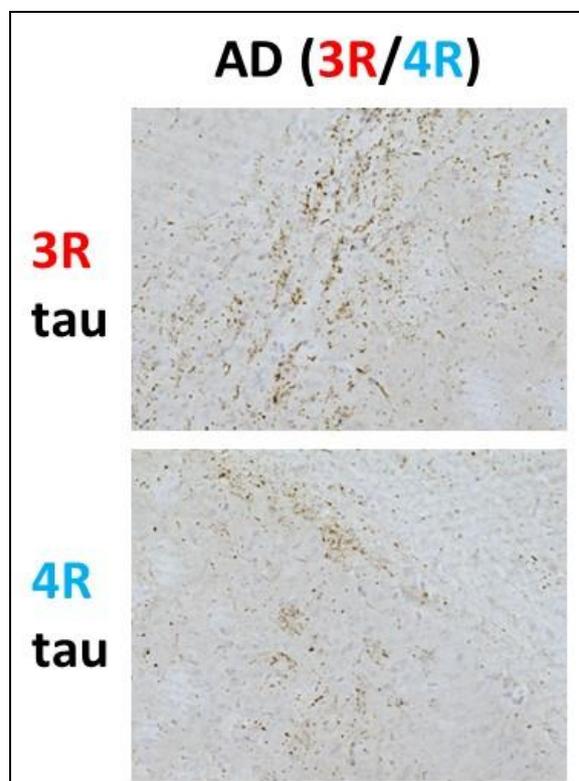
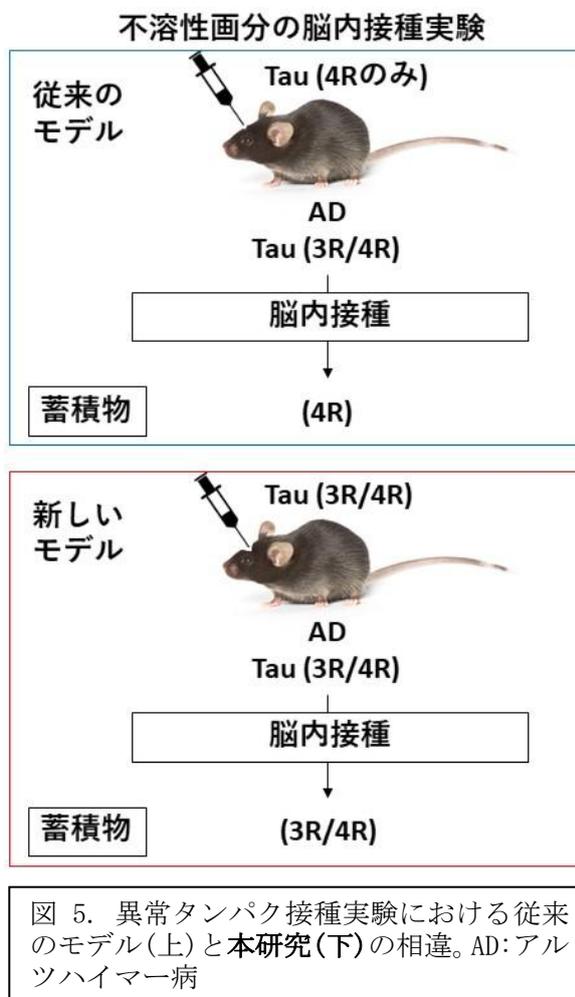


図4, 3R/4R 両方のタウが蓄積する AD 患者脳不溶性画分を Tau 3R/4R マウスに接種すると、3R, 4R 両方のタウが蓄積する。

3-3 異常タンパク凝集抑制効果を持つペプチドの探索

比較的分子量の小さい α -synuclein (α -syn) を対象にして、アンチセンスホモロジーボックス理論により α -syn の凝集を阻害する可能性がある部位の探索をおこなった。その結果、140 アミノ酸から構成される α -syn の 84-93 残基部分が凝集阻害ペプチドの標的的部位となる可能性があることがわかった。この部位に対する相補性ペプチドの設計をおこない、15 種類のペプチドを得た（配列は非公開）。これらの相補性ペプチドを用いて、 α -syn の凝集阻害試験をおこなった。その結果、今回設計された相補性ペプチドの中に α -syn の凝集阻害活性を持つものは存在しなかった。



4. 今後の課題

これまでの報告では、AD 患者脳の不溶性画分接種実験において、4R タウの蓄積を誘導することしかできなかった[6]。今回脳内で 3R, 4R 両方のタウを発現するマウスを用いて、AD 患者脳の不溶性画分を接種し、3R, 4R 両方の

タウを蓄積することができた。今後は 3R のみが蓄積するピック病や 4R タウのみが蓄積する皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺の患者脳不溶性画分を接種し、3R タウのみ、4R タウのみが蓄積することを確認する必要がある。また接種部位を変えることにより、異常タウが伝播していく領域に変化があるかを調べる必要があると考えている。現在までに報告された様々な研究から想定されている凝集体の伝播様式を図示した (図 6) [7]。

異常タンパク凝集阻害効果をもつペプチドの探索をおこなったが、 α -syn の凝集阻害活性をもつペプチドは見つからなかった。今後探索範囲を広げて凝集阻害効果を発揮するペプチドを探す予定である。

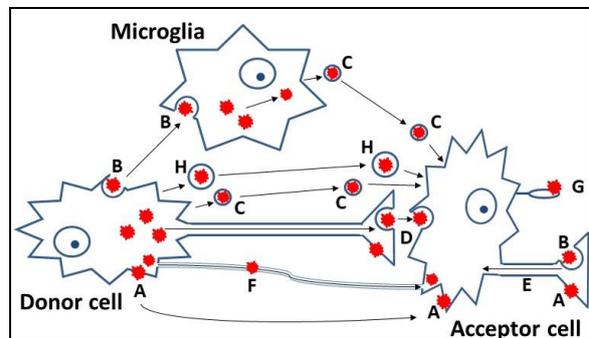


図 6. 想定されている凝集体の伝播様式
 A: 凝集体の受動核酸と近傍細胞の細胞播くからの直接貫通, B: エクソサイトーシス/エンドサイトーシス/ピノサイトーシスによる取込み, C: エクソソームによる放出・取込み, D: 凝集体が神経軸索内を順行輸送された後の、神経終末からのエクソサイトーシス/エンドサイトーシスによる取込み, E: 逆行性輸送, F: 細胞間 tunneling ナノチューブによる凝集体の移動, G: 細胞膜上の受容体依存的取込み, H: エクトソームによる放出・取込み

5. 研究成果の公表方法

本研究課題の結果の一部は 2017 年 7 月 7 日に長崎大学で開催された第 1 回伝播性タンパク研究会にて発表した。また、2018 年 3 月 28 日に開催される第 138 回日本薬学会年会のシンポジウム「プリオンとプリオン様タンパク質」にて発表予定である。研究成果をまとめ、英文誌に投稿予定である。

6. 文献

[1] Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Oikawa T, Arai T, Akiyama H, Mann D, Hasegawa M. Prion-like spreading of pathological alpha-synuclein in brain.

Brain 136(Pt 4):1128-1138. 2013

[2] Hosokawa M, Arai T, Kondo H, Serrano GE, Beach TG, Robinson AC, Mann DM, Akiyama H, Haesgawa M. Accumulation of multiple neurodegenerative disease-related proteins in familial frontotemporal lobar degeneration associated with granulin mutation. Scientific Reports 7: 1513. 2017

[3] Hosokawa M, Arai T, Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Yamashita M, Akiyama H, Hasegawa M. Methylene blue reduced abnormal tau accumulation in P301L tau transgenic mice. PLoS ONE 7(12), e52389. 2012

[4] Baranyi L, Campbell W, Ohshima K, Fujimoto S, Boros M, Okada H. The antisense homology box: a new motif within proteins that encodes biologically active peptides. Nature Medicine 1(9): 894-901. 1995

[5] Hosokawa M, Imai M, Okada N, Okada H. Inhibition of HIV-1 infection in cells expressing an artificial complementary peptide. Biochemical and Biophysical Research Communications 324(1): 236-240. 2005

[6] Clavaguera F, Akatsu H, Fraser G, Crowther RA, Frank S, Hench J, Probst A, Winkler DT, Reichwald J, Staufenbiel M, Ghetti B, Goedert M, Tolnay M. Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. Proc Natl Acad Sci USA 110(23): 9535-9540. 2013

[7] 細川雅人、長谷川成人 プリオンモデル 最新医学 71 (3月増刊号) 529-537. 2016