

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

神経変性疾患モデルマウスを用いた新規行動解析法の構築と
認知機能改善薬の探索

研究代表者 鈴木 正彦（保健医療学部 健康医療科学科）

研究分担者 柳下 聡介^{*}，吉川 圭介^{*}，淡路 健雄^{*}

緒 言

タウオパチーとは、過剰なリン酸化修飾を受けたタウタンパク質が脳内に蓄積することを特徴とする神経変性疾患の総称であり、記憶障害を呈する疾患である。アルツハイマー病もタウオパチーの一つである。

これまで、タウと記憶障害との関連性については、タウを過剰発現させた遺伝子改変マウスを用いた解析が主に行われており、リン酸化タウの蓄積に依って記憶障害が惹起されることが報告されている¹⁾。しかし、タウが記憶維持において担う役割は何か、特にリン酸化タウの生理的な意義については不明のままである。これらを解明することは、基礎生物学的な観点からも、根本的な神経変性疾患の治療薬を開発するという観点からも、重要である。

タウの生理機能解明が進んでいない一つの要因として、適切なモデル動物に乏しいことが挙げられる。従来のタウ研究の主流は、タウを過剰発現させた遺伝子改変動物を用いたものであったが、遺伝子改変に依る影響を無視できないという欠点があった。特に、タウの過剰発現によって、軸索輸送障害が起きることなどが報告されている²⁾。

そこで、タウの生理機能解明のためには、遺伝子改変動物よりも、自然に近い状態でタウのリン酸化が起きるモデル動物が必要である。これまでに、遺伝子改変に依らないモデルとして、麻酔³⁾や絶食⁴⁾などが報告されている。しかし、このモデルでは行動試験ができないなどの欠点があった。

そこで、我々は別の刺激に依って、内在性タウのリン酸化亢進を試みた。その結果、間歇的低酸素負荷 (Intermittent hypoxia treatment; IHT) を継続的に施すことにより、タウのリン酸化を亢進させることに

成功した。本モデルマウスは、自然に近い状態でタウのリン酸化が起きるという利点のみならず、行動実験や長期間に渡った実験が可能、作製にかかるコストが安価であるなど、様々な利点を有している。本研究は、新しいモデルを用いて、タウの生理機能を明らかにし、記憶・学習のメカニズム解明や神経変性疾患治療薬の創出に貢献するものである。

材料と方法

1. 実験動物

C57BL/6Jマウス（オス，9週齢）を購入し，1週間後から実験に使用した。動物の取り扱いに際しては，埼玉医科大学実験動物部門の定める規定を厳守した。

2. 間歇的低酸素負荷 (Intermittent Hypoxia Treatment; IHT)

マウスに間歇的低酸素負荷 (IHT) を施した⁵⁾。その方法は以下の通りである。マウスをチャンバーに入れ，そこに窒素ガスを約 16 L/min で1分間注入し，マウスケージ内の酸素濃度を5%まで低下させた。その後，酸素濃度21%の室内空気を約 14 L/min で2分間注入し，マウスケージ内の酸素濃度を21%まで回復させた。この3分間の操作を1日8時間 (9時～17時) 行った。残りの時間は，通常環境下で飼育した。

IHTに関しては，まず，以下の三群を用意し，対照群との比較を行った。

- IH5D：IHTを5日間実施
- IH5DR2：IHTを5日間実施したのち，2日間，通常環境下で飼育したもの
- ReIH5D：上記IH5DR2と同じ操作の後，更に5日間，IHTを実施したもの

次に，28日間IHTを実施した群についても検討をした。

^{*}医学部 薬理学

3. 脳組織からのTBS可溶性画分の抽出、ウェスタンブロッティング

IHTの後、マウスの脳から海馬を摘出した。海馬は、ホスファターゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤を含むTBS中で破碎した。破碎したサンプルを4℃にて $32,000 \times g$ で20分間、超遠心分離(Rotor: TLA45, ベックマン・コールター社)した後、上清(TBS可溶性画分)を回収し、タンパク定量の後、ウェスタンブロッティング用のサンプルとして調整した。

ウェスタンブロッティングは一般的な方法に則り、リン酸化状態に関係なくタウを認識する抗体およびリン酸化部位特異的な抗体を用いて標識した。

4. Y字迷路試験

行動試験はY字迷路装置を用いた。三本のアームをそれぞれA, B, Cとし、アームAの先端にマウスを置き、10分間、迷路内を自由に探索させた。マウスが進出したアームを順に記録した。まず、異なるアームに3回連続で進出した場合を「コレクト」、それ以外の場合を「エラー」とした。そして、評価は総進回数及び交替行動(コレクトの数)を総進回数-2で割って100をかけた値(交替行動率)を求めることによって行った。

5. 統計処理

データは統計解析ソフトPrism 6 (GraphPad Software社)を用いて解析した。まず、ANOVAで検定を行い、有意である場合には、対照群に対するDunnett検定を行った。二群比較はt検定を実施した。いずれの場合にも、p値0.05未満を有意と見なした。

結果

1. 短期間のIHTによってタウのリン酸化は亢進する

IHTを行った群(IH5D, IH5DR2, ReIH5D)について、タウ関連抗体を用いてタウの総量やリン酸化レベルを解析した。まず、リン酸化状態に関係なくタウを認識する抗体(JM, 高島博士より供与)を用いて総タウ量を検討した。タウの総量は、対照群, IH5D群, IH5DR2群, ReIH5D群の間では有意な差はなく、一定であると考えられた。

そこで次に、タウのリン酸化特異的な抗体を用いて、IHTによるタウのリン酸化への影響を検討した。アルツハイマー病脳では過剰にリン酸化を受けたタウが凝集し、神経原線維変化を形成している。過剰にリン酸化を受けたタウは微小管との結合能が低下する。従って、タウのリン酸化を解析することは、病態との関連を解析する上で重要である。

解析の結果、IH5D群では、対照群に比べ、いくつかの部位のリン酸化亢進が顕著に認められた。具体的には、pSer199, AT8(pSer202/pThr205), pThr212, pSer214, pSer396, pSer404にリン酸化亢進が認めら

れた(Fig. 1)。これらのリン酸化亢進部位は、実際のアルツハイマー病脳でも報告のある部位である。一方、AT270(pThr181), AT180(pThr231), pSer400に有意な変化は認められなかった(Fig. 1)。なお、一部のリン酸化タウについては、矢頭のパンドで定量したものを示している。

次に、IHTを5日間実施した後、2日間の通常飼育を実施したものについて、タウのリン酸化を調べた(IH5DR2)。この群においては、タウのリン酸化レベルは対照群と同程度であった。よって、通常環境下での飼育は、タウの脱リン酸化を亢進するものと考えられた。さらにReIH5D群では、タウのリン酸化は対照群と比べ、IH5D群ほど顕著な亢進は認められなかった。これは通常飼育を2日間挟んだことにより、タウのリン酸化を亢進させる機構が阻害されたためと考えられた。

2. 長期間のIHTによってもタウのリン酸化は亢進する

連続28日間でIHTを行った場合タウのリン酸化亢進レベルやタウのリン酸化パターンにどのような変化があるかを検討した。総タウ量は対照群と同程度であった(Fig. 2)。

一方、タウのリン酸化亢進レベルは対照群と比べAT270(pThr181), AT8(pSer202/pThr205), pThr212, pSer214, AT180(pThr231), pSer400, pSer396において顕著な増加が認められた。

特に、短期間のIHTには認められなかった部位(AT270, AT180, pSer400)のリン酸化亢進が認められた。この結果から、タウのリン酸化パターンは、IHTの期間に依って変化していくことが解った。

3. タウのリン酸化に寄与するキナーゼの探索

タウのリン酸化が認められたため、それに寄与するキナーゼの探索を行った。まず、ERK1/2について検討を行った。短期間処置では、ERK1/2の活性化は認められなかったが(Fig. 3A)、長期間処置ではERK1の活性化が認められた(Fig. 3B)。

4. IHTマウスは行動試験が可能であり5日間のIHTは短期記憶に影響しない

本研究のモデルマウスは行動試験に供することができるのか、また短期間のIHTはマウスの短期記憶にどう影響するのかを検討するためY字迷路試験を行った。

まずIHT前に実験を行い、二群(対照群, IHT群)に分けた。両群の交替行動率に差はなかった。その後は、Fig. 4Aに示すように、IHTを5日間実施した後、その後の2日間の通常環境飼育後、さらにそのあとのIHT5日の後というそれぞれのポイントで試験を実施した。なお、この実験に関しては、同一個体を用いて実施している。

行動試験の結果、どの段階でY字迷路試験を行っても、交替行動率は対照群と同程度であった(Fig. 4C)。

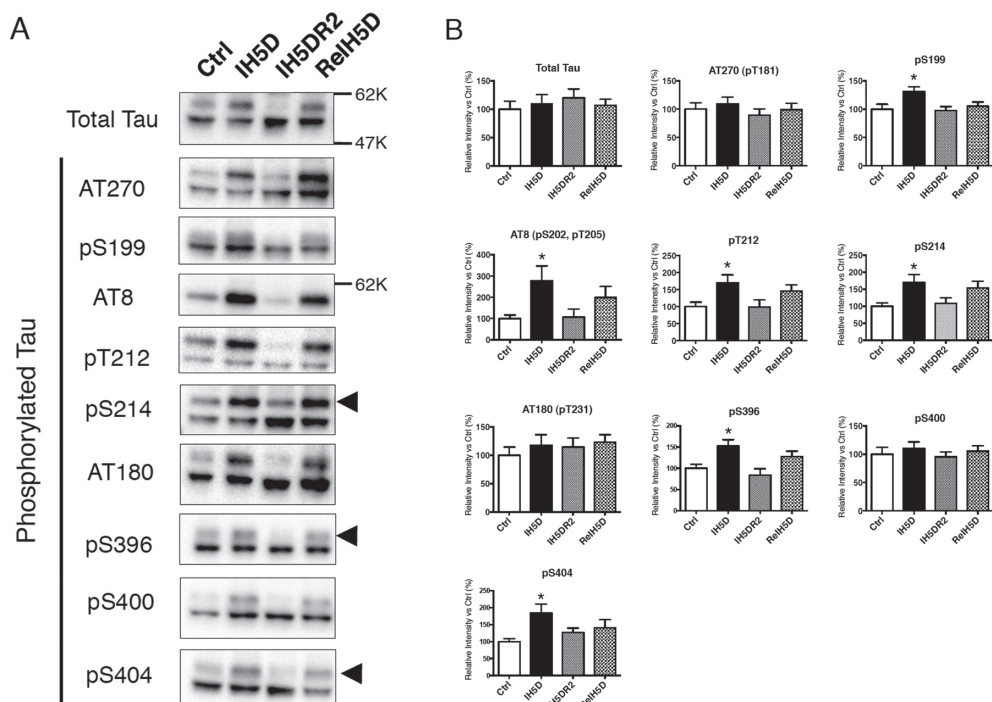


Fig. 1. 短期間のIHTがタウのリン酸化に与える影響. (A) 代表的なプロットを示す. (B) 定量結果を示す. (n=9; *p < 0.05 vs. Ctrl.)

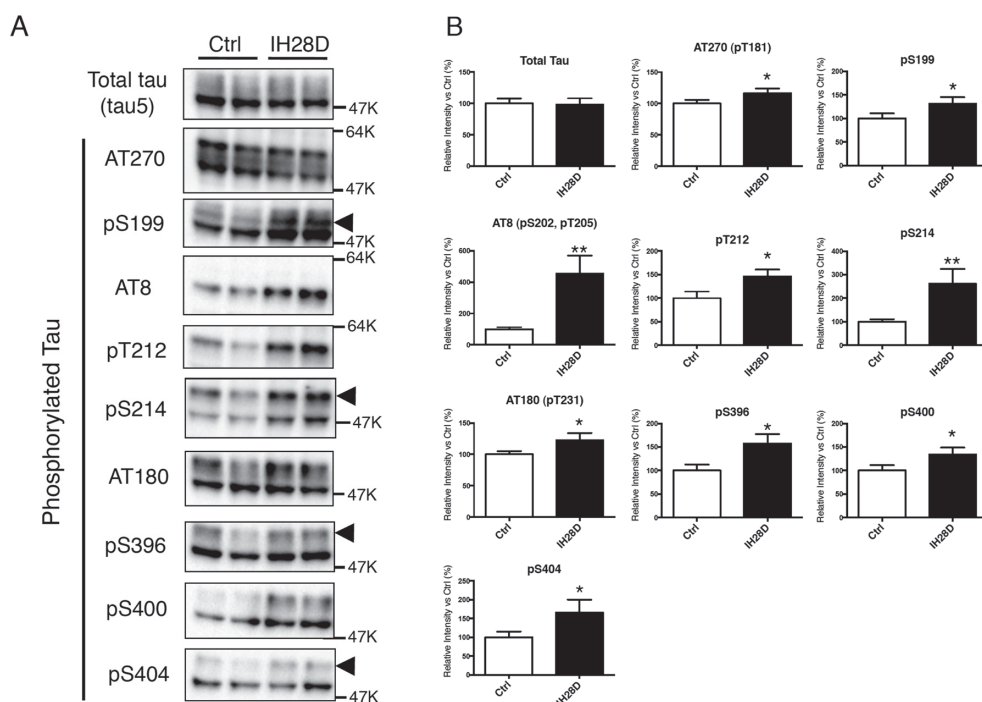


Fig. 2. 短期間のIHTがタウのリン酸化に与える影響. (A) 代表的なプロットを示す. (B) 定量結果を示す. (n=12; *p < 0.05, **p < 0.01 vs. Ctrl.)

また、総進入回数も対照群と同程度であったが、IHT群、対照群共にY字迷路試験の回数が増すに従い、減少する傾向にあった(Fig. 4B).

この結果から、IHTをしたマウスは行動試験に供することができることが解った. また、5日間のIHTは短期記憶に影響しないことが解った.

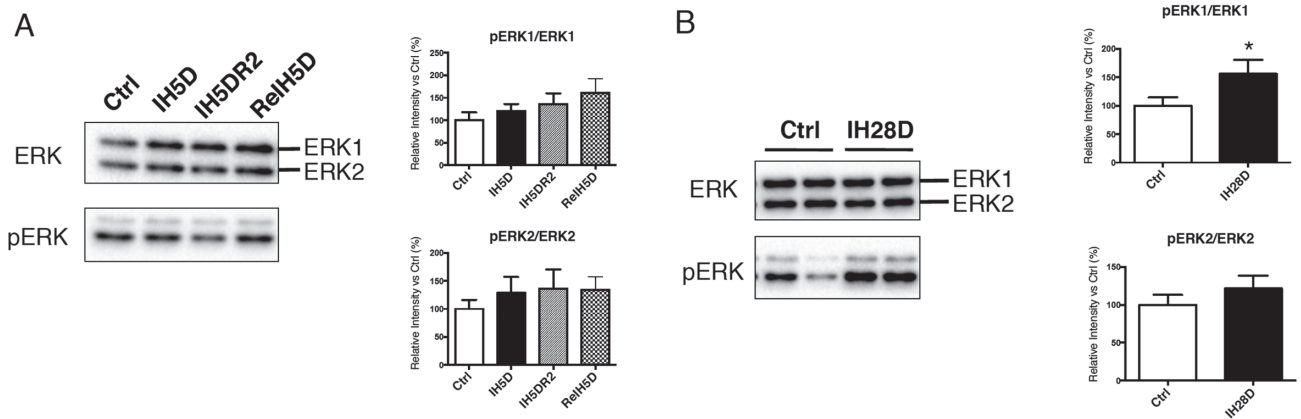


Fig. 3. IHTがERK1/2の活性に与える影響. (A) 短期間での結果を示す. (B) 長期間での結果を示す. n数は各々 Fig. 1, Fig. 2に対応. (* $p < 0.05$ vs, Ctrl)

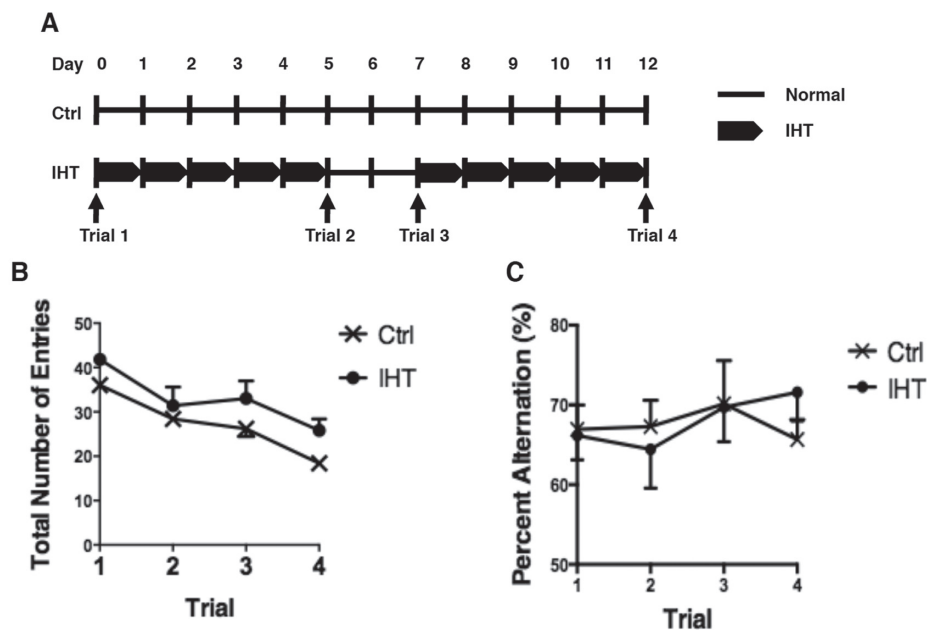


Fig. 4. Y字迷路試験. (A)Y字迷路試験の実施計画. Y字迷路試験は、次の通りに実施した. Trial 1:IHT実施前. Trial 2:IHTを5日間実施した後. Trial 3:IHTを5日間実施した後、2日間の通常環境飼育後, Trial 4: IH5DR2と同じ条件で飼育した後、さらにIHTを5日間実施した後. (B) 総進入回数, (C) 交替行動率.

考 察

IHTによって、内在性のタウに対して顕著なリン酸化亢進を起こせることが分かった. このマウスは行動実験に供することもできることが確認された.

内在性タウのリン酸化が亢進したモデルとして用いることで、新たな知見が得られることが期待される.

参考文献

1) Kimura T, Yamashita S, Fukuda T,

Park JM, Murayama M, Mizoroki T, et al. Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau. EMBO J 2007;26:5143-52.

2) Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, and Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. J Cell Biol 2002;156:1051-63.

3) Planel E, Richter KE, Nolan CE, Finley JE, Liu L, Wen Y, et al. Anesthesia leads to tau

hyperphosphorylation through inhibition of phosphatase activity by hypothermia. J Neurosci 2007;27:3090-7.

- 4) Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui DH, Tanemura K, Sato S, et al. (2004) Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation through differential inhibition of kinase and phosphatase activities: implications for Alzheimer's disease. J Neurosci 2004;24:2401-11.
- 5) Tagaito Y, Polotsky VY, Campen MJ, Wilson JA, Balbir A, Smith PL, et al. A model of sleep-disordered breathing in the C57BL/6J mouse. J Appl Physiol 2001;91:2758-66.

研究成果

学会発表

- 1) 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬. 内在性タウのリン酸化亢進マウスモデルの作製, 第86回日本生化学会, 平成25年9月, 横浜
- 2) 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬.

間歇的低酸素負荷による内在性タウのリン酸化亢進モデルマウスの作製, 第129回日本薬理学会関東部会, 順天堂大学(本郷キャンパス), 平成25年10月

- 3) 鈴木星也, 柳下聡介, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬. 野生型マウスを用いた内在性タウのリン酸化亢進モデルの作製, 第32回日本認知症学会, 平成25年11月, 松本
- 4) 鈴木星也, 柳下聡介, 反町文香, 森泉茉耶, 淡路健雄, 鈴木正彦, 丸山敬. 内在性タウのリン酸化亢進モデルマウス, 第87回日本薬理学会年会, 平成26年3月, 仙台

特許出願

- 出願番号 : 特願2013-130358
 出願日 : 2013年6月21日
 発明の名称: タウタンパク質のリン酸化が亢進された非ヒトモデル動物の製造方法
 発明者 : 柳下聡介, 鈴木正彦, 淡路健雄, 吉川圭介, 丸山敬, 鈴木星也
 権利者 : 学校法人埼玉医科大学