

審査の結果の要旨

氏名 海老沼 五百理

【序論】

アルツハイマー病 (Alzheimer disease, AD) は脳血管性認知症、レビー小体型認知症、前頭葉側頭葉型認知症 (Frontotemporal dementia, FTD) と並ぶ認知症の一つで、進行性に認知機能が低下する。病理学的に海馬などをはじめとした大規模な萎縮と、主に Amyloid β peptide の凝集による老人斑、Tau (MAPT) の凝集による神経原線維変化の蓄積を特徴とする。一方、AD 以外にも、FTD、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症など多様な神経変性疾患において Tau の凝集・蓄積という共通の特徴的な病理的变化が見られ、これらの疾患群は総称してタウオパチーと呼ばれている。このことから、Tau の凝集・蓄積病理の形成は神経障害に深く関連していると考えられる。しかし、細胞内での Tau 凝集メカニズムの包括的な理解は未だ得られていない。そこで本研究では、Tau の細胞内凝集に関わる遺伝子群の包括的な同定を目的として、CRISPR/Cas9 を用いたゲノムワイドスクリーニングを行った。

【方法と結果】

Tau 凝集体細胞モデルにおける形態学的凝集体の出現は細胞周期依存的である

恒常的に Tau 凝集体を有する細胞モデルは、Tau 過剰発現細胞に対しリコンビナント Tau 線維をトランスフェクションすることによって作出できる。そこで TauP301S-cVenus を過剰発現する HEK293A 細胞に対し上記の方法でモデル細胞株を作出し、Tau 凝集体検出方法の検討を行った。本モデル細胞株を顕微鏡下で観察すると、細胞内に Venus の蛍光の集積による明瞭な凝集体を観察できた。一方、この凝集体をタイムラプス観察したところ、細胞周期依存性があり M 期から G1 期に強く観察されることがわかった (図 1)。さらに、この Venus 蛍光で観察される凝集体の細胞内動態を薬理的に解析したところ、飢餓状態や、微小管重合阻害により細胞周期を停止させる Lovastatin、Albendazole によって凝集体形成が強く誘導された。一方で、微小管脱重合阻害により微小管を安定化する Paclitaxel はそのような凝集体誘導能を示さなかった。このことから、Venus 蛍光により観察される凝集体は、細胞周期に伴う細胞骨格の再編成に依存的である可能性が示された。

このような形態学的変化がある一方で、患者脳における凝集 Tau の生化学的特徴である Sarkosyl 不溶性獲得については、Albendazole 処理による変化は認められなかった。このことから細胞周期に依存して Venus 蛍光によって変動する Tau 凝集体は、形態的な変化にとどまる可能性があることが明らかとなった。

Tau PET プローブ PBB3 による細胞内 Tau 凝集の検出

上記検討から、形態学的な変化により病理学的凝集体形成の変化を検出することが難しい可能性が考えられた。そこで Tau 凝集を検出する別の方法として、Tau PET プローブである PBB3 に着目した。PBB3 は凝集 Tau 線維が豊富に含む β シート構造を認識し結合する蛍光化合物であ

る。まず PBB3 が *in vivo* で形成される Tau 凝集を認識できるか、またスクリーニングを視野に FACS によって検出できるかどうかを検討した。TauP301S を過剰発現するトランスジェニックマウス (Tau tg) は、月齢依存的に AD 病理と同様の神経細胞死及び免疫組織学的な Tau 凝集・蓄積病理を生じることが知られている。この Tau tg マウスの脳を解剖し、PBB3 を含む 3 つの凝集特異的蛍光プローブ (PBB2、PBB3、FSB) により染色後、FACS により評価した。その結果、他 2 つの染色では野生型マウスと比べ Tau tg マウスで顕著なシグナルを検出できなかったが、PBB3 染色において Tau tg マウス特異的に検出が可能となったことが明らかとなった。

そこで次に、培養細胞モデルにおける PBB3 による Tau 凝集検出の可否について検討を行った。TauP301S-mCherry/Cas9 を過剰発現する HEK293A 細胞に対しリコンビナント Tau 線維をトランスフェクションし、PBB3 染色と FACS による検討を行った。その結果、Tau 線維導入により誘導された凝集体を保持する細胞は有意に高い PBB3 蛍光値を示したことから、PBB3 を利用することで、病理学的な Tau 凝集形成量の変化を定量的に解析できると考えられた。

Tau 凝集に関連する新規分子探索のための CRISPR/Cas9 スクリーニング系の構築

上記培養細胞モデルを用いて、Tau 凝集に関連する新規分子群を網羅的に解析するために、CRISPR/Cas9 によるスクリーニングとして、pooled gRNA lentiviral library を用いる方法を考案した。まず前述したように、TauP301S-mCherry/Cas9 を過剰発現する HEK293A 細胞に対して作成された Tau 凝集モデル細胞株に対し、Cas9 の動作を確認後、gRNA lentivirus ライブラリーを感染させ、Cas9 によるゲノム編集を行った細胞集団を用意した。この細胞集団を PBB3 で染色したのち FACS により PBB3 染色が上昇した細胞群を選別し、ゲノム抽出してレンチウイルス由来する配列を PCR により増幅し、次世代シーケンサーにより gRNA 配列を解析し、これらの細胞においてゲノム編集の標的となった遺伝子座を網羅的に同定することに成功した。

【総括】

本研究では、Tau 凝集体培養細胞モデルの評価及びゲノムワイドスクリーニング系の構築と解析を行った。培養細胞モデルにおいて、蛍光タグの集積によって形態学的に観察される凝集体は、生化学的な変化を伴わずに細胞周期に伴う細胞骨格の再編成に依存して変動する可能性が明らかとなり、患者脳やモデルマウスにおいて認められる病理学的 Tau 凝集体とは、異なった生化学的性質をもちうることを明らかにした。一方で、より病理学的性質を評価できる PBB3 による検出系を見出し、CRISPR/Cas9 スクリーニング系を構築した。

今後スクリーニングの結果得られた候補遺伝子の解析を進めることで、タウオパチーの原因となる Tau の凝集のメカニズムについて明らかにする。また、Tau は神経細胞のみならず、疾患によってはアストロサイトやオリゴデンドロサイトに蓄積することや、線維構造が異なることも知られているが、その違いを生み出すメカニズムは一切明らかとなっていない。今後本スクリーニングに用いる細胞種の変更や、導入する線維を変えることによって、様々なタウオパチーにおいて認められる Tau 凝集メカニズムの違いが明らかとなり、さらには発症機構の解明につながるものと期待される。

以上の通り、本研究は AD 他タウオパチーの治療薬開発に大きく資するものであり、よって本論文は博士 (薬科学) の学位請求論文として合格と認められる。