

201407012B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

認知症早期解析型マウスモデル
の開発研究

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 森 啓

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

認知症早期解析型マウスモデル
の開発研究

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 森 啓

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
認知症早期解析型マウスモデルの開発研究	
研究代表者 森 啓	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 1 1
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 1 4

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
（総合）研究報告書

認知症早期解析型マウスモデルの開発研究に関する研究

研究代表者 森 啓 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究要旨

本研究は、臨床上の要求に応えるべく、早期病態を詳細に精査できるモデルマウス開発を目的とする。その条件とは、A β オリゴマー、タウ病変、認知症状（空間認知障害）の病態変化が、相互に関連しつつ発症する早期発症型モデルマウスの確立である。本研究で開発されたモデルマウスは、ヒトアルツハイマー病の病因カスケードの最新仮説であるオリゴマー仮説とタウ仮説を矛盾無く包含し、かつ早期発症モデルとして臨床症状、生理学検査、生化学検査から脳神経病理学検査まで検討した。さらに、タウモデルでは、治療薬候補として開発した間接ワクチン療法効果を検証することで、モデルマウスとしての意義を実証することに成功したばかりか、同時に、新たな治療戦略の可能性を強く示唆する結果を得ることができた。

研究分担者

富山 貴美 大阪市立大学大学院医学研究科・准教授

梅田 知宙 大阪市立大学大学院医学研究科・助教

A. 研究目的

厚生労働省が2012年に発表された調査結果では、国内の認知症患者が305万人を超えると指摘されている。しかも、この実態は、要介護認定者に限られていることから、実際の認知症患者数は、400万人を超えると予想されている。

アルツハイマー病は、認知症の大部分を占める疾患であり、進行性を呈することから、早期診断と早期対応が強く求められている。現在、医療機関が14%、居宅が約50%となっている他は、諸施設で過ごされている。今後5ヶ年計画のオレンジプランでは、患者の在宅化を促進する計画であるが、具体的な方法論については、結論されていない段階である。このように、アルツハイマー病を含む認知症患者の増大にともない、医療、介護による支援体制は、医療経済の上からも大きな負担となりつつあり、とりわけ日本では、戦後に生まれた団塊世代が70歳に到達する2025年に高齢者問題がピークを迎えることとなる、いわゆる2025問題を10年後に控えていることもあり根本的な対策が必要である。

純粋な医学的視点からも、現行のアルツハイマー病治療薬剤は、進行を一時的に抑制する

効果があるが、進行を止めたり、治癒することがない。この対処療法薬しかない現状では、患者数の軽減を図ることには限界がある。これらのことから、アルツハイマー病の根本治療薬の開発は緊急に取り組まなければならない。本研究では、未だに結論されていないアルツハイマー病の詳細な病態解明を推進させる事を目的として、とりわけ早期診断、治療対応が可能なモデルを作製、検討することである。早期、中期、晩期という臨床的分類に対する指標は、ある意味で抽象的であり、恣意的である点で、客観性が少ないことは問題であるが、これらを医学的に整理する上でも病態カスケードをバイオマーカーや脳神経病理変化などの視覚的変化などで明らかにすることを明らかにすることを、本研究の目的とする。

B. 研究方法

孤発性認知症疾患を反映させるモデルとして、タウタンパク質分子のアミノ酸変異のない遺伝子を用いたモデル開発と性状分析であり、2年度以後の交配、解析に使用するためにも欠かせない課題である。

(1) モデルマウス作製

遺伝子コンストラクトは、ヒト最長アイソフォーム (tau441) cDNAを基盤として、イントロン9上流の18塩基、下流3kb、エクソン10およびイントロン10上流3kb、下流38塩基をもつように設計し、海馬での高発現をする事が知られているカルシウム・カルモデュリンキナーゼIIプロモーター下流に連結させた。遺伝子注入の手法は既存の方法に拠った (図1)。

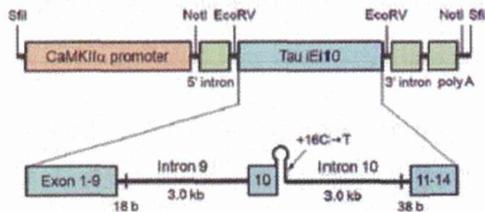


図1. モデルマウス作製に導入したヒトタウ遺伝子のミニゲノムコンストラクト。

(2) ウェスタンブロット

マウス脳組織は、100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl (TBS)にて粉碎後、遠心上清を得る。不溶性画分は、サルコシル含有TBSおよびグアニジン塩酸含有TBSにて分別抽出した。脳由来タウタンパク質の脱リン酸化には、アルカリホスファターゼ (NEB社) をマグネシウム、DTT存在下で37°C、16時間反応させることによって実施した。タウ蛋白の検出には、7% NuPage Tris-Acetate ポロアクリルアミドゲル (Invitrogen社) による分離後、15ボルト、90分の条件でPVDF膜へ電気転写後に、ヒトタウ抗体 (pool-2、G2) を使用した。

(3) 免疫組織化学および免疫電顕観察

検討すべき週齢のマウスは、4%パラホルムアミド含有リン酸化緩衝液生理食塩水にて灌流固定を施し、脱水処理後にパラフィン包埋、5ミクロンにて薄切した。各標本はキシレン、アルコール処理により脱パラフィン後、通常の方法によって抗体反応させ、二次抗体として蛍光標識あるいは、ペルオキシダーゼ抗体、DAB染色後に観察した。免疫電顕観察には、オスミウム固定した脳組織片をエポン包埋後に薄切市、タウ抗体反応後、二次抗体には、10nm金コロイド粒子標識下抗体を使用した。

(4) 電気生理学

既存の方法により実施した。脳海馬を含む脳切片を 350 ミクロン厚にて縦切断し、酸素気泡下に組織培養した。CA3 電気刺激による fEPSP 反応記録により LTP 解

析をした。図2は、シナプス伝達効率に関する長期増強 (LTP) を測定するための刺激系と記録系回路を示している。

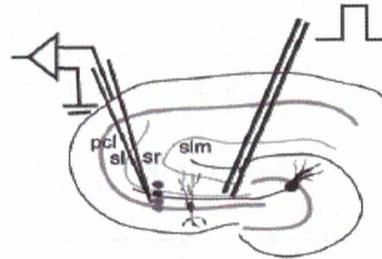


図2. シナプス学習機能である LTP 測定スキーム。

(5) 間接的ワクチン療法

413番目Serの側鎖にリン酸を導入した合成タウ部分ペプチドを抗原として、マウスに免疫し、規制手法により複数の単クローン抗体 (Ta12、Ta1505、Ta9) を作成した。

モデルマウス609および784雄マウスを対象として、0.1Mクエン酸 (pH5.0) に溶解した精製抗体ワクチン (pSer413を認識するTa1505、pSer396を認識するTa4あるいは、コントロール抗体) を、一回/週に低容量 (0.1mg) あるいは高容量 (1mg) を腹腔内注射した。

(6) 行動試験

Morris水迷路学習行動試験を実施した。

(7) 統計解析

ANOVA解析は、Fisher's PLSDテストにより有意差検定を実施した。電気生理におけるI/O curve分析には、ANCOVA解析により実施し、いずれも有意差は、 $p < 0.05$ による統計有意差を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、実験動物に対する動物愛護上の配慮についても、本学の動物実験審査委員会で承認されております (受付・承認番号 #08102)。

本研究は、動物実験の中で遺伝子実験を含むことから、組み替えDNA実験についても、安全等への配慮をした上で、本学の組換えDNA実験委員会で承認されております (受付・承認番号 #267)

C. 研究結果

(1) ヒトゲノム型モデルマウスの樹立
アミノ酸変位のないタウ遺伝子をカルシウム・カルモデュリンキナーゼIIプロモーター

下流に配置した。タウ遺伝子は、もっとも重要な機能に関連したエクソン10および前後の6kb塩基長のイントロンを含む。塩基置換のない野生型配列とイントロン10上流の+16塩基をシトシンからチミジンに変更したFTDP-17モデルも同時に作製した。作製したトランスジェニックマウスは、野生型(#264)とFTDP-17型(#609、#784)である。

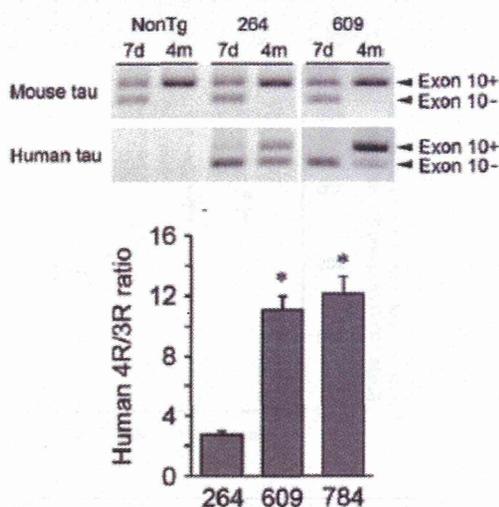


図3. RT-PCRによるモデルマウス脳でのヒトタウアイソフォーム発現の解析。(上段) 内在性マウスタウアイソフォームと(下段) 導入ヒトタウアイソフォームを示す。野生型ヒトでは、3R型から3R型+4R型になるが、イントロン変異があると、3R型から4R型優位に変化する。下の図は、両アイソフォームの比をしめしている。

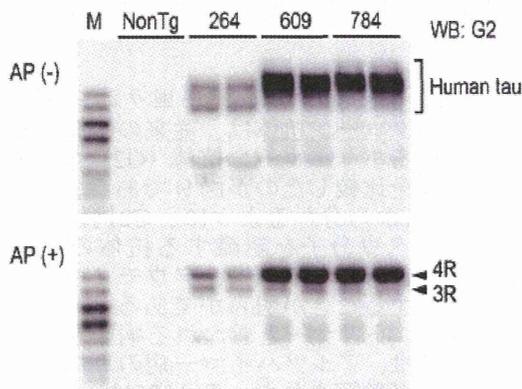


図4. モデルマウス脳でのヒトタウタンパク質発現。特異抗体(G2)を使用したタウアイソフォームは、リン酸化タウ(AP-)と脱リン酸化タウ(AP+)毎に分析した。

これら二種類三系統のマウス脳でのヒトタウ遺伝子発現を発達成長過程で観察すると、ヒトと同じく生後二週間後より、アイソフォーム発現変化が見られた。すなわち、野生型では、3R型アイソフォームから、3R型:4R型=1:1での発現となり、FTDP-17型では、幼弱、小児期では野生型と同じく3R型アイソフォームであるが、成熟に従い4R型優位の混合型発現と成った(図3)。このmRNAレベルでの結果は、蛋白レベルでも同様に検証された(図4)。

(2) モデルマウスの脳神経病変

銀染色陽性の封入体形成は、アルツハイマー病脳組織の重要な特徴である。図5に示すように、野生型には見られない銀染色封入体がイントロン内変異(+16C→T)で観察された。

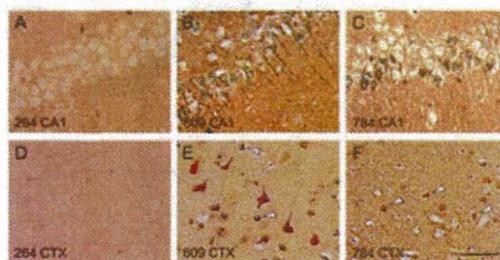


図5. モデルマウス脳でのガリアス銀染色によるpretangle(24ヶ月齢)。(A、D) 野生型タウマウス(264)には、銀封入体は観察されないが、イントロン変異があると封入体を形成する(609、784)。

この異常タウ封入体は、電子顕微鏡により線維構造が観察されたが、さらに抗タウ抗体によって標識されることから、タウ線維であることが確定した(図6)。この病理像は、形態学的変化だけでなく、生化学的建築によってもイントロン変異マウスに特異的に、界面活性剤溶出画分に回収された。

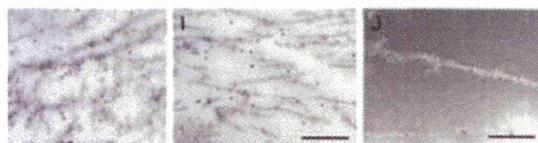


図6. モデルマウス脳でのガリアス銀染色によるpretangle(24ヶ月齢)。(A、D) 野生型タウマウス(264)には、銀封入体は観察されないが、イントロン変異があると封入体を形成する(609、784)。

(3) モデルマウスの脳神経機能障害

モデルマウスの記憶障害あるいは空間学習能力については、Morris 水迷路により検証した。ヒト野生型タウ遺伝子を導入したマウスは正常の記憶をしめしたが、イントロン内変異を持つ遺伝子を導入したモデルマウスは、学習能力が4ヶ月齢まで正常であったが、加齢と共に低下し野生型ヒト野生型タウ遺伝子を導入したマウス(各々 $p=0.0011$ 、 $p=0.0027$)と比較して各々優位な遅滞を示した(図7A)。

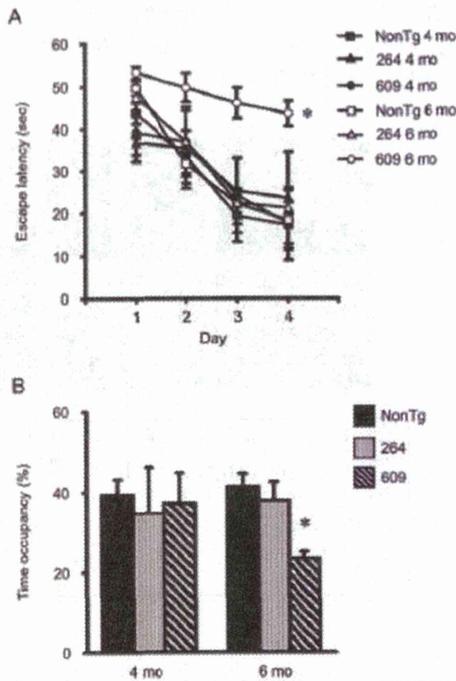


図7. Morris 水迷路による空間学習記憶テスト。野生型タウマウス(264)は正常な記憶力を示したが、イントロン変異があるマウス(609、784)では6ヶ月齢から学習能力と記憶保持が優位に低下した。

また、学習後のプラットフォーム記憶(図7B)も同様に低下していた(各々 $p=0.0098$ 、 $p=0.0352$)。

(4) 神経脱落

認知症の変性疾患の脳式は、MRI 脳画像による検査で脳萎縮が観察される。その病態は、神経脱落であるが、モデルマウスの神経脱落をニューロン特異抗体(NeuN)を指標に検討した(図8)。

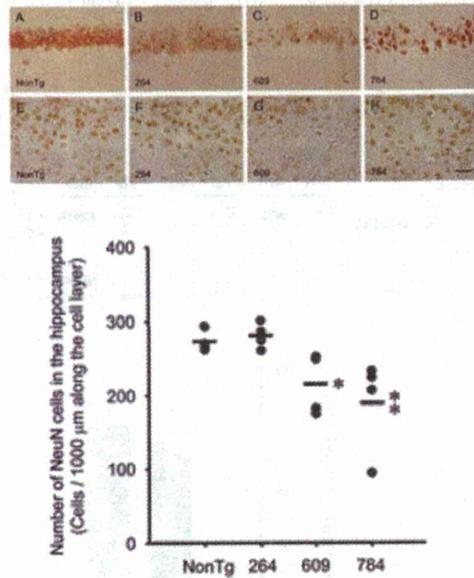


図8. 神経脱落像。ニューロン特異抗体(NeuN)によって存神経細胞数を測定。(上段)海馬および(下段)皮質領域のNeuN免疫染色像。左より、(A、E)コントロールマウス、(B、F)野生型タウマウス(#264)、(C、G)イントロン変異マウス(#609)、(D、H)イントロン変異マウス(#784)。下のグラフは、残存ニューロン数を示している。イントロン変異マウスは、優位な細胞脱落を示している。

(5) p413Serを認識する単クローン抗体

単クローン抗体は、従来の研究で確立しているポリクローン抗体(G2)との免疫反応性を比較したのが図9である。

図1から分かるように、G2抗体或いは、異常タウ分子を認識する抗体の反応性から、正常ヒト脳には、タウモノマーだけが存在することが明らかである。一方、ダイマー、トリマーと言われる病因オリゴマー分子は、アルツハイマー病のみに存在することが確認された。Ta1505は、安定して、異常リン酸化タウを認識することから、この単クローン抗体に焦点を絞って、更に検討を進めた。

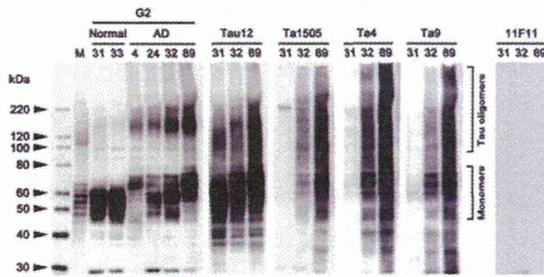


図9. 単クローン抗体の免疫特異性アルツハイマー病脳組織(症例4, 24, 32, 89)あるいは非認知症脳組織(症例31, 33)抽出液を対象として、異常タウ分子との反応性を比較した。

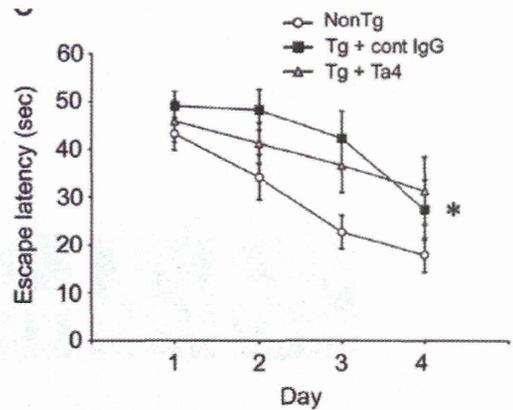


図11. モデルマウスの空間学習能に及ぼすワクチン療法(Ta4抗体)

(6) 臨床記憶力による間接ワクチン療法の検証

14ヶ月齢のモデルマウス784を対象として、副区内ワクチン投与を実施した。ワクチン効果の評価を空間学習能テストでp413Ser抗体(Ta1505)を検証したのが、図10である。

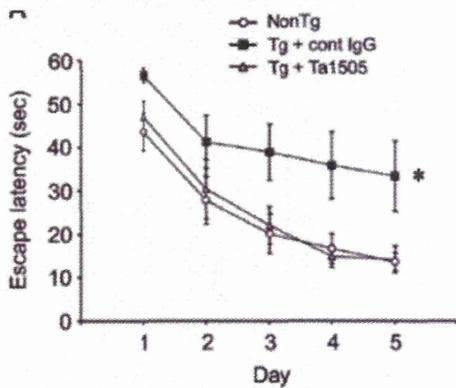


図10. モデルマウスの空間学習能に及ぼすワクチン療法(Ta1505抗体)

図10に明らかなように、Ta1505が記憶力保持に有益なことが分かる。同じく異常リン酸化タウを認識するTa4抗体について検証したのが、図11である。

図10及び図11の比較により、同じ異常リン酸化タウであっても、p413とp396による効果の差があることが分かる。

(7) 脳神経病理学分析による間接ワクチン療法の検証

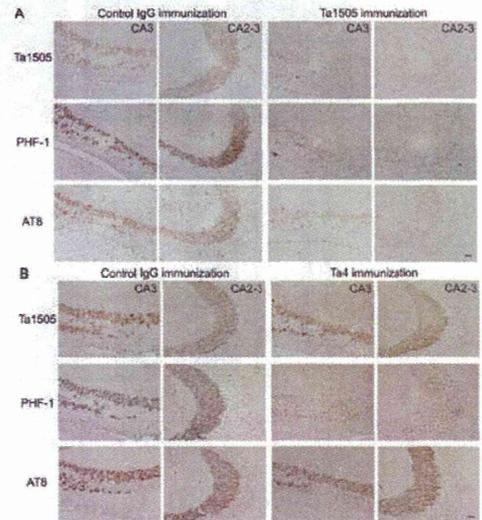


図12. モデルマウスの脳神経病理変化に及ぼすワクチン療法
A: Ta1505抗体, B: Ta4抗体

図12で、2つの異常リン酸化タウ抗体(A: Ta1505, B: Ta4)の病変への効果を見たところ、Ta1505ワクチンは、Ta1505サイ

トだけではなく、 Ta4サイトにもクリア効果があることが示されたが、 Ta4ワクチンは、 Ta1505サイトには、ほとんど作用せず Ta4サイトだけにワクチン効果が限局していることがわかる。

(8) シナプス変性によるワクチン療法の検証

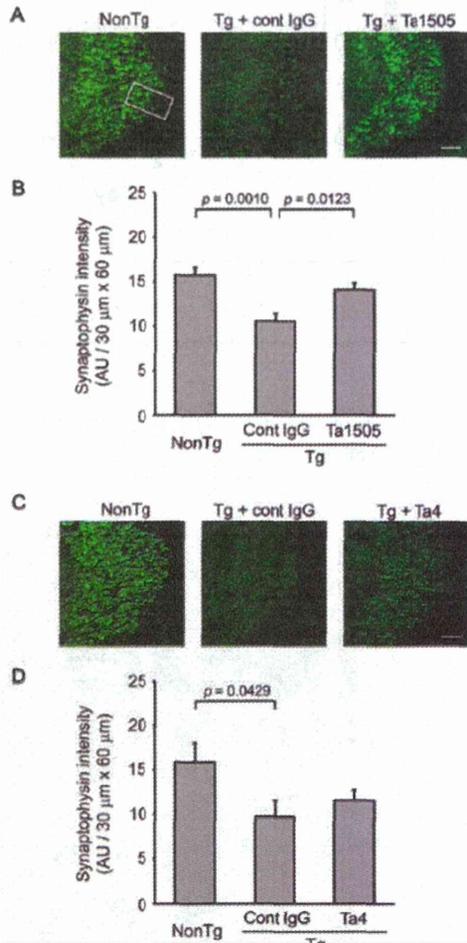


図13. シナプス変性に及ぼすワクチン療法
A: Ta1505 抗体, B: Ta4 抗体

異常タウ病変で、シナプス変性が生じているが、図13ではワクチン療法により変性阻止が可能かを検証した。

その結果、図4に見られた脳病変への効果と同様に、 pSer413を認識するTa1505がシナプス保護作用がある。一方、 pSer396を認識するTa4はシナプス保護作用では限定的効果となっていることが明らかとなった。

(9) 神経原線維変化形成におけるワクチン療法の検証

アルツハイマー病の脳病理変化として神

経原線維変化は古典的病変の一つとして樹立している。今回ワクチン療法による神経原線維変化形成への効能を検討した結果、図14に見られるように、Ta1505が病理形成阻止効果が高いことが明らかとなった。

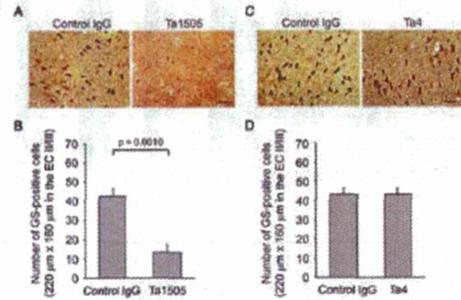


図14. シナプス変性に及ぼすワクチン療法
A: Ta1505 抗体, B: Ta4 抗体

(10) ワクチン療法によるニューロン細胞死への効果検証

アルツハイマー病の脳変化として、脳重低下がある。これは、脳萎縮或いは、ミクロ的には、ニューロン脱落として議論されることがある。

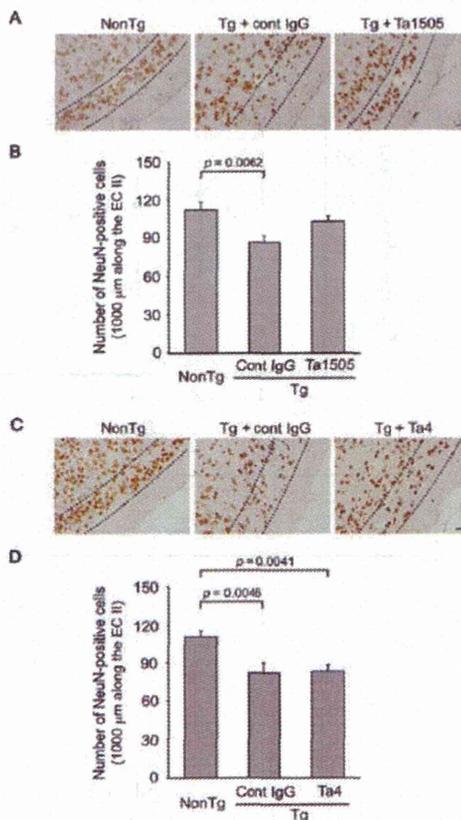


図15. ニューロン脱落に及ぼすワクチン療法
A: Ta1505 抗体, B: Ta4 抗体

今回、本研究では、ニューロン細胞死を、特異的かつ定量的に評価するために、NeuN抗体により免疫染色を実施し検証した。

図15は、その結果を示している。pSer413を認識するTa1505がニューロン保護作用がみとめられているが、統計学的有意差を得るには至っていない。一方、pSer396を認識するTa4も、弱いながらもニューロン保護作用が、Ta1505よりは限定的に観察されたが、その効果の統計学的有意差は、得られていない。

D. 考察

ヒト型のタウ遺伝子を発現するモデルマウスを作製した。とくに、ヒトでは、幼若期から成長すると、タウのアイソフォームが3R型から3R型・4R型の1対1の混合型にあることが知られている。これらのアイソフォーム変化は、多くの孤発性認知症疾患でも観察されている分子変化であり、従来のタウモデルマウスでは、アミノ酸変異を伴うFTDP-17疾患のみが対象と成る限界があった。本研究では、3R型、4R型を決定するエクソン10の発現制御をしているイントロン9およびイントロン10をトランスジェニックモデルマウスへの遺伝子コンストラクトとして組み込むという研究戦略を採ることによって、多くの孤発性疾患への応用を視野に入れた点も重要である。

さらに、このモデルマウスでは、イントロン変異の有無によらず、正常な人タウ遺伝子の発声制御を受け、生理的なタウ分子アイソフォーム変化をすることが確認できた。正常モデルでは、3R型と4R型アイソフォームが成人型では、1対1とヒトと同じとなったが、イントロン変異の導入により、ヒト変性疾患と同様な4R型アイソフォームの異常発現高進が確認された。しかも、この異常高進によるタウ病態は異常リン酸化を引き起こしていることも病態モデルとして重要な研究成果である。

病態モデルとしての変化を時系列順に併記すると、4ヶ月齢で4R型アイソフォームの発現高進、6ヶ月齢で異常リン酸化タウ出現とシナプスLTP機能障害、記憶学習能力障害、12ヶ月齢で炎症性ミクログリア増加、24ヶ月齢でpretangle形成、アストログリア増生と神経脱落となる。とくに本研究により異常リン酸化からpretangle形成まで長期のブランクがあることが観察された点は大きな意味を持つと考えられる。この間に、シナプス異常や

記憶障害があることから、異常リン酸化の早期検出の意義が明らかになったといえる。これまで病態カスケードの時系列が、不明であったが、今回記憶障害から細胞死までに至る年月が確実に存在することを明らかに出来たことから、早期診断による早期治療介入の意義が、本モデルマウスで強く示唆されたと考えている。

イントロン変異をもつタウ遺伝子の導入によって、ニューロン細胞数の顕著な現象が観察された。とくに、この脱落は海馬領域で明らかであり、導入した遺伝子発現が海馬で特に高いことを考えると説明が容易である。また、炎症性のミクログリア細胞の活性化が12ヶ月齢より始まることを考えると、この神経脱落が18ヶ月齢ではなく24ヶ月齢で検出されることから、他の脳病態と平行して出現すると言うよりも最終末脳病変として検出されると考えられた。

Aβオリゴマーは、アルツハイマー病の早期病態変化であり、後期変化である神経原線維変化を誘導する上流に位置する。Aβオリゴマーは、マウスタウでは神経原線維変化を誘導せず、ヒトタウを必要とすることから、ヒトアミノ酸配列特異的なシグナルパスがあることが示唆された。このことは、治療戦略の時期選定という応用面からも重要な視点を与えている。すなわち、Aβオリゴマー、Aβオリゴマーからヒトタウへのシグナル伝搬、タウ病変の各々が、早期、中期、後期の治療薬対象であり、将来的には、患者各位のステージに沿った治療選択の指標となることが考察される。

今回のダブルトランスジェニックマウスの解析では、Aβオリゴマー自身の出現も単独のモデルでは8ヶ月例からの出現である処、6ヶ月例と明らかな早期出現されることが観察された。このことは、Aβオリゴマーとタウ病変は、完全な一方方向の病態シグナルであると考えられるよりも、部分的な双方向性シグナルの可能性が考えられた。

本年度の研究では、認知症早期解析型マウスモデルの開発を目的としている。本年度は、実際の診断と治療を視野に、異常リン酸化タウを認識する抗体を用いて、モデルマウスの有用性の検証をした。

期待通り、我々が作成したモデルマウスは、ヒト認知症を再現する点で、極めて実用性が高いことが明らかとなったが、評価、検証としての視点からも薬剤検討対象としての有益性が、本研究成果によって確立したと考えている。なにより、異常リン酸化部位として、従来もつとも定番であったpSer396よりもpSer413部位の意義が観察されたことは、予想外の発見である。この部位特異的な単クロー

ン抗体であるpT1505単クローン抗体の有用性は、さらにヒト型化して検証されるべきであると考えている。

E. 結論

タウに注目した早期診断解析マウスを樹立した。タウのアイソフォーム分子発現は、ヒトでの生理的な遺伝子発現を再現できた。観察されたモデルマウス脳病態変化は、ヒトでの脳神経病理像と矛盾しない脳変化を観察できたばかりか、各病変の時系列を明らかにするモデル動物として検証することができた。

アルツハイマー病の早期病態変化であり、特異的原因分子種である $\text{A}\beta$ オリゴマーは、正常型ヒトタウを神経原線維変化へと誘導する上流で作用する。

ヒト型被遺伝変異アミノ酸配列を発現するタウモデルマウスでは、24ヶ月齢まで正常に発育するが、イントロン内に変異を導入したモデルマウスでは、シナプス伝達異常、空間識別能力、異常リン酸化タウの出現、神経原線維変化、ニューロン細胞死が生じる。この認知症病態モデルマウスは、アルツハイマー病で検出されている異常リン酸化部位を認識する抗体を用いた間接ワクチン療法で治療、予防されることが示唆されてきたが、本研究で実際に p Ser 413 を認識する単クローン抗体 (Ta1505) が本モデルマウスに有効なワクチン効果を示しうることが実証された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Umeda T, Eguchi H, Kunori Y, Matsumoto Y, Taniguchi T, Mori H. & Tomiyama T. Passive immunotherapy of tauopathy targeting pSer413-tau: A pilot study in mice" in its current form for publication in *Annals of Clinical and Translational Neurology*. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2(3): 241-255. (2015)

2) Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H. & Sunada Y. A Second Pedigree with Amyloid-less Familial Alzheimer's Disease Harboring an Identical Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene (E693delta). *Internal medicine* 54(2): 205-208. (2015)

3) Honjo Y, Horibe T, Torisawa A, Ito H, Nakanishi A, Mori H, Komiyama T, Takahashi R. & Kawakami K. Protein disulfide isomera

se P5-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 38 (3): 601-609. (2014)

4) Umeda T, Maekawa S, Kimura T, Takashima A, Tomiyama T. & Mori H. Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice. *Acta Neuropathol.* 127:685-698. (2014)

5) Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S. & Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular $\text{A}\beta$ and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12: 487-496. (2013)

6) Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T. & Mori H. Neurodegenerative Disorder FTDP-17eRelated Tau Intron 10 +16C/T Mutation Increases Tau Exon 10 Splicing and Causes Tauopathy in Transgenic Mice. *Am J Pathol* 183: 211-225. (2013)

7) Nomura S, Umeda T, Tomiyama T. & Mori H. The E693 Δ (Osaka) mutation in amyloid precursor protein potentiates cholesterol-mediated intracellular amyloid β toxicity via its impaired cholesterol efflux. *J Neurosci Res* 91: 1541-1550. (2013)

8) Takano M, Yamashita T, Nagano K, Otani M, Maekura K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Tomiyama T, Mori H, Matsuura K. & Matsuyama S. Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis. *Neurosci Lett.* 534: 85-89. (2013)

9) Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL. & Mori H. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of $\text{A}\beta$ oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sciences.* 91: 1169-1176. (2012)

10) Takano M, Maekura K, Otani M, Sano K,

Nakamura-Hirota T, Tokuyama S, Min KS, Tomiyama T, Mori H. & Matsuyama S. Proteomic analysis of the brain tissues from a transgenic mouse model of amyloid β oligomers. *Neurochem Int.* 61: 347-355. (2012)

2. 学会発表

1) 森 啓

「看護・介護現場における認知症の終末像と看取り」ナーシングEXPO（インテックス大阪、2015年2月5日）

2) 森 啓

「アルツハイマー病治療薬の展望」第32回日本神経治療学会・特別講演（東京ドームホテル：2014-11-22）

3) 野呂暁、一井定信、越後尚恵、中山慧哉、森祐輔、森啓、熊谷紀史、大上哲也

「在宅訪問薬剤師が出来る簡便な認知機能の把握方法の検討」第8回日本薬局学会（広島国際会議場、2014-11-23,24）

4) Mori H.

「Efficient prevention of dementia based on medical evidence and an financial view」Dementia Summit 2014Tokyo (Roppongi, 2014-11-6)

5) 森 啓

「アルツハイマー病研究update2014」第5回日本血管性認知障害研究会・特別講演（メルパルク京都：2014-8-23）

6) 森 啓

「認知症の根本治療を求めて」第5回日本アプライド・セラピューティクス学会学術大会・特別講演（神戸国際会議場：2014-8-3）

7) Tomiyama T, Umeda T, Eguchi H, Kunori

Y, Matsumoto Y, Taniguchi T, Mori H. Passive immunization with a new monoclonal antibody to phosphor-Ser413-tau attenuates tauopathy phenotypes in mice. The 12th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD2015), Nice, France, 2015. 3. 18-22.

8) Umeda T, Silverman MA, Mori H, Tomiyama T. Intraneuronal amyloid β oligomers cause aberrant spine morphology and disrupt axonal and dendritic trafficking independently of tau. The 12th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PD2015), Nice, France, 2015. 3. 18-22

9) Tomiyama T, Umeda T, Eguchi H, Kunori

Y, Matsumoto Y, Taniguchi T, Mori H. Passive immunotherapy of tauopathy targeting pSer413-tau: A pilot study in mice. 7th Clinical Trials on Alzheimer's Disease (CTAD2014), Philadelphia, USA, 2014. 11. 20-22.

10) Umeda T, Tomiyama T, Maekawa S, Kimura T, Takashima A, Mori H. A new mouse model of AD showing neurofibrillary tangles in the absence of tau mutations. 7th Clinical Trials on Alzheimer's Disease (CTAD2014), Philadelphia, USA, 2014. 11. 20-22.

11) 富山貴美.リン酸化タウを標的とするタウオパチーの受動免疫療法. 第33回日本認知症学会, 横浜, 2014. 11. 29-12. 1.

12) 梅田知宙, 富山貴美, 前川智美, 木村哲也, 高島明彦, 森啓. APP-Tgマウスへの野生型ヒトタウの導入による神経原線維変化の形成. 第33回日本認知症学会, 横浜, 2014. 11. 29-12. 1.

13) 本城靖之, 綾木孝, 富山貴美, 堀部智久, 森啓, 伊東秀文, 高橋良輔, 川上浩司. アルツハイマー病におけるGADD34の局在の検討. 第33回日本認知症学会, 横浜, 2014. 11. 29-12. 1.

14) 本城靖之, 綾木孝, 富山貴美, 堀部智久, 森啓, 伊東秀文, 高橋良輔, 川上浩司. アルツハイマー型認知症における抗GADD34抗体による検討. 第55回日本神経学会, 福岡, 2014. 5. 21-24.

15) 森 啓

「神経変性疾患における記憶障害考」第18回日本神経精神医学会（千里ライフサイエンスセンター、2013-12-13）

16) 森 啓

「日本における認知症医療の新展開：オレンジプランを踏まえて」第23回 日本医療薬学会（仙台・東北大学、2013.9.21）

17) 森 啓

「認知症医療の新展開：オレンジプラン施策考察」第46回日本薬剤士会学術大会・特別講演（大阪市・リーガロイヤルホテル、2013.9.22）

18) 森 啓

「認知症の先進医療に必要な診断と戦略」第3回日本認知症予防学会（新潟朱鷺メッセ、2013.9.27）

19) 森 啓

「脳神経外科医が支える認知症医療」第72回日本脳神経外科学会学術総会・特別

講演 (パシフィコ横浜、2013.10.16)

20) 森 啓

「認知症医療施策オレンジプラン2012について」第7回日本薬局学会学術総会・特別講演 (大阪府大阪市) 2013.11.24.

21) Tomiyama T, Umeda T, Yamashita T, Ohnishi K, Takuma H, Mori H. FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. The 11th International Conference On Alzheimer's Disease s AD/PD2013 (Florence,Italy, 2013.3.6-10)

22) Ohshima Y, Tokuda T, Taguchi K, Mizuta I, Watanabe Y, Tomiyama T, Mizuno T, Kametani F, Tanaka M, Mori H, Nakagawa M. Exploring the Common Biochemical Phenotypes of the A β -protein Formation in Cells with Mutants Linked to Familial Alzheimer's Disease. The 11th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases AD/PD2013 (Florence,Italy, 2013.3.6-10)

23) Umeda T, Yamashita T, Tomiyama T, Takuma H, Ohnishi K, Mori H. Neurodegenerative disorder FTDP-17 related tau intron 10 +16C→T mutation increases tau exon 10 splicing and causes tauopathy in transgenic mice. The 17th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. (Osaka Center for Learning and Innovation, Takeda Pharmaceutical Company Limited. 2012.12.6-7)

24) 梅田知宙、山下雄也、富山貴美、詫間浩、大西紀陽久、森啓. Intron変異を有する新規FTDP-17モデルマウスの作製と解析. 第31回日本認知症学会 (筑波国際会議場、2012.10.26-28)

25) 野村幸子、梅田知宙、富山貴美、森啓. APP Osaka (E693 Δ) 変異はA β による細胞内コレステロールの輸送・排出を阻害する. 第31回日本認知症学会学術集会 (筑波国際会議場、2012.10.26-28)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許出願・取得

発明の名称：ノックインマウス

国際出願番号：PCT/JP2014/53555

国際出願日：2014年2月14日

発明者：森 啓、富山 貴美、梅田 知宙、森田 隆、吉田 佳世

出願人：公立大学法人大阪市立大学

発明の名称：認知症治療剤又は予防剤

国際出願番号：PCT/JP2013/065090

国際出願日：2013年5月30日

国際公開番号：WO2013180238 A1

国際公開日：2013年12月5日

発明者：森 啓、富山 貴美、松本 洋一、江口 広志、九里 裕一

出願人：公立大学法人大阪市立大学、帝人ファーマ株式会社

発明の名称：ノックインマウス

出願番号：特許出願2013-26838

出願日：2013年2月14日

発明者：森 啓、富山 貴美、梅田 知宙、森田 隆、吉田 佳世

出願人：公立大学法人大阪市立大学

発明者：森啓・富山貴美・梅田知宙・森田隆・吉田佳世

2. 実用新案登録
なし

3. その他
特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Umeda T, Eguchi H, Kunori Y, Matsumoto Y, Taniguchi T, Mori H, Tomiyama T. Mori & Takami Tomiyama	Passive immunotherapy of tauopathy targeting pSer413-tau: a pilot study in mice	Ann Clin Transl Neurol	2	241-255	2015
Kutoku Y, Ohsawa Y, Kuwano R, Ikeuchi T, Haruhisa Inoue H, Ataka S, Shimada H, Mori H, Sunada Y.	A Second Pedigree with Amyloid-less Familial Alzheimer's Disease Harboring an Identical mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene (E693delta)	Intern Med	54	205-208	2015
Honjo Y, Horibe T, Torisawa A, Ito H, Nakanishi A, Mori H, Komiya T, Takahashi R, Kawakami K.	Protein Disulfide Isomerase P5-Immunopositive Inclusions in Patients with Alzheimer's Disease.	J Alzheimers Dis.	38	601-609	2014
Umeda T, Maekawa S, Kimura T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H.	Neurofibrillary tangle formation by introducing wild-type human tau into APP transgenic mice.	Acta Neuropathol.	127	685-698	2014
Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H.	Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness.	Cell Stem Cell.	12	487-496	2013
Umeda T, Yamashita T, Kimura T, Ohnishi K, Takuma H, Ozeki T, Takashima A, Tomiyama T, Mori H.	Neurodegenerative Disorder FTDP-17-Related Tau Intron 10 +16C \rightarrow T Mutation Increases Tau Exon 10 Splicing and Causes Tauopathy in Transgenic Mice.	Am J Pathol.	183	211-225	2013

Nomura S, Umeda T, Tomiyama T, Mori H.	The E693D (Osaka) Mutation in Amyloid Precursor Protein Potentiates Cholesterol-Mediated Intracellular Amyloid β Toxicity Via Its Impaired Cholesterol Efflux.	J Neurosci Res.	91	1541-1550	2013
Takano M, Yamashita T, Nagano K, Otani M, Maekura K, Kamada H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S.	Proteomic analysis of the hippocampus in Alzheimer's disease model mice by using two-dimensional fluorescence difference in gel electrophoresis.	Neuroscience Letters	534	85-89	2013
Umeda T, Tomiyama T, Kitajima E, Idomoto T, Nomura S, Lambert MP, Klein WL, Mori H.	Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A β oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice.	Life Sciences	91	1169-1176	2012
Takano M, Maekura K, Otani M, Sano K, Nakamura-Hirota T, Tokuyama S, Min KS, Tomiyama T, Mori H, Matsuyama S.	Proteomic analysis of the brain tissues from a transgenic mouse model of amyloid β oligomers.	Neurochemistry International	61	347-355	2012

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

RESEARCH ARTICLE

Passive immunotherapy of tauopathy targeting pSer413-tau: a pilot study in mice

Tomohiro Umeda¹, Hiroshi Eguchi², Yuichi Kunori², Yoichi Matsumoto², Taizo Taniguchi³, Hiroshi Mori¹ & Takami Tomiyama¹

¹Department of Neuroscience, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Teijin Institute for Bio-medical Research, Teijin Pharma Limited, Hino, Japan

³Faculty of Pharmaceutical Sciences, Himeji Dokkyo University, Himeji, Japan

Correspondence

Takami Tomiyama, Department of Neuroscience, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan. Tel: +81-6-6645-3921; Fax: +81-6-6645-3922; E-mail: tomi@med.osaka-cu.ac.jp

Funding Information

This study was supported by funding from Teijin Pharma Limited.

Received: 20 May 2014; Revised: 9 December 2014; Accepted: 11 December 2014

Annals of Clinical and Translational Neurology 2015; 2(3): 241–255

doi: 10.1002/acn3.171

Abstract

Objective: Cellular inclusions of hyperphosphorylated tau are a hallmark of tauopathies, which are neurodegenerative disorders that include Alzheimer's disease (AD). Active and passive immunization against hyperphosphorylated tau has been shown to attenuate phenotypes in model mice. We developed new monoclonal antibodies to hyperphosphorylated tau and sought high therapeutic efficacy for future clinical use. **Methods:** Using more than 20 antibodies, we investigated which sites on tau are phosphorylated early and highly in the tauopathy mouse models tau609 and tau784. These mice display tau hyperphosphorylation, synapse loss, memory impairment at 6 months, and tangle formation and neuronal loss at 15 months. We generated mouse monoclonal antibodies to selected epitopes and examined their effects on memory and tau pathology in aged tau609 and tau784 mice by the Morris water maze and by histological and biochemical analyses. **Results:** Immunohistochemical screening revealed that pSer413 is expressed early and highly. Monoclonal antibodies to pSer413 and to pSer396 (control) were generated. These antibodies specifically recognized pathological tau in AD brains but not normal tau in control brains according to Western blots. Representative anti-pSer413 and anti-pSer396 antibodies were injected intraperitoneally into 10–11- or 14-month-old mice once a week at 0.1 or 1 mg/shot 5 times. The anti-pSer413 antibody significantly improved memory, whereas the anti-pSer396 antibodies showed less effect. The cognitive improvement paralleled a reduction in the levels of tau hyperphosphorylation, tau oligomer accumulation, synapse loss, tangle formation, and neuronal loss. **Interpretation:** These results indicate that pSer413 is a promising target in the treatment of tauopathy.

Introduction

Neuronal and glial inclusions of hyperphosphorylated tau aggregates are hallmarks of tauopathies, which are neurodegenerative disorders that include Alzheimer's disease (AD), Pick's disease, corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, argyrophilic grain disease, and frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17).¹ FTDP-17 is an inherited tauopathy, and a number of exonic and intronic mutations in the tau gene have been identified. Many mouse models of tauopathies have been generated by introducing

the human tau gene with or without mutations.² We previously generated tau transgenic (Tg) mice expressing both three-repeat and four-repeat human tau by inserting tau intronic sequences into both sides of tau exon 10 in the transgene.³ These mice, originally referred to as lines 609 and 784 and hereafter termed tau609 and tau784, dominantly express four-repeat human tau in adult age by the presence of the FTDP-17-related tau intron 10 + 16C → T mutation. They exhibited abnormal tau phosphorylation, synapse loss, and memory impairment at 6 months, and neurofibrillary tangle (NFT) formation and neuronal loss at 24 months. More recently, we found

that these mice start to display NFTs and neuronal loss at 15 months in layer II/III of the entorhinal cortex (EC-II/III) and cingulate cortex.

Active and passive immunization against hyperphosphorylated tau has been shown to attenuate phenotypes in model mice. For example, active immunization with tau partial peptides phosphorylated at Ser396/404,^{4–7} Ser202/Thr205, Thr212/Ser214, Thr231,⁸ or Ser422⁹ decreased the level of hyperphosphorylated tau and rescued motor/cognitive dysfunction. Immunization with human paired helical filaments (PHFs) composed of hyperphosphorylated tau aggregates also reduced NFTs.¹⁰ Meanwhile, some studies cautioned that active tau immunization may cause neuroinflammation in the brain.^{11,12} Thus, passive immunization would seem safer than active immunization, as the former only compensates humoral immunity, whereas the latter activates both humoral and cellular immunity making it difficult to manage adverse effects. Additionally, passive immunization with PHF-1 (anti-pSer396/404) or MC1 (anti-pathological conformation) antibody decreased the level of hyperphosphorylated tau and improved motor function.^{13–15} These passive immunization studies, however, lean to the prevention rather than therapy of tauopathy, as they used young mice before or just after the disease onset. To evaluate clinical efficacy, immunization should be performed in aged mice with overt neuropathology.

For future clinical use in the treatment of tauopathy, we decided to develop new monoclonal antibodies to hyperphosphorylated tau with higher therapeutic efficacy than those of existing anti-tau monoclonal antibodies. To determine the target epitopes, we initially studied which sites on tau are phosphorylated early and highly in our model mice, tau609 and tau784. Immunohistochemical screening with more than 20 commercially available antibodies revealed that Ser413 is such a site. We generated mouse monoclonal antibodies to pSer413 and to pSer396, our control, and compared their effects in aged tau609 and tau784 mice. Our results indicate that pSer413 is a promising target in the treatment of tauopathy.

Materials and Methods

Immunohistochemical screening for target epitopes

Antibodies used in the immunohistochemical screening for target epitopes are listed in Table S1. Brain sections were prepared from tau609, tau784, and non-Tg mice at 6 and 24 months.³ Immunohistochemical staining was performed as described previously³ but the pretreatment of sections under an acidic condition was not performed.

Peptide synthesis

Tau partial peptides used in immunization and antibody screening are listed in Table S2.

Generation of polyclonal antibody

Anti-pSer413 polyclonal antibody was generated by immunizing a rabbit with the pSer413 peptide, as detailed in Data S1.

Generation of monoclonal antibodies

Anti-pSer413 and anti-pSer396/404 monoclonal antibodies were generated by immunizing mice with the corresponding peptides, as detailed in Data S1.

SPR analysis

The binding affinity of monoclonal antibodies was evaluated by surface plasmon resonance (SPR), as detailed in Data S1.

Western blot analysis with AD samples

Brain samples were obtained by autopsy from patients with AD and from nondemented control subjects with informed consent. The samples were processed according to the methods of Berger et al.¹⁶ and subjected to Western blot to study the specificity of the monoclonal antibodies. Details are given in Data S1.

Passive immunization

Passive immunization was performed in male tau609 and tau784 mice. These two lines showed no apparent differences in the levels of tau expression or tauopathy phenotypes. Monoclonal antibodies were diluted in the buffers indicated in the figure legends. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide (LPS) mouse monoclonal antibodies 4C10F4 and 6F11B6 were generated at Teijin Pharma Limited, whereas anti-Shiga like-toxin II (Stx2) mouse monoclonal antibody 11F11 was obtained from ATCC. These antibodies were used as the control. Mice were divided into two groups ($n = 8–10$ each) so that the mean body weights were not significantly different between groups. One group was exposed to anti-pSer413 or anti-pSer396 antibody and the other to the control antibody. Anti-pSer413 (Ta1505) and anti-pSer396 (Ta4) antibodies were injected intraperitoneally into 14-month-old tau784 mice once a week at 1 mg/shot 5 times, whereas another anti-pSer396 antibody (Ta9) was injected into age-matched tau609 mice in the same protocol. In

additional experiments, Ta1505 and Ta9 antibodies were injected into 10–11-month-old tau784 mice once a week at 0.1 mg/shot 5 times. The buffer used for antibody dilution was injected into age-matched non-Tg littermates ($n = 8–10$) as a normal control. Mice were subjected to behavioral tests in the week after the last injection. All animal experiments were approved by the ethics committee of Osaka City University (Osaka, Japan) and were performed in accordance with the Guide for Animal Experimentation, Osaka City University.

Behavioral tests

Spatial reference memory in antibody-treated mice was assessed using the Morris water maze as described previously¹⁷ except for intertrial intervals of 5 min. Locomotor activities of the mice were examined by an open-field test.¹⁷

Histological analysis

After the behavioral tests, antibody-treated mice were divided into two groups: one ($n = 5–6$) for histological analysis and the other ($n = 3–4$) for Western blot analysis. Brain sections were prepared and immunohistochemical and Gallyas silver staining were performed as described previously.³ PHF-1 antibody was a kind gift from Dr. Peter Davies, Albert Einstein College of Medicine, whereas AT8 (Thermo Scientific, Waltham, MA), anti-tau oligomer (T22; EMD Millipore, Temecula, CA),¹⁸ antisynaptophysin (SVP-38; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and anti-NeuN (Chemicon, Temecula, CA) antibodies were purchased. Tau hyperphosphorylation and tau oligomer accumulation were evaluated by quantifying the staining intensities of phospho-tau-positive and T22-positive areas in each photograph of the hippocampal CA2-3 region. Analysis was performed using NIH ImageJ software (National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) on individual sections (3 sections per animal). Synapse loss was assessed by quantifying synaptophysin fluorescence intensities in the apical dendritic-somata field ($30 \times 60 \mu\text{m}$) of the hippocampal CA3 region using NIH ImageJ software (2 sections per animal). The level of NFT formation was determined by counting Gallyas silver positive cells in an area ($220 \times 160 \mu\text{m}$) of the EC-II/III region, whereas neuronal loss was estimated by counting NeuN-positive cells in an area within $1000 \mu\text{m}$ along the EC-II (3 sections per animal).

Western blot analysis

For Western blot analysis, anti-pSer396 antibody-treated brain samples were obtained from 15-month-old mice

($n = 3–4$) after the behavioral tests, whereas anti-pSer413 antibody-treated brain samples were newly prepared by injecting anti-pSer413 and control 11F11 antibodies into 12-month-old tau784 mice ($n = 4$ each) once a week at 1 mg/shot 5 times. The separate preparations were carried out because we had used up anti-pSer413 antibody-treated 15-month-old brain samples in different experiments not shown here. Brain tissues were homogenized and fractionated into Tris buffered saline (TBS)-, sarkosyl-, and GuHCl-soluble fractions as described previously³ with minor modification. That is, sarkosyl-insoluble precipitates were dissolved in four volumes of tissue weight of 4 mol/L GuHCl. After centrifugation, the supernatants were dialyzed against TBS using a Slide-A-Lyzed G2 Dialysis Cassette with 20K cut-off membrane (Thermo Scientific). The TBS-soluble and dialyzed GuHCl-soluble fractions were subjected to Western blot with anti-tau and anti-actin (Sigma-Aldrich) antibodies, as described previously.³ To measure tau oligomers, brain homogenates were centrifuged at $13,000g$ and 4°C for 15 min. The supernatants were collected as total tau extracts. Both TBS-soluble fractions and total tau extracts were subjected to Western blot with human tau-specific Tau12 antibody (Abcam, Cambridge, UK).

Statistical analysis

All data are given as mean \pm SEM. Comparisons of means between two groups were performed using Student's *t*-test, whereas comparisons of means among more than two groups were performed using analysis of variance (ANOVA) or two-factor repeated measures ANOVA (for the behavioral tests), followed by Fisher's protected least significant difference test. Differences with a *P* value of <0.05 were considered significant.

Results

Immunohistochemical screening for target epitopes

In our previous study, both tau609 and tau784 mice began to exhibit abnormal tau phosphorylation in hippocampal mossy fibers from 6 months and in neuronal cell bodies of the hippocampus and cerebral cortex from 18 months,³ suggesting the hippocampal mossy fibers are most susceptible to tau hyperphosphorylation in these mice. Therefore, we focused on this region during immunohistochemical screening for target epitopes. We first examined 24-month-old mouse brains. Of the more than 20 commercially available antibodies, 13 antibodies clearly stained the hippocampal mossy fibers (Table 1). None of the 13 antibodies, except AT100, showed positive staining

Table 1. Expression levels of tau phospho-epitopes in tau694 and tau784 mice.

Antibody	Working conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	24 months			6 months		
		tau609	tau784	non-Tg	tau609	tau784	non-Tg
PHF-1	2000 \times dil.	+++	+++	-	++	++	-
MC1	200 \times dil.	+++	+++	-	++	++	-
AT270	0.1	++	++	-	-	+	-
AT8	5	++	++	-	-	+	-
AT100	5	(++)	(++)	(-)	ND	ND	ND
AT180	5	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer46	0.4	++	++	-	+	++	-
anti-pSer184	1	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer198	0.4	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer199	1000 \times dil.	++	++	-	+	++	-
anti-pThr217	0.4	+	+	-	-	+	-
anti-pThr231	10	++	+	-	+	+	-
anti-pSer235	0.4	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer237	0.4	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer238	0.4	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer262	2	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer356	2	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer400	0.4	++	++	-	+	++	-
anti-pSer409	50 \times dil.	-	-	-	ND	ND	ND
anti-pSer412	0.4	+++	+++	-	+	++	-
anti-pSer413	0.5	+++	++	-	++	++	-
anti-pSer422	50 \times dil.	++	++	-	+	+	-

Brain sections were stained with each antibody at the concentrations/dilutions indicated, and the staining intensity in the hippocampal mossy fibers was judged as +++ (strong), ++ (moderate), + (weak), or - (none). AT100 antibody reacted with the nuclei of neurons in addition to the mossy fibers. ND, not determined.

in 24-month-old non-Tg mouse brains. AT100 antibody reacted with the nuclei of hippocampal pyramidal neurons in both Tg and non-Tg mice. The remaining 12 antibodies were further tested with 6-month-old mouse brains, and eight antibodies showed positive staining in the hippocampal mossy fibers. These include PHF-1 (anti-pSer396/404), MC1 (anti-pathological conformation), anti-pSer46, anti-pSer199, anti-pSer400, anti-pSer412, anti-pSer413, and anti-pSer422 antibodies. According to the intensity of staining, we finally selected pSer413 as a target epitope.

Generation and in vivo evaluation of anti-pSer413 polyclonal antibody

Preliminary to generating monoclonal antibodies, we tested the validity of pSer413 as a target epitope using a polyclonal antibody. Anti-pSer413 polyclonal antibody was injected intraperitoneally into 9–11-month-old tau609 mice once a week at 1 mg/shot 5 times. As the control, phosphate buffered saline (PBS) was injected into age-matched tau609 mice. The antibody significantly improved the memory of Tg mice to the same level as that of non-Tg littermates (Fig. S1). Thus,

pSer413 was shown to be a good target for passive immunotherapy.

Generation of anti-pSer413 and anti-pSer396 monoclonal antibodies

We established at least seven clones of hybridomas producing anti-pSer413 antibody and 10 clones producing anti-pSer396/404 antibody. We tested the specificity of the seven anti-pSer413 antibodies by ELISA. All antibodies showed a strong reactivity to the pSer413 peptide and no reactivity to peptides phosphorylated at other sites (Table S3). We also examined the exact epitope of the 10 anti-pSer396/404 antibodies by ELISA. Six antibodies preferentially reacted with the pSer396 peptide, whereas the others reacted with the pSer404 peptide (Table S4). We chose anti-pSer396 antibodies as control, because two representative anti-pSer396 antibodies (Ta4 and Ta9) showed higher immunoreactivity than an anti-pSer404 antibody (Ta115) in immunohistochemistry using our mouse brain sections (data not shown). Then we compared the binding affinity of the seven anti-pSer413 and two representative anti-pSer396 antibodies by SPR. Of the anti-pSer413 antibodies tested, Ta1505 showed the highest