

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	藤井 裕樹
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
<p>論文題目  <b>Modifications of tau protein after cerebral ischemia and reperfusion in rats are similar to those occurring in Alzheimer's disease –Hyperphosphorylation and cleavage of 4- and 3-repeat tau</b>          (ラット脳虚血再灌流後のタウ蛋白の修飾は、アルツハイマー病における修飾に類似する—3リピートタウと4リピートタウの過剰リン酸化と切断について)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主査 教授 今泉 和則 印</p> <p>審査委員 教授 山脇 成人</p> <p>審査委員 准教授 井川 房夫</p>			
<p>〔論文審査の結果の要旨〕</p> <p>神経変性疾患では、疾患毎に異なった特定の蛋白質が神経細胞あるいはグリア細胞内に蓄積することが発症に関与していると考えられている。微小管制御因子であるタウの蓄積が発症要因となる一連の疾患群はタウオパチーと総称される。タウは微小管に結合し、神経の形態形成・可塑性・極性に関与する。タウオパチーにおいて、進行性核上性麻痺や大脳皮質基底核変性症では 4-repeat tau(4R)が優位に沈着し、Pick 病では 3-repeat tau(3R)が主に沈着する。一方、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) ではタウの両アイソフォームが沈着して神経原線維変化(neurofibrillary tangle; NFT)を構成する。脳血管障害とタウオパチーとの関連に関しては、特に、脳梗塞の既往や無症候性脳梗塞の存在がアルツハイマー病の罹患率を増加させるとの報告があり、また脳血管障害がアルツハイマー病の増悪因子とも見做されている。さらに加齢、高血圧、2型糖尿病、喫煙、APOE 遺伝子多型など、両疾患には共通するリスクファクターが報告されている。一方で両疾患の病理学的・生化学的変化を対比した研究報告は極めて少ない。</p> <p>AD ではタウは過剰にリン酸化され、また切断や立体構造の変化を受けて重合化し、paired helical filament (PHF)を経て、最終的に NFT を形成する。この過程においてタウの切断が、タウの他の変化よりも先行し、比較的早期に起こるとの報告がある。一方、動物実験モデルを用いた脳虚血におけるタウの修飾に関する報告は、リン酸化状態に関するものに限られているのみならず、リン酸化状態そのものについても一定の見解が得られていない。本研究では脳虚血をタウオパチーの一種として位置付けるべく、ラット脳虚血再灌流モデルを対象として、タウの病理学的・生化学的変化について AD との対比において検討した。</p> <p>6 週齢の Wistar 雄ラットを用い、中大脳動脈虚血再灌流モデルを作成した。小</p>			

泉変法に従って、ハロタン麻酔下で血管内栓子法にて虚血導入 90 分後に再灌流し 6、12、24、48、72 時間後(各 n=4~7)に脳サンプルを採取した。いわゆる total-tau 抗体である Ab-2 抗体、4R を特異的に認識する RD4 抗体、3R を特異的に認識する RD3 抗体、リン酸化した PHF タウを認識する AT8 抗体、421 番目のアスパラギン酸で切断されたタウを認識する TauC3 抗体、および軸索のマーカーである SMI312 抗体を用い、免疫組織学的検討および Western Blot 法(WB)で評価した。

Ab-2 抗体の WB では、全長タウが再灌流 24 時間以降で減少し、48 時間以降で切断タウと思われる 25kDa のバンドが出現した。TauC3 抗体の WB では、Asp<sup>421</sup> で切断された 60kDa のタウの発現が 24 時間以降増加し、この変化は 48 時間以降に発現した 25kDa の 4R フラグメントおよび 17kDa の 3R フラグメントよりも先行した。Phos-tag を用いた Ab-2 抗体の WB では、24 時間以降でリン酸化タウの発現が増加した。48 時間以降でリン酸化 4R および 3R の発現も増加した。また AT8 抗体で認識されるリン酸化 PHF タウの発現も増加した。Ab-2 抗体の免疫染色では、虚血中心部および周辺部で neuropil から核周囲へのタウの再分布が示唆され、核周囲で Ab-2 陽性の顆粒状構造物の数が有意に増加した。蛍光二重染色により、Ab-2 陽性の細胞は NeuN 陽性、GFAP 陰性であり、タウの凝集物は神経細胞に局在することが明らかとなった。免疫染色では、虚血側で RD3、RD4 のいずれも核周囲における染色性が亢進した。RD3、RD4 の蛍光二重染色を行い、健側では両者が均一に局在するが、虚血中心部および周辺部では RD3 優位、RD4 優位、あるいは両者が共局在する顆粒状構造物が混在していた。Ab-2 抗体と AT8 抗体の蛍光二重染色では、虚血中心部および周辺部で単一神経細胞当たりの核周囲における AT8 陽性顆粒の数が有意に増加した。SMI312 の蛍光染色で虚血周辺部において varicosity が有意に増加していた。ガリアス染色では虚血領域で嗜銀性が示された。

本研究により脳虚血再灌流後、4R および 3R のいずれもリン酸化・切断による修飾を受け、神経細胞の核周囲に沈着することが示された。これらの所見から、虚血再灌流後のタウの修飾、蓄積様式は AD と類似していることが判明した。更に、虚血周辺部において有意に varicosity が増加したが、これは脳虚血再灌流によるタウのリン酸化を含む修飾により微小管への結合能が低下し、タウの分布が変化するとともに、微小管の不安定化により軸索輸送が障害されたことによるものと考えられた。

本研究は、タウオパチーの観点から脳虚血再灌流障害を包括的に検討し、虚血中心部及び周辺部で 4R および 3R のリン酸化と Asp<sup>421</sup> サイトでのタウの切断を初めて明らかにした報告である。今回の研究成果から、脳梗塞再灌流モデルがアルツハイマー病の発症および進行の病態解明の一翼を担う可能性が示された。よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。