

論文内容要旨

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

(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)

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, in press.

主指導教員：木原 康樹教授
(応用生命科学部門 循環器内科学)

副指導教員：酒井 規雄教授
(基礎生命科学部門 神経薬理学)

副指導教員：丸山 博文准教授
(応用生命科学部門 脳神経内科学)

藤井 裕樹

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

【目的】脳梗塞とアルツハイマー病(AD)はいずれも高齢者に好発する頻度の高い神経疾患である。かつて脳血管性認知症とADは、脳血管障害と変性疾患という病態の違いから、認知症疾患の両極に位置する病態と見做されていた。しかし、脳梗塞とADに共通する疫学的エビデンスが集積しつつあり、また加齢、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変化を対比した研究報告は極めて少ない。ADは、過剰リン酸化タウの細胞内蓄積によって構成される神経原線維変化(neurofibrillary tangle; NFT)と β アミロイド($A\beta$)の細胞外沈着により構成される老人斑を特徴とする疾患であるが、 $A\beta$ の沈着よりもNFTの沈着の方が、記憶障害や神経細胞傷害とのより強い相関がみられる。タウ蛋白は微小管に結合し、神経の形態形成・可塑性・極性に関与する。タウの蓄積を伴う神経変性疾患であ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が有意に沈着し、Pick病では3-repeat tauが主に沈着する。一方、ADでは3-repeat、4-repeat両方のタウがNFTを構成する。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などの修飾を受けて重合化し、paired helical filament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、タウのリン酸化・構造変化・凝集よりも先行し、比較的早期に起こるとの報告がある。しかし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報告がほとんどであり、しかも虚血侵襲によるタウの脱リン酸化あるいは過剰なリン酸化のいずれの報告もされており一定の見解が得られていない。またタウの切断やタウ isoformに関してはほとんど報告されていない。今回我々はラット脳虚血再灌流モデルを対象としてタウ修飾についての包括的な検討を通じて脳虚血とADの病理学的な相関について検討した。

【方法】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=3~5)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、3-repeat tauを特異的に認識するRD3抗体、4-repeat tauを特異的に認識するRD4抗体、リン酸化したPHF-tau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。

【結果】Ab-2のWBで、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Ab-2 fragmentが出現した。TauC3のWBで60kDaの切断タウの発現が24時間以降増加し、その変化は48時間以降に発現した25kDaのRD4 fragment、17kDaのRD3 fragmentよりも先行していた。Phos-tagを用いたリン酸化体の分離により、24時間以降でリン酸化Ab-2の増加が明らかになった。48時間以降でリン酸化RD3およびRD4が増加し、AT8の発現も増加した。Ab-2の免疫染色では、虚血中心部および周辺部でneuropilから核周部へのタウの再分布が示唆され、核周部でAb-2陽性の顆粒状構造物の数が有意に増加した。RD3、RD4の蛍光二重染色を行い、対側では均一に共局在するが、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。Pearson相関係数で共局在を検討したところ、

虚血中心部および周辺部で RD3 と RD4 が共局在する比率が有意に低下した。Ab-2 と AT8 の蛍光二重染色では、虚血周辺部で Ab-2 陽性細胞の一部が AT8 陽性であった。SMI312 の蛍光染色で虚血周辺部において varicosity の発現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。

【結論】タウオパチーにおいて、過剰リン酸化タウの isoform の違いと、疾患特異的な関連が示唆されている。今回の検討により脳虚血再灌流により、3-repeat tau、4-repeat tau のいずれもリン酸化・切断による修飾を受けることを初めて示した。すわなちタウの修飾、蓄積様式において虚血再灌流後の変化は AD と類似していた。タウのリン酸化部位は微小管結合領域近傍に多く、タウのリン酸化は微小管へのタウの結合能低下をまねくとされている。今回の検討で、虚血周辺部において有意に varicosity の発現が増加したが、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る軸索輸送の障害により axonal varicosity が形成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ており、貴重と考える。また脳は系統発生最終段階にあり、動物実験結果をそのままヒトに外挿することはできないものの、今回の検討により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を示したと考える。