

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430052

研究課題名(和文) グリア細胞のタウ病理からタウオパチーの病態にせまる

研究課題名(英文) Globular glial tauopathy: investigation of the pathological features

研究代表者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA, Yasuko)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：20334675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：認知症や運動ニューロン疾患を呈する症例の中には、神経細胞やグリア細胞の中にタウ蛋白が蓄積する病気があり、タウオパチーと呼ばれている。近年、運動ニューロン症状を呈する新しいタウオパチーの疾患概念が提唱された。その疾患はグリア細胞内に球状の構造を認めることからglobular glial tauopathy (GGT) と呼ばれている。我々はGGTの封入体には分子が小さく毒性が高いタウオリゴマーが多いことを見出した。タウオパチーでは疾患ごとにタウの分子(モノマーやオリゴマー等)の形態や含まれる量がちがいで、そのことがそれぞれの疾患で見られる封入体の形態の違いに反映されていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)： We examined the brains of GGT-type III, using an anti-tau oligomer-specific polyclonal antibody, T22 and anti-phosphorylated tau antibody, AT8. Predominant occurrence of GAls was also confirmed with AT8 and T22. We consider that GGT are different from other 4R tauopathies not only in their pathological picture but also in their constituent tau species. It is tempting to speculate that GAls represent a distinct, 4R tau-oligomer astrocytopathy that characterizes GGT. We also performed a pathological and clinical investigation in 40 consecutive autopsied patients with pathological diagnoses of PSP-related disease. Unequivocal TAs were present in 22 cases, all of which were confirmed to be PSP. Such TAs were hardly observed in the other 18 cases. Cluster analysis of the distribution pattern of tau-related pathology for these 18 cases identified two subgroups, pallido-nigro-luysian atrophy (PNLA) Type 1 (n = 9) and Type 2 (n = 9).

研究分野：神経病理学

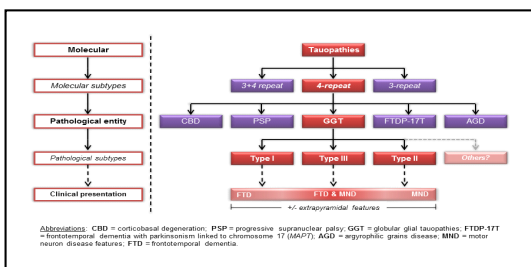
キーワード：タウオパチー アストロサイト globular glial tauopathy オリゴマー 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、アルツハイマー病を代表とする認知症の原因となるもので、そのほとんどが原因不明である。神経病理学的に患者脳を検索すると、神経細胞内やグリア細胞（アストロサイトやオリゴデンドロサイト）内に異常蛋白質の凝集・蓄積をみることが多い。そのなかで、細胞の骨格をつくる上で重要な働きをするタウ蛋白の異常蓄積を伴う疾患をタウオパチー (tauopathy) と呼ぶ。タウオパチーには進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD)、嗜銀顆粒性認知症 (AGD)などが含まれ、それぞれ特徴的な変性の分布やアストロサイトのタウ病理によって病理組織学的に診断されてきた。しかし、多数の症例の中には、PSPとCBDの両方の特徴を持ち合わせるもの²⁾、これらのいずれにも属さないもの³⁾などがあり、それぞれ症例報告がされてきた。近年 Ahmed ら¹⁾は、臨床的に前頭-側頭型認知症や上位・下位運動ニューロン症状を呈し、タウ蛋白が蓄積したアストロサイトやオリゴデンドロサイトの胞体が球状 (globular)の形態をとる疾患を globular glial tauopathy (GGT)としてまとめ、新しいタウオパチーの疾患概念を提唱した(図1)。自験例³⁾もこの報告の中に含まれている。

我々は、臨床的に孤発性 amyotrophic lateral sclerosis (ALS)の経過中に認知症をともなった症例で、GGTと考えられる症例を新しく経験した。この症例は運動野の変性が極めて強く、アストロサイト優位にタウ蛋白の異常蓄積が観察された。その形態はPSPでみられる tuft-shaped astrocyte (TA) や、CBDで観察される astrocytic plaque (AP)とは明らかに異なっていた。このような形態の違いは何によって規定されるのか、また、蓄積するタウ蛋白の性状に違いがあるのかなどについての検討が待たれていた。

図1 GGT の分類



2. 研究の目的

GGTは臨床病理学的に運動ニューロン疾患の鑑別に挙げられ、興味深い所見を呈すると共に、神経変性疾患におけるグリア細胞の影響を考える上で重要な位置づけにある。世界的に症例報告は多くなく、この新しい疾患概念にあてはまる自験例を病理組織学的、生化学的に検討し、グリア細胞に蓄積するタウ蛋白の特性、およびそのグリア内異常蓄積に

より、どのようなメカニズムで神経細胞組織が障害されるようになるのかを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 非典型的タウオパチーの病理組織学的検討、GGTのピックアップ：臨床的にALSを呈した自験例、既報のGGT例³⁾に加えて、当教室で atypical tauopathy、あるいは atypical Alzheimer disease (AD) などと診断されている症例を再度検討し、GGT症例のピックアップを進める。それらの症例について、臨床情報を確認するとともにアストロサイトやオリゴデンドロサイトの形態を詳細に調べ、Ahmed らの報告に準じて分類する。GGTではタウ遺伝子に変異をもつものが少なくないため、倫理委員会の承認を得た上で凍結脳組織よりDNAを抽出し、タウ遺伝子について変異の有無を検討する。

(2) アストロサイトに蓄積しているタウ蛋白の特性の解析：これまでGGTとして報告された症例の生化学的検討では、蓄積するものは4リピートタウで、C末側の分断化された低分子のタウ蛋白のWestern blotting (WB)ではいずれもPSPパターンのバンドを呈していた。これについて再検討し、1)でピックアップした症例についても検討する。ここでCBD類似の生化学的性質を呈した症例を報告することで、GGTに属する疾患のさらなる多様性を示す。

GGT症例で認められるタウ蓄積アストロサイトは、PSPやCBDで認められるTAやAPと異なり、嗜銀性に乏しいことが特徴的である¹⁾(図2)。タウのオリゴマーについてはこれまであまり報告はないが、AD症例の神経細胞で、NFTの形成前のいわゆるpretangleとよばれる構造物中にオリゴマーが存在することが報告されている。Pretangleはタウの免疫染色でglobularな染色性を呈し、嗜銀性に乏しいことがわかっており、GGTのグリア内に認められる封入体と類似している。このことから、GGTの封入体では、4-リピートタウのオリゴマーなど特異な物質が、強固な線維束を形成することなく存在する可能性がある。この蓄積しているタウの特性を調べるため、次の2つの実験を行う。

サルコシル可溶性画分の高分子のタウを、変性もしくは非変性条件下で、抗タウ抗体を用い免疫プロットをする。

GGTのアストロサイトに蓄積した封入体の超微細構造を電子顕微鏡で観察し、その特徴を検討する。

(3) 強い嗜銀性をもつアストロサイトを有するタウオパチー (pallido-nigral-luysian atrophy: PNLA) について、PSPとの臨床病理学的異同を検討し報告する。また同様に(2)に示した実験を行い、GGTとの違いについて明らかにする。

これらのことでアストロサイトに蓄積するタウの特性が明らかになった時点でそれぞれ報告する。

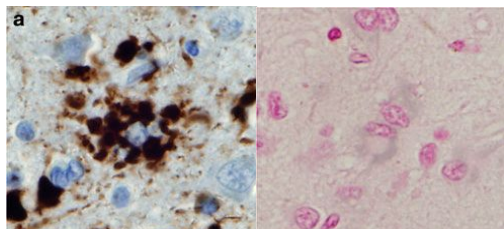


図2 GGTにおけるタウ蓄積アストロサイト既報の自験例。アストロサイトの胞体は顆粒状にタウ陽性。しかし、右のGallyas-Braak染色(渡銀法)では胞体が淡く染まるのみで、嗜銀性に乏しい。

4. 研究成果

(1) 新たな症例の追加。平成26年度に新たに1症例のGGT症例を経験した。さらに、これまで診断がつかなかったタウオパチーのうち、1症例がGGTに該当することを見出した。これらの症例はいずれもパーキンソン病と運動ニューロン症状を呈し、臨床的に特徴を有していた。Ahmedら¹⁾の分類した病型では、タイプ2のものがみられた。タイプ2は、以前我々が報告したタイプ3とは異なり、主としてタウの蓄積するグリア細胞がオリゴデンドロサイトであること、大脳皮質よりも、白質でタウの蓄積が多く認められること、神経細胞の胞体内にもタウの蓄積が認められるが、その構造や染色性が異なること、などがわかった。これらについて現在論文製作中である。

(2) Lasagna-Reevesら⁴⁾はタウオリゴマーに対する抗体をつくり、アルツハイマー病脳で、神経細胞のpretangle(神経原線維性変化の前段階)に多く含まれることを報告しており、リン酸化タウ抗体のAT8陽性、鍍銀染色のGallyas-Braak法陰性というpretangleに似た染色性をもつGGTの構造物はタウオリゴマーが多く含まれている可能性がある。このことを検討するため、孤発性GGT4例いずれもタイプ3、コントロールとしてPSP、CBD、ADを用い、リン酸化タウ抗体、AT8とAT100、タウオリゴマー抗体T22による免疫染色と、AT8を用いた免疫電顕での超微細構造観察、脳組織から抽出したタンパクPBS可溶分画のWBを行った。

免疫染色。タウオリゴマーに対する抗体T22で、GGT症例では多くの染色像を認めた。とくに、運動野の皮質では、通常のAT8で見られるものとほぼ同様の形態をしめし、豊富に含まれる像が認められた。一方同じ運動野の白質では、オリゴ内の封入体は皮質のものよりもT22の染色性が薄く、皮質で多数みら

れる神経やアストロサイトの染色像と異なる状態を示していた。T22とAT8の二重染色を行ったところ、両者が陽性になるアストロサイトが多数あり、細胞によってはT22の含有量が多いものが認められ、Betzの巨大神経細胞でも共局在が認められた(図3)。

212番目のスレオニンと214番目のセリンのリン酸化を認識するAT100で染色したところ、GGT症例ではAT8と同様の染色像を認めましたが、PSPやCBDではAT8に比べて染色性が劣り、蓄積するタウのリン酸化部位に違いがあることが示唆された。AT8による免疫電顕では、GGTのアストロサイトの胞体には明らかな陽性像はなく、その突起内に比較的太いAT8陽性線維の集積像が認められた。包埋後反応法による二重免疫電顕では、GFAP陽性のグリア線維の近傍にAT8陽性の線維が束を形成している像が認められた。このような構造物は非常に少なく、アストロサイトの胞体内でのタウによる強固な構造物の形成傾向は弱いものと考えられた。

GGT症例の凍結保存脳組織からタンパクを抽出し、PBS可溶分画においてWestern blottingをおこなったところ、GGT症例では他の疾患に比べてタウのトリマー(trimer)が多く含まれる可能性を見出した。

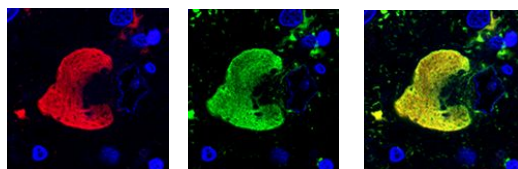


図3 GGT症例の運動野の蛍光二重免疫。Betzの巨大神経細胞の胞体で、タウオリゴマー(赤)とリン酸化タウ(緑)が共局在する(黄)。左T22、中央AT8、右merge

(3) PSP類似疾患のなかで、淡蒼球、黒質、視床下核に強い変性を示し、運動野皮質や橋核などに病変が広がらない一群があることが知られており、pallido-nigro-luysian atrophy (PNLA)と称されている。この群はPSPに臨床病理学的によく似た点があるが、そのタウ陽性アストロサイトの形態が異なり、それをもとにPSPと区別が可能ではないかと思ひ、PSP関連疾患と病理診断された連続剖検例PSP関連疾患40剖検例(含PSP, atypical PSP, PNLA etc.)を対象として以下について検討した。

タウ陽性アストロサイトの形態学的観察

- 1) リン酸化タウ抗体(AT8)免疫染色、Gallyas Braak染色(G-B)
- 2) 三次元構造解析
- 3) 超微細構造解析

タウ陽性アストロサイトの形態により2群に分類

eTA群18例のタウ病変分布によるクラスター解析

病理組織学的所見解析 (神経細胞脱落およびタウ病変についての組織学的半定量解析)

臨床データ解析 (両群の臨床経過を後方視的に解析)
結果

(1) タウ関連病理に関して、まず 2 種類のタウ陽性アストロサイト (TA と eTA) を同定した。TA (図 4 A, C) と比較して、eTA は、形態が不規則で核近傍に短く太い突起様にタウの蓄積が観察された (図 4 B, D)。GB 銀染色によるアストロサイトの病理組織像により、40 例を 2 群に分類し、それぞれ TA 群 (n=22, 男 13/女 9) と eTA 群 (n=18, 男 8/女 10) とした。

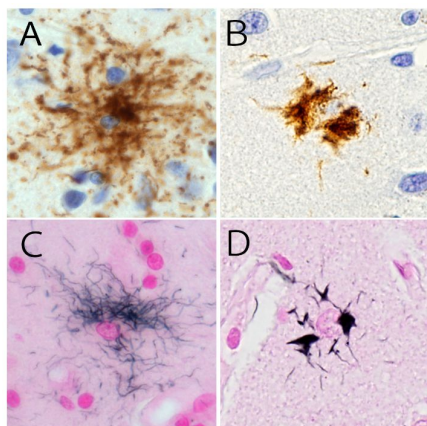


図 4. TA (A, C) と eTA (B, D)
A, B: AT-8 免疫染色 C, D: Gallyas-Braak 染色

AT8 陽性 TA は、細長い放射状の突起様構造を示し、eTA は、短く太い構造を示した。IMARIS を用いて同一サイズのボクセル内で測定した。AT8 陽性構造物の比較では、TA が eTA より有意に大きく、それを構成する粒子の大きさが小さく数が多いという結果を得た (図 5)。

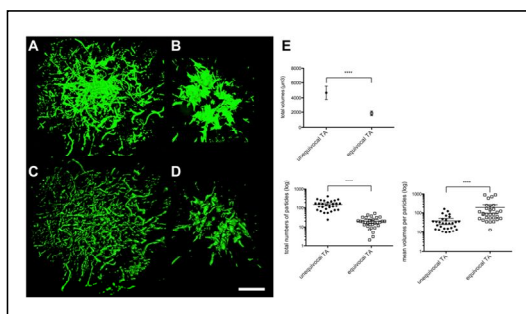


図 5. TA (A, C) と eTA (B, D) の比較で、大きさ (E 上段) と構成する粒子の数 (E 下段左) と大きさ (E 下段右) に有意差が認められる

包埋前免疫法を用いた免疫電子顕微鏡像では、TA 群では AT8 陽性構造が核から遠位に伸びる細長い突起として観察された。一方 eTA 群では AT8 陽性構造が核近傍に集中していた。電子顕微鏡強拡大像では、両群で約 10-13 nm 径の細管構造 (straight tubules) から成る繊維束が認められた

2. 3. TA 群は 22 例、eTA 群は 18 例であった。eTA 群 18 例は全体にタウ病理の程度が軽いという特徴があり、その中には病変が PNL に限局する症例と、PNL を超えて病変が広がっている症例があることがわかった。タウ病変分布によりクラスター解析を行った結果、運動野、橋核、小脳歯状核などのタウ病理の強さによって、18 例の eTA 群が 9 例ずつの 2 群に分類された。本研究では、この 2 群を PNLA type1、type2 とした。

(2) TA 群は eTA 群に比べ運動野、中脳被蓋、橋核、小脳歯状核の神経細胞脱落とタウ関連病理の程度が強かった一方、淡蒼球・黒質・視床下核 (PNL) では、神経細胞脱落の程度が PNLA type1、2 群が PSP 群より強かった。既報で PNLA の特徴とされているスフェロイドの出現は各群で差を認めなかった

(3) 発症後 2 年以内の認知機能障害は、TA 群で有意に多くみられた ($p < 0.05$)。開眼失行を含む開眼困難は PNLA type1 群に優位に多く認められた ($p < 0.05$)。統計学的有意差を認めなかったものの、PSP の古典的症状である垂直方向眼球運動制限、転倒、姿勢反射障害、寡動は初期の段階で TA 群に多い傾向があった。一方で、振戦とすくみ足は全経過中で eTA 群に多い傾向があった。図 6 に示すように、発症から歩行不能 (車イス) になるまでの生存期間中央値は PNLA type 1 群で有意に長かった ($p < 0.05$)。PNLA の臨床的特徴とされる表現形である純粋無動症 (または predominantly akinesia) は、eTA 群のみで認められた。

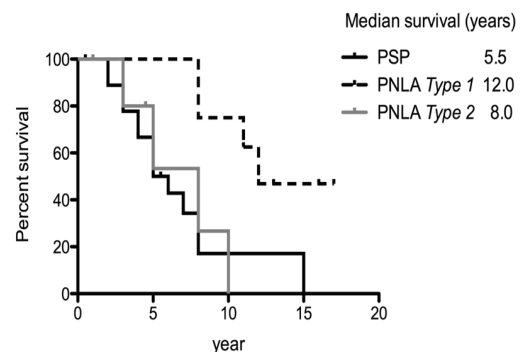


図 6. 発症から車イスになるまでの時間は PNLA type1 が有意に長い

(4) 脱リン酸化後の画分では、TA 群 (PSP 群)、eTA 群 (PNLA type 1, type2) とともに CBD と共通の 4R を示すバンドを認めた。脱リン酸化未処理の画分では、CBD では 37kDa のバ

ンドパターンを示したのに対し、TA 群 と eTA 群の低分子量 C 末断片化は 33kDa の従来 の PSP バンドパターンを示した。

(5) 若年発症を認めた 2 症例で MAPT 変異を 検索したが、異常は認められなかった。

(6) GGT 症例と同じようにタウオリゴマー 抗体で免疫染色を行ったが、この疾患でみら れる封入体は明らかな染色性を認めなかつ た。形態は GGT でみられるアストロサイトと 似ているが、構成するタウにはちがいがあ ることがわかった。

我々の研究では PNLA type1 の運動機能が他 の群に比べて有意に末期まで保たれること が示されたが、診察上開眼困難を認めるよう な症例は機能予後が比較的良好と患者本人 や家族に説明することが可能かもしれない。 米国の報告では、400 例以上の PSP 剖検例で 8 例 (<2.0%) のみが PSP-PNLA と診断され たのに対し、本研究では 40 例の PSP と PSP 関 連疾患の連続剖検例に、18 例の eTA 群 (PSP-PNLA) が含まれており、疾患頻度が 大きく異なっていた。本研究に用いた剖検例 に臨床診断困難例(初期に PSP と診断され にくい症例)が多く含まれているというバイ アスはあるものの、本研究の結果と元々 PNLA の報告が本邦から多くなされてきたと いう事実をふまえると、コーカサス人種と 異なる人種的背景を持つ日本人において、 PSP-PNLA と関連する何らかのリスクファク ターが存在している可能性が高いと推察さ れる。

不溶性タウのイムノプロットでは、TA 群 (PSP 群)と eTA 群 のいずれにおいても 4R タウが確認された。さらに脱リン酸化処理前 の不溶画分のイムノプロットでは 33-kDa の 断片を認め、PSP と PNLA で共通の生化学的 特徴が示された。Mori らは PNLA のイムノプロ ット解析の結果、PNLA が PSP や CBD と同 様の 4R タウオパチーであることを報告した が、我々の知る限り、これまで PNLA の症 例で PSP の生化学的特徴が明確に示された ことはなく、重要な所見と考える。 これらの所見をまとめ、専門誌に報告した。

[引用文献]

- 1) Ahmed Z, Bigio EH, Budka H. et al. Globular glial tauopathies (GGT): consensus recommendations Acta Neuropathol 2013 126(4):537-44
- 2) Tan CF, Piao YS, Kakita A. et al. Frontotemporal dementia with co-occurrence of astrocytic plaques and tufted astrocytes, and severe degeneration of the cerebral white matter: a variant of corticobasal degeneration? Acta Neuropathol 2005 109:329-38
- 3) Fu YJ, Nishihira Y, Kuroda S et al. Sporadic four-repeat tauopathy with frontotemporal lobar degeneration,

Parkinsonism, and motor neuron disease: a distinct clinicopathological and biochemical disease entity Acta Neuropathol 2010 120:21-32

4) Lasagna-Reeves CA, Castillo-Carranza DL et al. Identification of oligomers at early stages of tau aggregation in Alzheimer's disease. FASEB J 2012 26(5):1946-59

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1) Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Tanaka H, Shimizu H, Shiga A, Miura T, Aoki K, Aikawa A, Ishizawa S, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. Brain Pathol(査読有) 2016 26(1):82-94

2) Yokoyama Y, Toyoshima Y, Shiga A, Tada M, Kitamura H, Hasegawa K, Onodera O, Ikeuchi T, Someya T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Brain Pathol(査読有) 2016 26(2):155-66

3) 豊島靖子, 高橋均. 「臨床医のための神経病理 Globular glial tauopathy(GGT)」 Clinical Neuroscience (査読なし)2016 34(11):190-1191

4) 豊島靖子, 横山裕一, 高橋均. 「臨床医のための神経病理 Pallido-nigro-luysial atrophy」 Clinical Neuroscience (査読なし) 2014 32(11):1210-1211

[学会発表](計 11 件)

1) Tanaka H, Toyoshima Y, Tada M, Shimizu H, Miura T, Ikeuchi T, Takahashi H, Kakita A. Globular glial tauopathy: characteristic histologic features of an autopsied patient with its type II. The 10th Congress of Asia Pacific International Academy of Pathology. April 24-27, 2017 (Bali, Indonesia)

2) Tanaka H, Toyoshima Y, Tada M, Shimizu H, Ikeuchi T, Nishizawa M, Takahashi H, Kakita A. Immunohistochemical features of GGT revealed using a tau oligomer-specific antibody. 11th European Congress of Neuropathology. July 6-9, 2016 (Bordeaux, France)

3) 田中英智, 豊島靖子, 三浦健, 池内健, 川勝忍, 高橋均, 柿田明美. Globular glial tauopathy type II: 運動ニューロン徴候と不随意運動を示した一剖検例の臨床病理像 第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会. 2016. 6月1日-3日(青森県 弘前市)

4) Takeuchi R, Toyoshima Y, Tada M, Shiga

A, Miura T, Aoki K, Ikeuchi T, Nishizawa M, Kakita A, Takahashi H. Globular glial mixed four repeat tau and TDP-43 proteinopathy with motor neuron disease and frontotemporal dementia. The 26th International Symposium on ALS/MND. December 11-13, 2015 (Orlando, USA)

5) Tanaka H, Toyoshima Y, Miura T, Tada M, Shimizu H, Shiga A, Ikeuchi T, Kakita A, Takahashi H. Globular glial tauopathy (type II) clinically mimicking ALS. The 26th International Symposium on ALS/MND. December 11-13, 2015 (Orlando, USA)

6) Toyoshima Y, Tanaka H, Takeuchi R, Shimizu H, Tada M, Shiga A, Yokota O, Kuroda S, Ikeuchi T, Kakita A, Takahashi H. Tau oligomer accumulation in patients with globular glial tauopathies-type III. The 26th International Symposium on ALS/MND. December 11-13, 2015 (Orlando, USA)

7) 田中英智、豊島靖子、竹内亮子、柿田明美、高橋均。特異抗体 (T22) を用いた進行性核上性麻痺におけるタウオリゴマーの病的意義についての検討。第 56 回日本神経病理学会総会学術研究会。2015. 6月3日-5日 (福岡県 福岡市)

8) 豊島靖子、竹内亮子、田中英智、他田真理、清水宏、池内健、柿田明美、高橋均。Globular glial tauopathy: 蓄積タウの特徴。第 56 回日本神経病理学会総会学術研究会。2015. 6月3日-5日 (福岡県 福岡市)

9) 横山裕一、豊島靖子、志賀篤、池内健、長谷川一子、西澤正豊、染矢俊幸、柿田明美、高橋均。Astrocyte におけるタウの蓄積像に着目した PSP 関連タウオパチーの連続性について。第 33 回日本認知症学会学術集会。2014年11月29日-12月1日 (神奈川県 横浜市)

10) 竹内亮子、豊島靖子、三浦健、青木賢樹、柿田明美、高橋均。臨床的に ALS-D と診断され、特異な病理組織学的所見を呈した Globular glial tauopathy の 1 例。第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会。2014.6月5日-7日 (東京都 千代田区)

11) 横山裕一、豊島靖子、志賀篤、池内健、長谷川一子、柿田明美、高橋均。Astrocyte のタウ病理に注目した PSP 関連タウオパチーの連続性について。第 55 回日本神経病理学会総会学術研究会。2014. 6月5日-7日 (東京都 千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊島 靖子 (TOYOSHIMA, Yasuko)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：20334675

(2) 研究分担者

池内 健 (IKEUCHI, Takeshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：20372469

他田 真理 (TADA, Mari)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：30646394

高橋 均 (TAKAHASHI, Hitoshi)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：90206839

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()