

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640030

研究課題名(和文) ほ乳類脳を用いた チューブリンアセチル化におけるタウオパチー発症への影響

研究課題名(英文) Effects of tubulin acetylation on tauopathy in brain

## 研究代表者

久保 厚子 (Kubo, Atsuko)

同志社大学・生命医科学部・特別研究員

研究者番号：70647792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病患者(AD)の脳では、過剰にリン酸化された微小管結合タンパク質“タウ”の神経細胞内沈着、封入体形成(NFTs)が観察され、タウオパチーと総称されている。タウは通常微小管の安定化に寄与するとされているが、AD脳では細胞体への異常局在とともに微小管の消失が認められている。本研究では、タウ病態形成の発生機序を明らかにするために、まず内在性正常タウの検出法を構築し、マウス脳内における正常タウの局在を明らかにした。さらにトランスジェニックマウスに発現する外来性ヒト型タウのみが局在異常を起こしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tau, a microtubule-associated protein, is the major component of neurofibrillary tangles (NFTs) in Alzheimer's disease (AD) and related disorders called tauopathies. Tau is localized in neuronal axons and stabilizes microtubules in physiological conditions. In AD, Tau miss-localized into the somatodendritic compartment and microtubules are destabilized. To determine how the pathogenesis of tauopathy occurs, we investigated the detailed localization of physiological tau in mouse brain by new immunohistochemical technique that we developed. We further found that the abnormal distribution of exogenous tau expression appeared only in the tau transgenic mice.

研究分野：総合生物

キーワード：タウ タウオパチー 微小管 アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) タウオパチーの背景について

超高齢化社会の突入によりアルツハイマー病 (AD) を含む認知症患者が急増している。しかし、認知症の根本的な治療法は確立されておらず、患者家族の負担や介護費用の増大など社会的問題になっている。

AD を含む多くの認知症の病理学的所見の一つとして、神経細胞内に異常にリン酸化した微小管結合タンパク質“タウ”の蓄積(封入体)が認められる。このような疾患は総称してタウオパチーと呼ばれている。

### (2) 正常タウの局在の背景について

タウは病理学的封入体形成に先立ち、細胞内局在が軸索から細胞体、樹状突起へと変化すると考えられている。脳内“in vivo”におけるこの局在変化についての研究は、組織学的に極めて染色されにくいことから不可能であった。

そのため、正常タウ(生理学的条件下)の脳内における詳細な組織・細胞内分布は明らかにされておらず、正常な細胞から異常な蓄積を起こすまでのタウの挙動についても不明のままである。

タウオパチー進行によるタウの変化を評価するためには、in vivo における正常タウの可視化が必要不可欠である。

### (3) タウと微小管の関係についての背景

タウは通常、神経細胞軸索中の微小管に結合し微小管の安定化に寄与していると考えられている。

タウオパチー神経変性細胞では、タウの異常蓄積とともに微小管の消失が認められている。

本研究室の先行実験により、微小管の減少がタウによる神経機能障害を引き起こすことを確認している。さらに線虫を用いた実験により、チューブリン脱アセチル化酵素の一つ HDAC6 のノックダウンにより、神経機能異常が改善することを認めている。

これより、 $\gamma$ -チューブリンアセチル化の亢進は微小管安定化を促進させ、抗タウオパチー効果に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) まだ確立されていない正常タウの組織学的解析法を構築する。その利用により野生型マウス及びタウオパチー病変変化が再現されるヒト変異型タウのトランスジェニックマウス(タウ Tg マウス) 脳における内在性マウス型タウ(内在性タウ)と外来性ヒト変異型タウ(外来性タウ)の正確な細胞内局在を決定し、神経変性を引き起こす外来性タウと内在性タウの決定的な違いを明らかにする。

(2) タウオパチー神経変性細胞では高リン酸化などのタウの異常により微小管が消失すると考えられている。しかし本研究では、逆転の発想ともいえる微小管の不安定化、減少が起点となりタウオパチー神経変性が引

き起こされるという新たな視点からタウオパチー発症機構を解明することを目的とし解析を進める。

## 3. 研究の方法

### (1) 用いたマウスについて

野生型マウスとして C57BL/6 マウス、タウオパチーモデルマウスとして作出され病変変化が再現されるトランスジェニックマウス(タウ Tg マウス, Kimura et al., 2010 JBC, Kimura 2007 et al., EMBO)、陰性コントロールとしてタウノックアウトマウス(tau-KO, Dawson 2001 J Cell Sci)、微小管安定化マウスとしてウォーラー変性遅延型(Wlds)マウスを用いた。

### (2) 用いた抗体について

当研究室で作成した抗体  
タウ検出用として新たに作成した、マウスおよびヒトタウを特異的に検出できる t-tau (rabbit polyclonal antibody)、ヒトタウを特異的に検出できる h-tau (rat monoclonal antibody)、マウスタウを特異的に検出できる m-tau (rat monoclonal antibody)、MAP2 特異的検出用として作成した MAP2N (rabbit polyclonal antibody)を用いた。

市販の抗体

チューブリン検出用として Alexa 488-conjugated DM1A (DM1A-488, Millipore) を使用した。

### (3) マウス脳を用いたタウの組織学的解析法の構築

#### 組織学的解析法の確立

深麻酔下で野生型マウスを 4%パラフォルムアルデヒド液により灌流固定後、頭部を浸漬固定した。固定後、切片を作成し透過処理後、ブロッキング処理を行い、1 次抗体を反応させた。次に、蛍光標識した 2 次抗体と反応させ、共焦点レーザー顕微鏡または超解像度顕微鏡 (STED) によりタウの局在解析を進めた。

1 次抗体としてタウ特異的抗体である t-tau を用いてマウス脳内全体における内在性タウの局在解析を実施した。陰性コントロールとして tau-KO マウスを用いた。

STED による内在性タウの高感度な局在解析を t-tau と DM1A-488、タウと MAP2 の分布を m-tau、MAP2N を組み合わせた多重染色を行い実施した。

### (4) 内在性マウス型タウと外来性ヒト変異型タウの詳細な局在解析

研究の方法(3)で構築した方法を利用して、野生型マウスおよびタウオパチーモデルマウス脳における内在性、および外来性タウの細胞内分布を、内在性タウ、外来性タウに対する特異抗体を組み合わせた多重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡観察により評価した。さらにタウ Tg マウス脳における内在性タウ、外来性タウ、MAP2 の細胞内局在についてのより高感度な解析を内在性タウ、外来性タウ、MAP2 に対する特異的な抗体 m-Tau と

MAP2N、t-tau と m-tau および h-Tau と MAP2N を組み合わせた多重染色を行い STED により観察した。

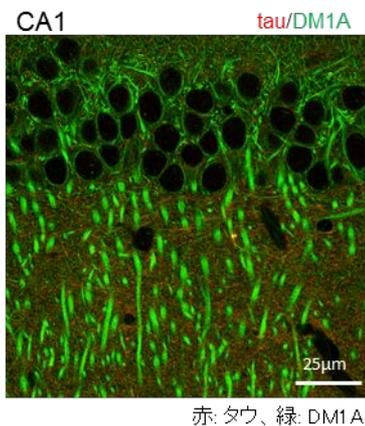
(5) -チューブリンアセチル化を介した微小管の安定化とタウオパチーの関係

-チューブリンアセチル化とタウオパチーの関係を解析するために、微小管のアセチル化亢進により、微小管が著しく安定化されているモデルマウスである Wlds マウスを導入した。tau-Tg マウスと Wlds マウスを交配させ、tau/Wlds マウスを産出し、微小管安定化とタウの病態形成の関係について解析を進める。

#### 4. 研究成果

(1) はじめに正常なタウを組織学的に検出する方法を確立した。切片を、本研究室で作成した内在性タウに特異的な抗体 t-tau により染色し共焦点レーザー顕微鏡で解析を進めた結果、これまでの組織学的検出法では検出が困難であった内在性タウすなわち in vivo における“正常なタウ”の可視化に成功した。内在性タウは脳全体に発現していたが、白質では比較的タウの発現が乏しかった。海馬では歯状回顆粒細胞の軸索である苔状線維に豊富であり、細胞層での局在は乏しかった。

共焦点レーザー顕微鏡観察により、タウは CA1 および CA3 の両領域において、樹状突起ではほとんど検出されなかった(図 1)。STED を用いた高解像度による解析を進めた結果、CA1 領域では、軸索において不連続に存在し、CA3 領域では、苔状線維に豊富に局在するが、その発現は CA1 と同様に連続的ではなかった。MAP2 とタウの細胞内分布はこれまで初代培養細胞等 in vitro による観察で報告されているように、脳組織においてもタウは軸索、MAP2 は樹状突起に局在し、タウと MAP2 は共局在していなかった。MAP2 の細胞内局在が連続的であるのに対し、タウは、軸索上に連続的な局在ではないことを明らかにした。



赤: タウ、緑: DM1A

図1. マウス脳CA1領域におけるタウとDM1Aの分布

(2) 内在性マウス型タウと外来性ヒト変異型タウの細胞内局在

タウオパチー病変の発症前であるタウ Tg マウスおよび野生型マウス脳におけるタウの局在について検討した。海馬における内在性タウはタウ Tg マウスと野生型マウスで同等の局在を示した。しかしタウ Tg マウス脳の外来性タウは錐体細胞体、先端樹状突起に局在し、外来性タウの局在が内在性タウの局在と異なることを確認した。

外来性タウの軸索上以外への局在は実験した全てのタウ Tg マウスで確認された。これにより Tg マウス脳では、外来性タウは神経障害が起こるよりも早期から局在異常が起きていることを明らかにした。

高解像度による解析により、タウ Tg マウスでは、内在性タウの局在が軸索上に不連続であるのに対して、局在異常を起こしている外来性タウは、樹状突起上で連続的であった。

通常、野生型マウスはタウオパチーを発症しない。ヒト型タウを導入されたタウ Tg マウス脳では内在性タウと外来性タウの細胞内局在が明らかに異なり、このタウの局在の違いがタウオパチー発症に関与していると考えられる(図 2)。

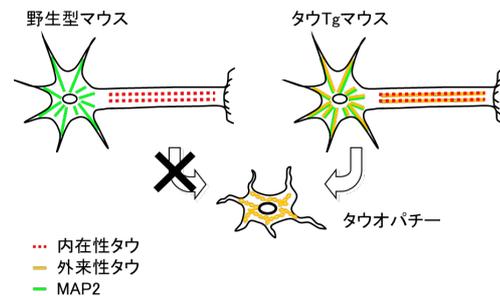


図2. 内在性タウ、外来性タウの細胞内局在

(3) 微小管の安定化とタウオパチー病態形成の関係を解析

-チューブリンのアセチル化を介した微小管安定化とタウオパチー病態形成の関係を in vivo で解析するには、微小管アセチル化の亢進により微小管が安定化されていると報告されているウォーラー変性遅延型マウス (Wlds マウス)の使用が適切だと考え、国立精神・神経センター神経研究所の荒木敏之先生よりマウスをご供与いただいた。しかし、施設への Wlds マウスの導入、検疫・クリーン化に時間を要した。また、タウの局在として得られた新たな所見である、“内在性タウの不連続な局在。”“内在性タウと外来性タウの局在の違い。”この二点についてより詳細に解析を行う必要があると判断し、高解像度による解析を追加した。この解析に時間を費やした結果、研究の方法(5)の実験開始が遅れ計画通りに実験を進めることができなかつた。これまでに tau-Tg マウスと Wlds

マウスを交配させ、tau/Wlds マウスを産出させた。さらに引数を得るために掛け合わせを行い、実験を続ける予定である。

タウ Tg マウス脳に発現する外来性タウに固有な神経局在機構の破綻すなわち局在異常がタウオパチー形成に大きく関与していることが考えられる。タウ局在異常の最初期ステップに微小管の消失、タウの遊離がどのように関わっているかを今後の課題として実験を進め、タウオパチー発症機構の解明につなげて行きたい。

これまで生理学的条件下における正常なタウの検出が困難であることから、細胞毒性を惹起すると考えられている異常タウの蓄積・封入体の形成まで至っていない初期段階のタウオパチー神経変性の病理像は捉えることができていなかった。しかし、本研究により、内在性正常タウの可視化が可能となった。この成果はこれまで異常封入体のみに頼らざるを得なかった既存の病理学に、新たなアプローチを提唱することになる。現在タウオパチー発症メカニズムは不明であり、明確な創薬ターゲットも不明である。しかし、本研究により、正常な神経細胞からタウ蓄積の形成過程をとらえることを可能にした。この応用により AD の発症段階に応じた治療ターゲットを明確にすることができ、今後発症段階に沿った治療法の開発に大きく貢献できると考えている。

#### 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)

[学会発表](計 6 件)

Atsuko Kubo, Hiroaki Misonou, Makoto Matsuyama, Yasuo Ihara, Tomohiro Miyasak. Physiological tissue distributions of tau and MAP2 in mice brains, Society for Neuroscience 2015 Annual Meeting, 2015.10.20, Chicago (United States).

久保厚子、村山繁雄、松山誠、井原康夫、宮坂知宏, Visualization of physiological tau in pre-degenerative neurons, 日本神経科学学会 第 38 回日本神経科学大会, 2015.7.30, 神戸国際展示場 1 号館 (兵庫県・神戸市).

Atsuko Kubo, Hiroaki Misonou, Makoto Matsuyama, Akihiko Takashima, Yasuo Ihara, Tomohiro Miyasaka. Distribution of endogenous and exogenous tau in the mouse brain, The 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases, 2015.3.21, Nice (FRANCE).

久保厚子、御園生裕明、松山誠、高島明彦、井原康夫、宮坂知宏, tau-Tg マウス脳における内在性および外来性タウの神経細胞内局在, 日本認知症学会 第 33 回日本認知症学

会学術集会, 2014.12.1, パシフィコ横浜 会議センター (神奈川県・横浜市).

久保厚子、御園生裕明、松田響子、松山誠、河田光博、初田裕幸、村山繁雄、井原康夫、宮坂知宏, 正常脳におけるタウの神経細胞内局在, 日本認知症学会 第 33 回日本認知症学会学術集会, 2014.11.30, パシフィコ横浜 会議センター (神奈川県・横浜市).

久保厚子、御園生裕明、松山誠、高島明彦、井原康夫、宮坂知宏, マウス脳における内在性および外来性 tau の局在, 日本神経科学学会 第 37 回日本神経科学大会 Neuroscience 2014, 2014.9.12, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保厚子 (KUBO ATSUKO)

同志社大学・生命医科学部・特別研究員

研究者番号: 70647792