

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07388

研究課題名（和文）脳間質液循環に着目したタウ脳内動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanisms involved in extracellular tau dynamics in brain

研究代表者

山田 薫（Yamada, Kaoru）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：00735152

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：アルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患では、細胞外に存在するタウが「細胞間伝播」を生じ病態を拡大することから、その脳内動態の解明は重要と考えられる。これまで細胞外のタウがどのように脳外へ除去されているのかは不明であったが、本研究では脳間質液中に存在するタウが、脳脊髄液に移行すると、深頸部リンパ節を経由して脳外へ排出されていること、またこの過程にAQP4が関与することを見出した。AQP4を欠損するタウトランスジェニックマウスでは、リン酸化タウの異常蓄積だけでなく、神経変性が著明に増悪し、細胞外タウのクリアランスがタウ蓄積、神経変性に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外のタウがタウ病態進展に関与していることが示唆されている一方で、その脳内動態に関しては不明な点が多い。本研究は細胞外に存在するタウがglymphatic systemにより脳間質液から脳脊髄液へ、次いで深頸部リンパ節を経由して脳外へ排出されていることを明らかにした。Aquaporin-4を欠損することでglymphatic systemが阻害されたマウスにおいては、リン酸化タウ蓄積と神経変性が著明に増悪したという本研究結果は、細胞外タウのクリアランスと、タウ病態の密接な相互作用を示唆するもので、細胞外液に存在するタウを標的とした、神経変性疾患治療の妥当性を支持する所見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tau, a microtubule-associated protein accumulated within brain cells of tauopathies, is also released into the extracellular fluid. However, it remains elusive whether clearance of extracellular tau impacts tau-associated neurodegeneration. Here we show that aquaporin-4, a major driver of the glymphatic clearance system, facilitates the elimination of extracellular tau, and that deletion of aquaporin-4 exacerbates tau deposition and neurodegeneration. Our findings implicate aquaporin-4 and glymphatic system in the pathophysiology of tauopathies.

研究分野：病態神経科学

キーワード：タウ 伝播 glymphatic system aquaporin-4

1. 研究開始当初の背景

微小管結合タンパク質である、タウは「タウオパチー」と総称される様々な神経変性疾患において、高度にリン酸化された状態で脳内の細胞内に凝集、蓄積しており、神経細胞死の原因となることが知られている。タウは細胞質に局在するタンパク質であるが、近年細胞外液にも放出されることが明らかになってきた。凝集したタウが細胞外液に放出されると、細胞内へ再取り込みを受け、新たな凝集核として働くことでタウ病態を伝播させることが様々な実験モデルより明らかになっている。従って、細胞外液におけるタウの動態を明らかにすることは、タウ病態進展のメカニズムを理解する上で非常に重要であるといえるが、細胞外へ放出されたタウが、どのような分子メカニズムで脳外へクリアランスされているのかについては全く不明であった。

2. 研究の目的

近年脳細胞外液中に存在する物質が、血管周囲腔を介した細胞外液の流れによって脳外へ排出されるとする、glymphatic system の機構が明らかになった (Illiff *et al.*, *Sci Transl Med* 2012)。Glymphatic system における細胞外液の流れには、血管周囲腔に存在するアストロサイト足突起に発現する水チャネル、aquaporin-4 (AQP4) が重要な役割を果たしていることが知られている。研究代表者はこの glymphatic system が細胞外タウのクリアランスに関与する可能性を着想した。本研究は AQP4 を欠損するマウス (AQP4KO マウス) を用いて、細胞外タウのクリアランスに対する glymphatic clearance の関与、及び glymphatic clearance の阻害がタウ蓄積と神経変性に与える影響について解析を行うことを目的として遂行した。

3. 研究の方法

Glymphatic system は脳間質液 (ISF) から脳脊髄液 (CSF) への細胞外液の流入及び、CSF から ISF への再流入の双方に関与すると報告されており、その機能評価法としては、ISF に注入した蛍光トレーサの脳からの消失を計測する手法と、CSF に注入した蛍光トレーサの ISF への再流入を測定する手法が用いられている。そこで本研究では蛍光標識したタウを用い、上記の2つの手法を用いて、ISF から CSF へのタウ流出、CSF から ISF へのタウ再流入が、AQP4 欠損マウスでどのように変化するか検討することとした。

また、P301S 変異型タウを過剰発現し、月齢依存的にリン酸化タウ蓄積と神経変性を生じる PS19 マウスと AQP4KO マウスを交配させ、glymphatic clearance がタウ病態と神経変性に与える影響についても解析を行った。

4. 研究成果

HiLyte555 蛍光標識したタウを脳実質に注入する実験を行ったところ、野生型マウス (wildtype) においては経時的に脳実質からタウが消失するとともに、CSF に流出している様子が観察された (図 1a-d)。一方で AQP4KO マウスにおいては、脳実質からのタウの消失速度が顕著に抑制されており、CSF への流出にも遅延が認められた (図 1e)。さらに野生型マウスにおいては CSF へ到達したタウは、すみやかにクリアランスされ消失したのに対し、AQP4KO マウスの CSF では消失を受けずに蓄積している様子が観察された。AQP4KO マウスにおいて、CSF に到達したタウが速やかなクリアランスを受けず蓄積したという結果を受けて、AQP4KO マウスでは CSF からのタウクリアランスが阻害

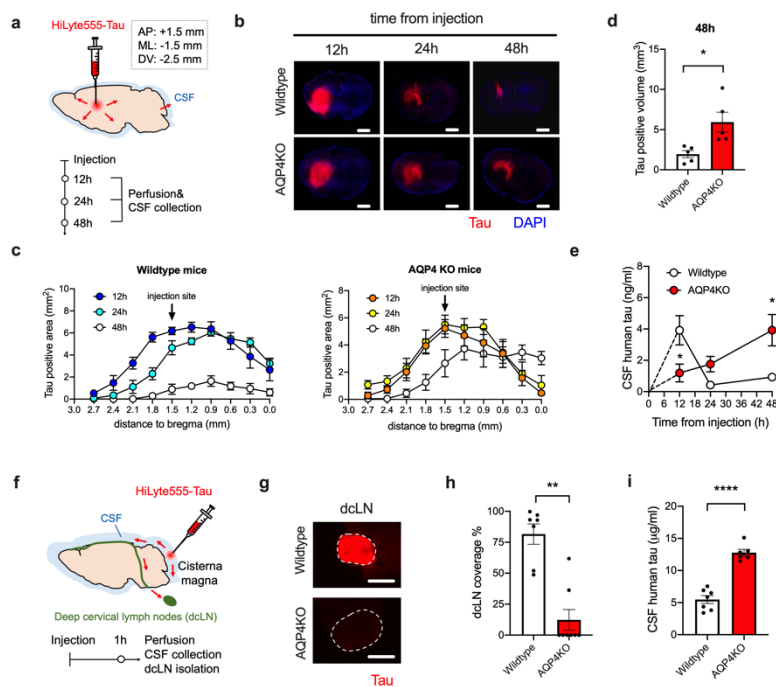


図 1: AQP4 が細胞外タウのクリアランスに与える影響

されている可能性を着想した。そこで小脳延髄槽から CSF 中に HiLyte555 標識タウを注入し、CSF が末梢へ代謝される過程における主要な経路地として知られる、深頸部リンパ節 (deep cervical lymph nodes: dcLN) へのタウの移行を観察することとした (図 1f)。その結果、野生

型マウスにおいては HiLyte555 標識タウを注入から一時間後に dcLN へのタウの明確な移行が認められたのに対し、AQP4KO ではほとんどの個体において dcLN へのタウ移行は認められず、また CSF におけるタウ量が有意に上昇していることも明らかになった (図 1g-i)。Glymphatic system は CSF から ISF への再流入経路にも関与することが報告されている。しかしながら CSF への注入実験において、ISF へのタウの移行については、野生型マウスと AQP4KO マウスでは同程度に生じていることもわかった。

Glymphatic system によってタウが ISF から、CSF、dcLN を経て脳外へクリアランスをうけているという結果をうけ、次にこの細胞外タウのクリアランスが細胞内におけるタウの異常蓄積と神経変性に与える影響について検討を行うこととした。PS19 マウスは P301S 変異型タウを過剰発現し、月齢依存的にリン酸化タウを蓄積し、神経変性を生じるタウオパチーのモデルマウスである (Yoshiyama *et al.*, *Neuron* 2007)。この PS19 マウスと AQP4KO マウスを交配し、タウの蓄積と神経変性に glymphatic clearance が与える影響について検討を行った。6 か月齢の PS19xAQP4 (+/+) では海馬においてリン酸化タウ蓄積が全く認められなかったのに対し、PS19xAQP4 (-/-) では、一部の個体において海馬 CA3 を中心にリン酸化タウ蓄積が散見された (図 2a)。また CSF におけるタウ量が PS19xAQP4 (-/-) で有意に増加していることも明らかになった (図 2b)。9 か月齢になると、PS19xAQP4 (+/+) においても海馬、大脳皮質、視床を含む広範な脳領域においてリン酸化タウの蓄積が認められるようになったが、PS19xAQP4 (-/-) においてはいずれの脳領域においてもリン酸化タウの蓄積が顕著に増大していた (図 2c, d)。9 か月齢の PS19xAQP4 (-/-) においては、リン酸化タウ蓄積の増大とともに、大脳皮質、海馬の著明な萎縮とこれに伴う側脳室の拡大が認められた (図 2e-g)。神経細胞のマーカーである NeuN を用いた免疫染色を行ったところ、海馬歯状回顆粒細胞層 (DG)、梨状皮質 (piriform cortex) 錐体細胞層の厚みが有意に減少しており、AQP4 欠損 PS19 マウスでは神経細胞死がより多く生じていることが明らかになった (図 2e-g)。

細胞質タンパク質であるタウはシグナルペプチドを有さないにも関わらず、細胞外へ放出されることが知られている。アルツハイマー病患者においては、CSF 中のタウが増加していること、また凝集性のタウが細胞外腔を介して細胞から細胞へ伝播することで、タウ病態が進展することから、細胞外のタウが持つ病的意義が国際的にも大きな注目を集めている。これに加えて、抗タウ抗体は、細胞膜に対する透過性が乏しいにも関わらず、免疫療法がモデル動物において著効していることから、細胞外タウがタウ病態進展に関与していることが示唆されてきた。しかしながら細胞外腔へ放出されたタウが、どのようなメカニズムで、脳外へ代謝されているのか、そのメカニズムはこれまで全く不明であった。本研究において研究代表者は、脳内で細胞外腔へ放出されたタウが、CSF へ流出後、dcLN を経て脳外へ代謝されていること、またこの過程に AQP4 が関与していることを初めて見出した。また AQP4KO マウスでは、リン酸化タウ蓄積の増大とともに、神経変性の著明な増悪が認められることも明らかになった。Glymphatic system による細胞外タウのクリアランスが阻害されたマウスにおいて、タウの蓄積と神経細胞死が進行したという本研究結果は、細胞外タウと、タウ蓄積・変性の密接な関わりを支持する所見と言える。一方で、細胞外タウクリアランスの低下が、どのような機構を介してタウ病態増悪を導いたのかについては、十分に検討できておらず今後の研究課題と考えている。

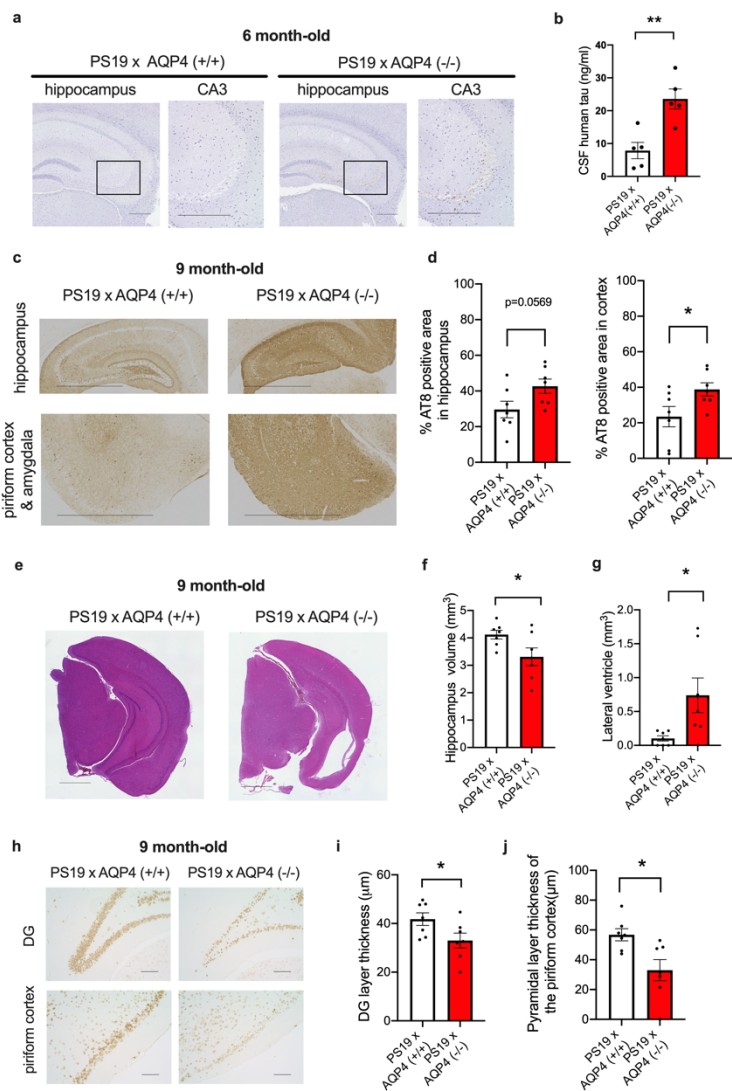


図 2: AQP4 がリン酸化タウ蓄積と神経変性に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石田和久、山田 薫、橋本 唯史、阿部 陽一郎、安井 正人、岩坪 威
2. 発表標題 Aquaporin-4の欠損はタウの蓄積と神経細胞死を増悪させる
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaoru Yamada, Kazuhisa Ishida, Tadafumi Hashimoto, Yoichiro Abe, Masato Yasui, Takeshi Iwatsubo
2. 発表標題 Aquaporin-4 deficiency exacerbates tau accumulation and neurodegeneration in a mouse model of tauopathies.
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 和久、山田 薫、橋本 唯史、阿部 陽一郎、安井 正人、岩坪 威
2. 発表標題 Aquaporin-4が細胞外タウのクリアランスとタウ蓄積に与える影響
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 薫、石田 和久、橋本 唯史、阿部 陽一郎、安井 正人、岩坪 威
2. 発表標題 タウ蓄積と神経細胞死におけるaquaporin-4の役割
3. 学会等名 第93回 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------