

## 論文の内容の要旨

論文題目 タウタンパク質の脳内蓄積とクリアランスに aquaporin-4 が与える影響に関する研究

氏名 石田 和久

タウタンパク質は主に神経細胞の軸索に発現する微小管結合タンパク質である。正常なタウは可溶性であるが、アルツハイマー病 (AD)、前頭側頭葉変性症、大脳皮質基底核変性症、進行性核上性麻痺、ピック病等の神経変性疾患においては、高度にリン酸化された不溶性線維として蓄積しており、これらの疾患はタウオパチーと総称される。タウオパチー患者脳においてはタウの蓄積と神経細胞脱落が高い相関を示すことに加え、17 番染色体に連鎖する家族性前頭側頭型認知症・パーキンソニズム (FTDP-17) において、タウに 40 種類以上の変異が発見されたという遺伝学的事実に基づき、タウタンパク質に生じる何らかの異常が神経細胞死の原因となると考えられている。

タウが凝集する機構は明らかになっていないが、単量体のタウの構造変化をきっかけとして、オリゴマーなどの低分子量多量体の形成が生じ、これを凝集の核 (seed) として線維形成が進むと考えられている。

タウの凝集は細胞内で生じるが、近年タウは細胞質に存在するだけでなく脳実質の細胞外液である、脳間質液 (ISF) 中にシグナル配列に依存しない **unconventional secretion pathway** によって放出され、その一部は脳脊髄液 (CSF) 中にも移行していることが明らかになってきた。

このタウの細胞外放出の生物学的意義については不明な点が多いが、近年凝集状態にあるタウが細胞外に放出されると、細胞内に再取り込みを受け、新たな seed として働き、タウ蓄積を促進させることがわかってきた。タウの seed が細胞外腔を介し、細胞から細胞へ移行しながらタウの蓄積を拡大していく現象は「細胞間伝播」と呼称されている。AD においてタウの蓄積は嗅内皮質から始まり、海馬、その他の大脳皮質へと神経回路に沿って広がることが知られており、細胞間伝播はこれを説明する背景メカニズムとしても注目されている。タウの細胞間伝播はタウの細胞外放出を起点として生じるため、細胞外腔におけるタウ動態の理解は、タウ蓄積機構の解明において重要である。しかしながら細胞外に存在するタウの脳内動態、とりわけどのような分子機構でタウが脳外へ代謝されているのかについては未解明である。

近年、ISF が血管周囲腔を介して循環する過程で、細胞外物質が CSF へクリアランスされる **glymphatic system** の存在が明らかになった。**Glymphatic system** は血管周囲のアストロサイトの足突起に発現する水チャネルである aquaporin-4 (AQP4) の欠損で抑制されることから AQP4 が水分子の拡散に関与することにより、**glymphatic system**

の機能を促進しているものと考えられている。これに加えて近年中枢には存在しないと考えられていたリンパ管が硬膜中に存在することが判明し、また CSF の深頸部リンパ節への流入経路として機能することにより、CSF の末梢へのクリアランスに重要な役割を担っていることが明らかになってきた。

これらの知見を踏まえ本研究では、細胞外タウが **glymphatic system** によってクリアランスされるという仮説を立て、AQP4 のノックアウトマウス (AQP4KO) を用いてその仮説の検証を行った。

まず **glymphatic flow** が細胞外タウのクリアランスに与える影響について検討するため、線条体へ HiLyte Four™ 555 標識したヒト型タウを注入する実験を行い、注入から 12、24、48 時間の各時点において、脳内に残存するタウの蛍光を観察した。脳切片における蛍光シグナル陽性面積を指標に脳内に残存するタウを評価したところ、野生型マウス (WT) においては、注入後 12 時間から時間経過とともに脳内タウ残存量の低下が認められたがタウが AQP4KO においては WT と比して脳内におけるタウ残存量の低下が有意に抑制されていることがわかった。また WT においては注入から 12 時間までに CSF のタウ濃度がピークとなった後減少し、タウがクリアランスされる様子が観

察されたのに対し、AQP4KO では WT に比して CSF へのタウ流入の遅延が認められただけでなく、CSF タウ濃度が連続的に上昇することがわかった。この結果から、AQP4 の欠損は ISF から CSF へのクリアランスを抑制するものと考えられた。

AQP4KO において脳実質から CSF へのタウ流入が遅延するのみならず、CSF タウ量の連続的な上昇が認められたことから、AQP4 は脳実質から CSF へのタウ移行だけでなく、CSF から脳外へのタウのクリアランスにも関与する可能性を考えた。この仮説について検証するために、小脳延髄槽から CSF に HiLyte Four™ 555 標識したタウを注入する実験を行った。WT では注入したタウの大部分が 1 時間でクリアランスされ、CSF タウ濃度が減少したのに対し、AQP4KO の CSF においては WT と比してタウ濃度が有意に高いことがわかった。そこで AQP4KO においてはリンパ節に向かうタウのクリアランスが低下していることが原因で CSF 中のタウ濃度が上昇したのか否かを検証するために、深頸部リンパ節におけるタウの集積について検討した。WT で確認された深頸部リンパ節へのタウの集積が、AQP4KO においてはほとんど確認されなかった。この結果から、AQP4KO では CSF から深頸部リンパ節へのタウの移行が抑制されており、これにより CSF 中のタウ濃度が上昇したものと考えた。CSF 中の物質は硬膜内リンパ管を介して深頸部リンパ節へ移行する以外に、一部は **glymphatic system** を介して脳内へ移行することが知られている。そこで CSF から脳内へのタウの移行を評価したところ、AQP4KO は WT と同程度であり、CSF 中のタウ濃度が上昇していたことと併せて考えるとタウの CSF から脳への移行の効率は AQP4 の欠損によって低下するものと考えられた。

次に AQP4 の欠損がタウの凝集・蓄積と神経変性に与える影響を評価するために、AQP4KO と P301S 変異型ヒトタウトランスジェニックマウス (PS19) を交配したところ、9

ヵ月齢の PS19 x AQP4 (-/-) では、PS19 x AQP4 (+/+) に比して、大脳皮質におけるリン酸化タウ蓄積が著明に増加していることが明らかになった。さらに海馬及び大脳皮質の萎縮、海馬歯状回及び梨状皮質における神経細胞層の減少も観察され、AQP4 の欠損はタウ蓄積と神経細胞脱落を促進することが明らかになった。一方、PS19 と交配していない AQP4KO マウス、またタウの蓄積がほとんど認められない 3 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢の PS19 x AQP4 (-/-) マウスにおいては、このような海馬・大脳質の萎縮と脳室拡大は認められなかったことから、AQP4 の欠損はタウ蓄積によって生じる神経細胞死を増悪させるものと考えられた。

PS19 x AQP4KO においてタウの蓄積が増加した原因として、タウの細胞間伝播が亢進していることを着想し、これを検証するために、タウ線維の脳内注入実験を行った。タウ線維を脳内に注入すると、まず注入側脳領域の神経細胞に取り込まれ、凝集核として働いてタウ蓄積を生じ、ついで時間経過とともに凝集核が伝播し、注入領域と投射関係にある脳領域にもタウの蓄積が生じることが知られている。PS19 x AQP4 (+/+) 及び PS19 x AQP4 (-/-) の海馬にタウ線維を注入し、6 週間後にタウの蓄積を AT8 抗体による免疫染色で評価した。その結果注入側海馬及び対側海馬の双方において、PS19 x AQP4 (-/-) においてタウ蓄積はむしろ減少することがわかった。この結果から、PS19 x AQP4 (-/-) におけるタウ蓄積の増悪は、タウの細胞間伝播の亢進とは異なるメカニズムによって生じている可能性も考えられた。

次に AQP4 の欠損がマウス細胞外液中のタウの濃度に与える影響を調べるため、AQP4 KO マウス及び PS19 x AQP4 (-/-) において、CSF 及び ISF のタウ濃度を測定した。6 ヶ月齢の PS19 x AQP4 (-/-) の CSF タウ濃度は PS19 x AQP4 (+/+) に比して有意に上昇しており、AQP4 の欠損は CSF タウの定常状態における濃度を上昇させることが明らかになった。

次に ISF におけるタウ濃度を測定するために、海馬において 1,000 kDa cut off の透析プローブを用いた *in vivo* microdialysis 法を施行した。その結果、CSF とは異なり、3、6、9 ヶ月齢いずれの PS19 x AQP4 (-/-) においても PS19 x AQP4 (+/+) に比して ISF のタウ濃度は低下することがわかった。一方 glymphatic clearance を受けることが報告されている Aβ の ISF 濃度は AQP4KO において有意に上昇していることもわかり、AQP4 の欠損は ISF 中のタウと Aβ の濃度に対して異なる影響を及ぼすことが明らかになった。

本研究において、私は AQP4 が ISF 及び CSF からの可溶性タウのクリアランスに関与することを明らかにした。また AQP4 の欠損は PS19 においてリン酸化タウの蓄積とそれに伴う神経細胞脱落を増悪することも見出した。一方 AQP4 が凝集状態にあるタ

ウのクリアランスに果たす役割及び、AQP4の欠損がタウ蓄積と神経変性を増悪する機構については十分検討できておらず、これらのメカニズムを解析することが今後の課題と考えている。