

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

「孤発性タウオパチー形成の機序解明とモデル動物の開発」に関する研究（26
- 23）

主任研究者 木村 哲也 国立長寿医療研究センター 室長

研究要旨

「孤発性タウオパチー形成の機序解明」では、野生型マウスにおいてもシナプス抑圧刺激を与えることで、加齢依存的にタウオリゴマーの形成がなされることを発見し、さらにこのオリゴマー形成およびその代謝はオートファジーの形成およびその成熟過程と強い関連があることを見出した。さらに、加齢脳シナプスを調べることで、シナプスの長期抑圧に必要な AMPA 受容体の代謝過程は幼若期ではプロテオソーム経路に依存しているが、加齢するとオートファジー経路に依存するようになることも発見し、加齢脳の神経細胞では AMPA 受容体の細胞内トラフィックとタウオリゴマー形成／代謝過程が密接に関わっていることを世界に先駆けて確認した。さらに、本年度、これを確かめる目的で、タウオリゴマーを中心とした分子コンプレックスの解析と免疫蛍光染色を行い、これを確認した。さらにオートファジーの後段に当たるリソソームの薬理学不活性化を行なうことで、これまでに見られなかった高度にリン酸化した繊維性の構造特性を持つ病理学的タウ凝集体が野生型マウスにおいても形成されることを発見した。これらのことから、発見したオートファゴソームにおけるタウ凝集体形成は病理的タウ凝集体のソースの1つとなり得ることが明らかになった。

最近の報告では病理的タウ凝集体が細胞外より左往することでシナプス毒性を示すことが示されている。我々の研究はオートファジーリソソーム経路が病理的タウ凝集体の形成に深く関わることを明らかにしてきた。リソソーム内に蓄積された凝集体はリソソーマルエンドサイトーシスによって細胞外に放出されることから、ここで形成された病理的タウ凝集体が細胞外タウ凝集体のリソースとなり、シナプス毒性を発現できる可能性がある。

このことを確かめるための新たな実験として、細胞外に AD 患者の脳より得たタウオリゴマーによるシナプス毒性を確認し、LTD 誘導型細胞内タウ凝集メカニズムとの論理的接点を明らかにする実験を開始した。結果として、既に報告されているように AD 由来タウオリゴマーは LTP の形成を障害することを確認し、さらに、加齢脳におけるオリゴマー投与は直接的にシナプスの減少を誘導できることが明らかになった。

さらに 28 年度はリコンビナントタウを用いた解析を行った。その結果、確かにリコンビナントタウにおいてもある種のタウオリゴマーはシナプスの抑圧を行うこと、この抑圧は上で我々が示した細胞内タウに依存した LTD 様の過程

(Kimura et al 2014) が関与してシナプス受容体の細胞内取り込みによることが明らかになった。すなわち、細胞外タウは NMDA 受容体を活性化し、グルタミン酸受容体の細胞内取り込みを誘導していることが示唆された。さらに、細胞表面でタウに接触するタンパクの 1 つに NMDA 受容体が含まれることを、タウノックアウト細胞を用いた免疫沈降実験によって明らかにした。このことより、タウオリゴマーが直接 NMDA 型受容体を活性化している可能性が示された。

細胞内に形成されたタウの凝集体は一旦細胞外に放出されシナプスに作用することで LTD を誘導し、さらなる凝集体の形成を促進するという「タウーシナプス病理の協調的重篤化」メカニズムが存在している可能性が示された。今後、この興味深い仮説を検証しつつ、「タウーシナプス病理の協調的重篤化」を抑制する化合物（タウオリゴマー/NMDA 受容体相互作用抑制剤など）のスクリーニングシステム開発を下記の様に開始した。

「汎用化合物スクリーニング系の開発」では上述したシナプス抑圧によるタウオリゴマー形成現象の可視化を目指したシステム構成を行った。まず、使用する神経系標本として海馬組織培養系を立ち上げ、培養ネットワークにおける AMPA 受容体のトラフィックを解析するためのイメージング手法を開発した。本方法とシナプスの生化学解析を組み合わせることで、タウノックアウト効果についてより詳細な情報を得ることができた。すなわち、タウノックアウトにおいては NMDA 投与によるシナプスに於ける AMPA 受容体量の変動は観察されなく培養系における LTD においてもタウの重要性が示され、さらに、軸索内部の AMPA 受容体シグナルの動態を調べて、野生型では内部 AMPA シグナルは増大するがタウノックアウトにおいてはむしろ減少することが明らかになった。興味深いことに、タウノックアウトの内部 AMPA シグナルは未刺激条件で野生型より高い傾向を示してお

り。これらのことから AMPA 受容体の細胞内トラフィックがタウの有無に大きく依存していることが示され、上述したタウ凝集体形成メカニズム研究の結果をサポートする結果を得ることができた。

現在もイメージングシステムの開発は継続されており、AMPA 受容体を細胞内動向を解析するための pHluorine2-GluA2 結合タンパクの発現を可能とするベクターを作成し、細胞質に蓄積したタウオリゴマーの病理的役割を解明するシステムを構築している。一方で、タウオリゴマーの神経細胞表面への接着能力を定量的に解析するためのシステム構築を行なっている。これらの技術は直接的に化合物スクリーニングの基礎課程と繋がり、得られた知見を元に新たな創薬を目指した次期研究課題の礎となる。

「加齢動物の脳活動の特徴の解明と特徴形成に拘るタウの寄与の解明」では、加齢した海馬神経の受容野を詳しく解析することで、加齢脳の神経活動特性の一端が明らかとなった。

主任研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 室長

分担研究者

古舘 宏之 独立大学法人埼玉大学 助教

研究期間 平成26年4月1日～平成28年3月31日

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の多くは孤発性であり、その病理形成機序は不明のままと言える。認知障害と深い関わりがあるとされるタウ病理形成の生理的機序の解明は認知症の予防と治療に重要な意味をもつ。これまでに、我々はタウの生理機能を解明し、孤発性タウオパチーの発生機序の糸口を見いだそうと努力してきた。その結果、タウが神経可塑性の1つ NMDA 誘導型シナプスの長期抑圧 (LTD) の形成に必須なタンパクであることを見出した (Kimura et al. 2013, Philo. Trans.

B)。この研究によって長期抑圧を誘導することでタウの積極的なリン酸化が起こることも報告し、リン酸化タウの形成する生理機構の1つと考えられた。

さらに、昨年度、LTD を誘導する低頻度頻回電気刺激を海馬に与えることにより、海馬神経細胞のタウがリン酸化され、さらに、サルコシルに不溶化したタウ凝集体凝集体の形成も誘導されることを、生化学的、免疫組織化学的手法によって発見した。

本研究においては、LTD 刺激により誘導され生理状況におけるタウ重合体形成の生理学的背景やリン酸化修飾などの関与を実験的に検証することで、AD における病理的タウ凝集体形成メカニズムを明らかにし、得られた知見に基づいた新たな創薬研究の方向性を提案する。さらには、得られた方向性に基づいた創薬をサポートする化合物スクリーニングシステムの開発を並行して行う。

B. 研究方法

孤発性タウオパチー形成の機序解明と、これを応用した汎用化合物スクリーニング系の開発」

実験動物：実験動物として基本的には C57BL/6 マウスを用いた。加齢 C57BL/6 マウス（20 ヶ月齢-25 ヶ月齢）は主に国立長寿医療研究センター実験動物管理棟のエイジングファームより供給された。また、用いたタウ欠損マウスは C57BL/6 マウスをバックグラウンドとし、同じ実験動物管理棟で飼育したものを用いた。

刺激誘導性タウオリゴマーの検出：

- In-vivo 標本における LTD 誘導刺激：様々な月齢のマウスを用いた。マウスは3%イソフラレン～空気混合ガスにより急性麻酔を施し、脳固定装置に定位された。その後、1-1.5%。イソフラレン～空気混合ガスにより、麻酔状態を長期的に維持した。マウスが十分に深い催眠状態になったことを確認した後、頭皮を切開することで頭骨を露出し Bregma -1.75mm, lateral 1.75mm の位置にドリルで穴を開け脳を露出し、3本の電極よりなる組電濁（0.5k ohm タングステン電極を多くの場合用いたがと先端を金メッキしたエナメル電極を用いた場合もあった）。電気刺激はパルスジェネレータ Master8 により駆動し、3本の電極の内2本を用いて行った。同時に刺激電極より約

200 μ m の位置に配置した錦衣記録用電極より局所場電位を記録し、AD コンピュータ (Digidata 1310) を介してコンキータ上に保存した。また、電極の深度は多くの場合脳表より 1.4mm 程度であったが、記録された電位波形を元に微調整を行い、海馬 CA1 部位の Striatum Radiatum (CA3 シヤッフアー分枝の投射部位) に確実に挿入した。電極の挿入後、すぐにテスト刺激 (刺激頻度 0.033Hz、パルス幅 100 μ m) を開始した。刺激強度は最大のシナプス後場電位 (fEPSP) の 40% の fEPSP が得られるように調整した。LTD の誘導は 1 Hz の繰り返し刺激 (程頻度頻回刺激、LFS) を 1800 回与えることで行った。また、シャムコントロールでは LFS を与える以外の全ての手続きを行った。なお、これらの作業中は腸内体温が 36.5 度に保持された。

- 薬剤投与：必要に応じて刺激と同側の側脳室に挿入したマイクロカニューラ (太さ 38gauge) により各種阻害剤を投与した。溶剤の押出はシリンジポンプを用い 0.5 μ l/min の流速で行った。
- 海馬標本の摘出：LFS を提示後、動物は麻酔をしたまま一定時間保持された。所定の時間が経過した後、挿入された電極を脱着し、麻酔状態のまま頸椎脱臼、断頭、脳摘出を速やかに行った。全ての脳摘出作業は水温に調整したグルタミン酸受容体阻害剤 (0.013%キニレン酸) を含んだ人工脳脊髄液 (aCSF) 中で行い、解剖時に神経に与えるダメージを最小化した。脳摘出後左右の海馬を個別に摘出しドライアイスで冷却したアルミブロック上で急速冷却し、サンプルチューブに移し、-80 度で保存した。
- 生化学解析用サンプリング：凍結保存した海馬標本は室重量の 20 倍の容量のバッファー中 (Hepes mM, ---, PH7.4, 4 $^{\circ}$ C) 中でホモジナイズされ、1kg 遠心後、上澄み (S1) を得た。S1 の半量溶液に 20%サルコシルを適宜加え 1%サルコシル溶液とし室温で 2 時間振盪したのち、500kg にて遠心分離することでサルコシル不溶性ペレットを得た。一方残りの S1 を 11kg にて遠心分離することで、シナプスを豊富に含む膜分画 (P2) と細胞質分画 (S2) を得た。それぞれの分画はウェスタンブロット法を用いて解析した。
- 免疫沈降：必要に応じて、各分画中のタウオリゴマーの生成をタウオリゴマー抗体 (anti-tau(T22), Millipore) を用いた免疫沈降法によって行った。方法は Thermo direct IP kit に指定された方法に準拠した。本手法では抗体はビーズに共有結合するため、溶出液には抗体は基本的に溶出しないが、さ

らに、溶出液を proteinG 結合ビーズにより洗浄することで IgG フリーとした。

急性スライス海馬標本の作成と fEPSP 計測：

- 急性スライス標本作成：動物をイソフラレン雰囲気中で麻酔、断頭後、氷温 aCSF (気にリン酸を含む) 中で脳標本を摘出した。摘出した脳は、約 2 分氷温 aCSF に放置され、その後ビブラトーム (Lica VT1200s) に固定、350 μ m の暑さに裁断された。裁断後海馬と周辺皮質を取り除き、通常の aCSF でよく洗い、8 μ m ポアサイズのメンブレンに載せた。標本はメンブレン上で aCSF の気水面に保たれ、95%酸素 5%二酸化炭素混合ガス中にさらされた。
- 急性スライス標本における fEPSP 計測：メンブレン上で数時間室温にてリカバリーし後に、神経活動計測用のチャンバー (水温 32 度) に移し、aCSF 還流条件 (流速 10ml/min) で各種計測を行った。刺激電極は双極のタングステン電極を用い、記録には aCSF を重点したガラスピペットを用い、in-vivo 標本と同様に fEPSP を記録し、LFS 刺激を行った。

急性スライス海馬標本の作成と fEPSP 計測：

- 実験動物：C57BL6N/clr の 7-10 ヶ月齢 (adult 群) および 23-25 ヶ月齢 (aged 群) を用いた。
- AD 脳抽出液標本：帝人ファーマによって大阪市立大学が保管する AD2 検体の脳 (No14, 17) の一部 (5g) よりタウオリゴマーを多く含んだ画分を作成した。冷凍保存された脳組織を 6 倍量の HEPES-buffered aCSF (119 NaCl, 2.5 KCl, 1 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose, 10 HEPES, pH 7.4) 中でホモジネートし、27,000g にて遠心分離した上澄みをさらに 150,000g で分離することで得たペレットを HEPES-buffered aCSF にて希釈し、凍結保存した。
- スライス脳作成：動物を頸椎脱臼し、グルタミン酸ブロッカーであるキヌレン酸 (1mM) を含んだ氷温 aCSF 中で脳とともに海馬を摘出し、ビブラトーム (Lica 12000) により矢状断面スライス標本 (厚さ 350 μ m) を作成した (氷冷キヌレン酸 aCSF 中で切断)。切片は培養用インサートメンブレン (ポアサ

イズ 8 μm) 上に置かれ、95%O₂/5%CO₂ 雰囲気下で aCSF との界面培養条件で保持された (室温)。

- 抽出液刺激：スライスは培養開始から 1.5-2 時間後、aCSF にて 10 倍あるいは 50 倍希釈された AD 脳抽出液標本と培養液 (aCSF) を置換することで抽出液刺激を開始した。刺激溶液の作成は刺激開始の 30 分前に行い、95%O₂/5%CO₂ ガスにて十分バブリングしたものをを用いた。また、抗体を作用する場合は刺激溶液作成直後に混入させた (タウ抗体 1 (5.8mg/mL) では刺激溶液 1ml につき 10μl、非タウ抗体 1 (8.8mg/mL) では 6.6μl 作用)。刺激時間は 3.5-4 時間であった。
- リコンビナントタウオリゴマーの作成：N 末に 6xHis タグを付したヒトの 4N2R タウを大腸菌で強制発現し、ホモジナイズ後、Nickel カラムにて分離/精製した。精製されたタウは、Alejandra et al (2006) の方法に従って、若齢マウスより得た脳抽出液によりリン酸化し、37°C にて 2-3 日間放置することで、オリゴマーを含むリン酸化タウ抽出液を得た。タウ抽出液を超遠心 (100Krpm) することでモノマーとオリゴマーとを分離し、得られたペレットを aCSF に再懸濁することでタウオリゴマー抽出液を得た。タウオリゴマー抽出液は分注され、使用される直前まで -80°C にて凍結保存された。
- シナプス電位計測：抽出液刺激完了後、培養液は再び aCSF として、少なくとも 1 時間は界面培養条件で保持した。電気計測は、95%O₂/5%CO₂ ガスをバブリングした aCSF (溶液温度は 32 度) を 2ml/分の速度で巡回灌流した計測チャンバーにて行った。スライスをチャンバーに移動させた後、CA1 のシャフター分枝経路に刺激電極 (双極タングステン) と記録電極 (ガラス電極) を配置した。実際の計測は記録された fEPSP (誘導性シナプス後電位) が安定するのを待って行った。テストパルス刺激 (100μsec 幅) の間隔は 30 秒であった。必要に応じて刺激強度を変化させシナプスの伝達効率への影響も検討した。シナプスの長期促進 (LTP) を誘導する場合はシータバーストパターン (100μsec 幅の電気パルスが 10ms 間隔で 4 回発生し、この 4 パルスバーストが 200msec ごとに 10 回起こる。実際の海馬神経活動を模した刺激パターンであり、抑制神経の影響を受けにくいとされている。本実験ではこの刺激エピソードを 3 分ごとに 3 回行った) を用いた。電位計測データは自作の AD 変換システムによりコンピューターに保持され、Matlab ベースの自作ソフトで解析を行った。

長期器官培養海馬標本の作成と各種計測：

- 長期器官培養海馬標本の作成：動物をイソフラレン雰囲気中で麻酔、断頭後、氷温 aCSF (気にリン酸を含む) 中で脳標本を摘出した。摘出した海馬標本は、約 2 分氷温 aCSF に放置され、その後チョッパーを用いて、400 μ m の暑さに裁断された。裁断後海馬スライスを通常の aCSF でよく洗い、0.8 μ m ポアサイズのメンブレンに載せた。標本はメンブレン上で培養液 (最小栄養培地:aCSF:正常馬血清=4:4:2) の気水面に保たれ、95%酸素 5%二酸化炭素混合ガス中で保持された。
- 長期器官培養海馬標本における fEPSP 計測：3 週間程度培養し安定した海馬器官培養標本を用いて各種計測を行った。fEPSP 計測は、メンブレンと共に標本を神経活動計測用の 64 チャンネルの電極を底面に持つ多電極チャンパー (MEMsystems) に移動することで行った。標本を電極面に接着するように配置し、最も効率よく fEPSP を誘導できる電極を検索して、以降これを刺激電極として用い、最も大きな fEPSP を発生した電極を記録電極として用いた。aCSF 還流条件 (流速 1ml/min) で各種計測を行い、水温は 34 度であった。
- 長期器官培養海馬標本における樹状突起形状と樹状突起内 GluR 動態の計測：器官培養海馬標本において、様々な状態での AMPA 受容体の分布を調べるために、NMDA 刺激前後の色々なタイミングで 4%パラホルムアルデヒドにて組織固定を行い、幾つかの神経を蛍光色素 (ルシファーイエローなど) を細胞内注入することで可視化し、さらに受容体の分布を免疫蛍光法により可視化した。蛍光分布の獲得は Lica 製共焦点顕微鏡 (共同利用推進室所有) を用いて行い、撮像は xyz 軸ともに 100nm ピッチで行った。得られた画像データは、Matlab 上で展開され、細胞内注入した蛍光色素のシグナルを手がかりに樹状突起空間を定め、定めた樹状突起空間中の GluR 蛍光の強度と分布を得た。
- 樹状突起空間決定方法：組織固定後に細胞内に注入された蛍光色素を手がかりに樹状突起内の空間を切り分けるためのソフトを独自開発した。自作ソフトは指定した樹状突起の長軸に直行した断面 (60 μ m 四方) を定義し、断面中での突起部分を前の断面との連続性と定義した断面ごとの輝度分布を手がかりに定められた閾値によって定められる高輝度領域として定義された。細胞内注入法は注入部位からの距離で染色性が変化するが本方法では動的に閾値

が設定されるため、長い距離で安定な樹状突起検出を行うことが可能となっている。また、顕微鏡の空間分解能の論理的限界を考慮し、突起内部空間としては実際に定められた空間のエッジより重心方向に約 0.2 μm 縮小した空間を用いた。

(倫理面への配慮)

DNA 組換え動物の使用に関する事項について：本研究で使用するタウノックアウトマウスは国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験倫理委員会の承認のもとに、逃亡拡散を防ぐため P1A 飼育室で厳重な管理のもとに飼育する。新たな形質転換体を入手する場合は、法的な手続きおよびセンター規定を遵守する。

遺伝子導入実験について：本研究で使用する AAVDNA 作製とマウスへの導入は、国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験倫理委員会の承認のもとに、法的な手続きおよびセンター規定を遵守して行う。

C. 研究結果

1 「孤発性タウオリゴマー形成の機序解明と、これを応用した汎用化合物スクリーニング系の開発」

1.1 野生型マウスを用いた加齢依存的刺激依存的タウオリゴマー形成

1.1.1. シナプスの長期抑圧形成 (LTD) にともなうタウオリゴマー形成：

最近、神経細胞にシナプスの長期増強を誘導する刺激を与えると、タウのリン酸化が起こることが報告され、タウそのものが LTD の形成に必須なタンパクであることが示された (例えば Kimura et al 2013, Philo. Trans. B)。本研究では LFS 形成とともにタウオリゴマー形成が成される可能性を検討した。標本は麻酔した加齢した野生型マウス (20-24ヶ月齢) を用い、海馬に低頻度頻回刺激を与え、刺激終了直後、30分後、60分後に刺激した海馬と反対側の海馬を採取し、サルコシル不溶ペレット中のタウ量を調べたところ、サル

コシルに不溶化したタウが刺激下側の海馬で顕著に増大していることが判った。このような増大は LFS を行わないシャムコントロールでは起きなかったので、LFS によりサルコシルに不要化したタウの形成が起こることが示された。さらに、得られたペレット中のタウ交代要請物の形態を電子顕微鏡で調べたところ、ペレット中には繊維状の構造体はなく、いくつかのタウ抗体のクラスタが散在しており、タウオリゴマーが形成されていたものと考えられた。さらに刺激した組織の免疫電子顕微鏡像においても同様なタウクラスタが樹状突起中で観察され、樹状突起内でタウオリゴマーが形成されていることが明らかになった。さらに、繊維状タウ凝集体に選択制が低くタウオリゴマーに選択制の高いとされるタウ抗体 (T22, Millipore) を用いた免疫沈降実験を P2 フラクシオンで行い、T22 により認識されるタウオリゴマーも刺激に依存して増量していることも確認した。次に、若齢の動物で同様の実験を行い、LFS によるサルコシル不溶性タウオリゴマーの形成効果は加齢に従って増強することが明らかになった。

1.1.2 LTD 形成機序の加齢変化 :

次に、LFS 誘導型 LTD そのものの加齢依存性を調べた。マウスではラットで報告されている NMDA 受容体依存 LTD、すなわち LFS で誘導される LTD の加齢依存的減衰はスライス標本 in-vivo 標本共に観察されなかった。また、幼若期のマウスで報告されているプロテオソーム阻害剤 (MG132) 感受性は、若齢期では確認されたが (図 2 右列上、MG132) 加齢依存的に失われることが明らかになった (図 2 右列下、MG132)。一方で、もう 1 つの重要なタンパク質分解経路であるオートファジーを 3-MA およびバフィロマイシンを用いて抑制したところ、両者ともに、幼若期では顕著な影響を示さなかったが、高齢期において強い LTD の抑制を誘導することが判った (図 2 左列下および中列下)。これらのことより LTD における AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) の代謝経路は加齢と共にプロテオソーム経路からオートファジー経路に移行していることが明らかになった。

1.1.3. LFS 誘導型タウオリゴマー形成のオートファジー依存性:

LTD に付随する AMPA 受容体代謝経路の加齢依存的変化と同様に LTD に付随するタウオリゴマー形成現象との関係を調べる目的で様々な検討を行った。先

ず、LFS に伴って刺激側の LC3 typeII/typeI 比が反対側のそれと比べて、これが有意に高い傾向を示すことを確認して、高齢組織では LFS はオートファジー経路を活性化する刺激であることを見出した。次に、T22 で認識される分子集合体の解析を行い、これに GluA2AMPA 受容体サブユニットが含まれること、また、オートファゴソームと特定のタンパクの間を介在するブリッジタンパク (NDP52) もこれに含まれることを確認した。次に、ブルーネーティブ電気泳動法によって T22 で認識される分子集合体の大きさを確認したところ、500kD から 1000kD サイズの集合体が認識されていることが判り、AMPA 受容体 (4 サブユニット合計が 400kD 程度) を含み得る巨大な分子集合体が認識されていることが示され、LFS はこの集合体のサイズも変化させていることが明らかになった。さらに、免疫蛍光法によって組織化学的に LC3 と GluA2 との間に明確な相関が存在していることも確認し、高齢組織においてはオートファゴソーム上でタウと AMPA 受容体のトラフィックは交差し関連していると結論した。

1.1.4. 刺激誘導型タウ病理形成の可能性:

これらに加えて、オートファジー経路の薬理的抑制効果を調べた。まず、オートファゴソームの形成を阻害する 3MA を用い、これを LFS 前に脳室内に投与した。既に報告されているようにリン酸化タウの蓄積が P2 分画で観察され、刺激部が与えられた海馬で特に多い傾向を示した。一方でサルコシル不溶性タウを調べたところ、LFS 誘導性のタウオリゴマーの形成が阻害された。これらのことからオートファジーはリン酸化タウ量を調節する機能を持ち、これを実行する過程でタウがオリゴマー化していると予想された。さらに、オートファゴソームの代謝を阻害する Bafilomycin を LFS 後に投与したところ、明らかなサルコシル不溶性タウの全体的増大が起るだけでなく、60 あるいは 64kD タウとして知られる高度にリン酸化したタウが見られるようになった。電子顕微鏡観察によって、この高度リン酸化サルコシル不溶性タウ凝集体は通常のタウオリゴマーの形態 (顆粒状) と異った形状を示し、PHF (paired helical filament) ではないものの繊維性の形状を示すより病的タウ凝集体に近い構造体であることがわかった。これらのことから、オートファジーライソソーム経路は一定の条件のもとで、病的タウ凝集体のソースとなり得ることが明らかになった。

1.2 タウオリゴマーのシナプス毒性メカニズムの検証

1.2.1 AD抽出液刺激効果とタウ抗体の作用の確認：

高齢個体より得たスライス標本で溶液刺激後、LTP誘導効率の明らかな減衰が起こることが確認された。このことは、Cristian A et al が示したタウオリゴマーのシナプス毒性が、本研究でもちいたAD脳由来の抽出液にも存在することを示唆する。この毒性がタウ由来であることを明らかにするために、リン酸化タウ抗体タウ抗体1を予め抽出液に作用し、LTP抑制に与える影響を調べた。その結果、LTP抑制効果はタウ抗体1によりブロックされることが示され、このAD抽出液刺激効果はタウ依存的と考えられた。

1.2.2 もう1つのAD抽出液刺激効果（シナプス抑圧効果）：

AD抽出液刺激効果を検証したところ、aged群ではLTPの抑圧効果だけでなくベースレベルでのシナプスの伝達効率そのものが減衰することがわかった。各実験群のいわゆるinput/output (I/O) 曲線を比較したところ、AD抽出液刺激群 (p2) はコントロール群 (aCSF) に比べてシナプスの伝達効率が劣っていることを示す。重要なことはこのシナプス伝達効率の減衰は、抽出液刺激後数時間（少なくとも2時間）は維持されている長期的効果であることで、少なくとも高齢海馬のシナプスではタウオリゴマーが長期抑圧を誘導している可能性を示している。より若齢なadult群ではこのような明確な変化はこれまでのところ見出していなく、加齢依存的な効果である可能性が示された。

1.2.3 シナプス抑圧効果におけるタウ抗体作用：

これまでの結果によりAD抽出液刺激によってLTPの抑圧だけでなくベースレベルでのシナプス抑圧も誘導されることが明らかになった。この2つの効果が従属的なものか独立的なものかは明らかではない。一方で、直接的なシナプス抑圧はLTPの効果に比べて計測時間が短く、より効率的な抗体や化合物の評価が可能なタウ毒性計測系を提供する。このことから、シナプス抑圧効果におけるタウ抗体（タウ抗体1）および対照抗体（非タウ抗体1）の作用を比較し、シナプス抑圧効果がタウ依存的である実証するとともに、タウ毒性試験の評価系としての可能性を検討した。結果としては、タウ抗体1はシナプス抑圧効果をブロックできるが（2つの群が1つの回帰曲線を共有する確率 $p < 0.001$,

extra sum-of-squares F-test)、非タウ抗体 1 はそれができないことが明らかとなり (Fig 5 p2 および p2+非タウ抗体 1, 2つの群が1つの回帰曲線を共有する確率 $p=0.75$, extra sum-of-squares F-test)、高齢海馬スライスに於けるシナプス抑圧もタウ依存性の効果であることが強く示唆され、より簡便なタウ毒性評価系として抑圧効果を用いることが可能であることが示された。

1.2.4 シナプスの脱抑圧におけるタウ抗体 1 の優位性の検討 (1 ; 他のタウ抗体との比較) :

これまでの結果によりタウ抗体 1 には P2 フラクションが誘導するシナプス抑圧を抑制する効果、すなわち脱シナプス抑制効果があることが明らかになり、P2 フラクションの有するシナプス毒性はタウ凝集体に由来することが示された。次に、タウ抗体 1 の有効性を検証する目的で、タウ抗体 2、タウ抗体 3、タウ抗体 4 をタウ抗体 1 と同様に作用し (全ての IgG 量は 0.58mg/ml)、fEPSP 計測を行った。その結果、タウ抗体 2 及びタウ抗体 3 には脱シナプス抑制効果は見られない一方で、タウ抗体 4 はタウ抗体 1 とほぼ同様な効果を持つことが明らかになった。タウ抗体 2 及びタウ抗体 3 は n 末付近のエピトープを認識する抗体であり、タウ抗体 4 及びタウ抗体 1 は c 末付近のリン酸化エピトープを認識する抗体であることから、タウのシナプス毒性消去における c 末抗体の有効性が明らかになった。

1.2.5 リコンビナントタウオリゴマーによるシナプス抑制 :

タウ抗体 1 の解析は少なくとも加齢した脳組織では AD 由来のタウオリゴマーを多く含む脳抽出液がシナプスの抑圧を誘導し、それを特定のエピトープを持つタウ抗体で脱抑圧することが可能であることを示した。この効果が確かにタウオリゴマーによるものであるのか否かを検討するためにリコンビナントタウを作成し、これを Alejandra et al (2006) の方法に従って高度にリン酸化することでタウオリゴマーを形成した。得られたオリゴマーを 1.2.3-5 と同様に海馬スライスに投与したところ、AD 由来抽出液と同様なシナプス毒性が確認され、この毒性がタウオリゴマーの作用であることがさらに明確になった。

1.3 海馬器官培養系を用いた新規タウ機能の検索とタウ機能イメージング

これまで紹介した研究と並行して器官培養海馬を用いた研究プラットフォームの開発を開始した。本研究ではタウによるシナプス制御の実態をあきらかにし、細胞内に蓄積するタウオリゴマーの示すシナプス毒性をターゲットとした創薬スクリーニングシステムの開発を最終目的とし、これを達成するために細胞内におけるタウの生理的役割を明らかにする手法を開発することを目指した。

1.3.1 細胞質内 AMPA 受容体を検出する方法およびソフトウェアの開発：

これまでに電気生理的手法によって、NMDA 刺激による LTD 誘導可能な標本であることを確認し、スパイン形状や各種受容体発現量の生化学的解析を行うことで実験に適切な培養期間（4 週から 8 週）を定めた。さらに、上述したようにタウあるいはタウオリゴマーは AMPA 受容体の代謝系に影響をあたえている可能性があり、直接細胞内の AMPA 受容体の分布を調べる為のイメージング手法の開発を行った（手法の詳細は方法を参照）。作成したソフトウェアは染色した神経の樹状突起を有効に切り出し、並行して免疫染色した受容体の突起内分布を明らかにした。

1.3.2 生化学的に見た NMDA 応答におけるタウの役割：

本手法および生化学的手法を用いて LTD 誘導時の AMPA 受容体の動態を解析し、タウノックアウト標本と比較することで、タウの生理機能を検討した。スライス培養神経ネットワークに AMPA 受容体ブロッカー存在下で NMDA を作用することで、LTD を安定して誘導できる。実際に、粗シナプス画分 (P2) の RIPA 不溶性画分 (シナプス後膜 post-synaptic density を多く含む画分 ; PSD 画分) の GluA2 シグナルは優位に減少し、少なくとも 60 分は低いレベルで維持された。従って、本システムにおいても NMDA 誘導 LTD は誘導されていることが確かめられた。同様な実験をタウノックアウトより得た標本で行ったところ野生型で見られた AMPA 受容体の減少がみられず、確かにタウノックアウトによる LTD の障害が起こっていることが確認された。また、粗シナプス画分 (P2) の RIPA の可溶性画分 (pre-synaptic vesicle や endosome を多く含む画分) においても、野生型標本では優位な GluA2 シグナルの減少が観察され、タウノックアウトにおいては観察されなかった。従って、シナプスの

AMPA 受容体制御におけるタウのノックアウト効果は NMDA 作用の減衰または何らかの受容体トラフィックの障害によるものと推察された。

1.3.3 樹上突起内 GluA2 トラフィックにおけるタウの役割：

これまでのシナプス分画法による解析は基本的にスパインーシナプスにおける AMPA 受容体の動態を表していると考えられる。次に、スパインを含まない樹状突起における GluA2 シグナルの動態を検討するために、蛍光ラベルした樹状突起内部の GluA2 シグナルの動態解析を行った。その結果、定常状態における樹状突起内 AGluA2 シグナル強度において野生型とノックアウト神経との間に有意な違いが見られた。すなわち、定常時、ノックアウト神経の樹状突起内部はより強い GluA2 シグナルを示した。また、NMDA 投与によって野生型突起内の GluA2 シグナルは一過性に増大したが、ノックアウトにおいては逆に大きく減少した。樹状突起内の GluA2 はエンドソームシステムに局在しており、蛍光イメージングでは puncta として認識される。より詳細な解析によって、野生型では GluA2 puncta のサイズが増大していること、すなわちエンドソームにおける GluA2 の蓄積が誘導されることで LTD が誘導されていることがわかった。野生型では GluA2 puncta の密度には NMDA 投与の影響は見られなかった。次に、タウノックアウトにおいても NMDA 反応の詳細を調べた。タウノックアウトでは、NMDA 投与による GluA2 puncta のサイズの増大は起ることなく、統計的に有意な変化を認めることができなかった。一方で、GluA2 puncta 密度が刺激後に一過性に減少していたことが明らかになった。puncta サイズには大きな変更が見られなかったことと考え合わせると、GluA2 puncta 密度の減少は GluA2 puncta の空間的安定性の欠如によるものと予想される。これらの結果は LTD 形成における樹状突起内 GluA2 ストック及びその空間配置の重要性を示しており、タウはこれらの過程に介在することでシナプスの可塑性に強い影響を起こしていたと考えられた。

2. 「加齢動物の脳活動の特徴の解明と特徴形成に拘るタウの寄与の解明」

自由行動下での加齢マウスの海馬神経活動を計測することで加齢いた脳活動の情報理論的特徴を明らかにし、さらにタウノックアウトのそれと比較することで脳の加齢におけるタウまたはタウオリゴマーの寄与を明らかにする

ことを目的とする。本年度はベースとなる加齢野生型マウスの神経活動の特徴を解析した。詳しい内容は分担研究枠に記載した。

D. 考察と結論

本研究によってタウのオリゴマー形成が単純なタウ~タウ相互作用だけによる受動的過程によるものでなく、脳神経系の老化メカニズムとシナプス可塑性メカニズムに根ざした積極的な過程であることが理解された。ヒトの海馬周辺皮質では加齢に伴い非常に高い頻度でタウの凝集が観察されることが知られている。ネズミの perirhinal/entorhinal 皮質における LTD 形成は「感覚入力内の新奇個物の発見」に重要な役割を担うとされる。従って、海馬周辺皮質の主要な機能にリンクした生理過程に伴ったタウの蓄積は十分に考えられ、本研究が明らかにした LTD 誘導性タウオリゴマー形成機序は老化初期の自律的タウ蓄積メカニズムの重要な1つと想定される。さらに、本研究で明らかになった重要な事実として、加齢した神経細胞ではシナプスの情報伝達で重要な役割を果たす AMPA 受容体の代謝経路がリン酸化タウの代謝経路と共有されていることが上げられる。具体的メカニズムの詳細は明らかになっていないが、AMPA 代謝系との共有化がオートファジー経路でのタウオリゴマー形成を促したように、タウあるいはタウオリゴマーの蓄積が AMPA 受容体の細胞内動態に大域的に影響する可能性がある。従って、オートファジー-AMPA 受容体-タウ代謝経路は新たなタウオパチー型認知症治療のターゲットとなりうる。

【シナプスにおけるオートファジーの関与と加齢依存的変化】

最近になって、リン酸化タウの駆除にオートファジー経路が重要な役割を担うことが報告された。本研究において、加齢期においてもオートファジーの抑制がリン酸化タウの増量をもたらすことを示した。従って、リン酸化タウの除去というオートファジー機能は加齢に依存することのない神経系特有の機能と言える。

また、Shehata 等 (2012) は LTD を誘導する NMDA 刺激によってもオートファジー経路が活性化し、スパイン近傍に LC3 シグナルが蓄積するということが既に報告している。本研究においても、LFS によって誘導される LTD 形成にも付帯して typeII の LC3 の増量がみられることからオートファジーの活性化が

起こっていることが示唆された。一方で、我々も含めた複数の研究室より、NMDA 誘導型 LTD の形成に伴って PHF 1 サイト (ps396 および ps404) リン酸化がおこることが報告されている。これらの実験事実を考え合わせると、LTD に付帯して活性化されるオートファジーの本来的役割の 1 つとして誘導されたリン酸化タウの除去あることが考えられる。

一方で、本研究は加齢時には LTD の形成にオートファジー経路が重要な役割を果たしていることを発見しただけでなく、若齢時に LTD 形成に重要な役割を果たすことが報告されていたプロテオソーム系の役割が加齢とともに消失していることも示した。これは LTD の形成に必要な AMPA 受容体代謝経路の切り替えが起きていることを示しており、これまでに報告されていない新しい脳神経系の加齢様式と言える。Keller 等 (2000) はラット海馬や脊椎のプロテオソーム活性が加齢とともに大きく減少することを報告しており、AMPA 代謝経路の切り替えはこのグローバルな変化に付随した補償的变化という可能性もある。

【タウの集積／重合とオートファジー】

オートファジーの形成が重合したタンパクの除去に重要な役割をしていることは繰り返し報告されている。例えば、Clucken 等 (2012, Autophagy) はビフォマイシンによる後期オートファゴゾーム形成の阻害は α シネクリン重合体を増量する一方で α シネクレイン由来の細胞毒性を提言すると報告している。今回詳しく報告しなかったが、同様にバフィロマイシンによってオートファジー経路の後期過程を阻害するとタウオリゴマーが増量することを確認しており、タンパク重合体の制御におけるオートファジー経路の重要性に関しては高い一般性があると考えている。

一方で、オートファジーがタンパクの重合に重要な役割を持つとの報告もある。ドイツマックスプランク研究所の Mandelkow とその共同研究者らはそれ自身で非常に重合性の高い変異タウ ($\text{Tau}_{\text{M0}} \Delta \text{K}$) の細胞内重合制御機構を調べて、シャペロン介在オートファジー経路を介してリソソーム表面で濃縮／重合することを見出した (例えば Wang 等 2012, Autophagy 参照)。この場合、マクロオートファジー形成を 3-MA で抑制した場合 $\text{Tau}_{\text{M0}} \Delta \text{K}$ 重合体は増量する。我々は野生型のマウスタウが一過性に重合体を形成する場合を調べ、3-MA 感受性のあるマクロオートファジーが重合体形成に重要な役割を果たしている可

能性を示した。両者は用いたタウ種が大きく違い、さらに LTD 形成といった特別な細胞環境を想定しているか否かも全く異なる。それにも関わらず2つの研究は非常に重要な結論を導く。すなわち、細胞内で起こるタウ重合の少なくとも初期過程は何らかのタンパク集積過程を介在してなされるということである。タウオパチーには多くの形態のタウ封入体が報告されているが、そのバリエーションは使用されるタンパク集積メカニズムの違いを反映しているのかもしれない

【細胞外タウオリゴマーのシナプス毒性】

本研究は細胞外タウオリゴマーによるシナプス抑圧メカニズムを検討した。AD 由来タウオリゴマーの研究で、加齢依存的には AD 抽出液がシナプス抑制を誘導することを見出して、これを基にしたプレリミナルな化合物スクリーニング系を設計した。このスクリーニング系によって、AD 抽出液が誘導するシナプス毒性を最も効率よく抑制するタウ抗体を見出した。本研究成果は帝人ファーマ社と米国メルク社との共同研究へと発展し、将来的は臨床試験が行われる予定である。一方で、本研究では独自にこの現象の解析を推し進め、同様なシナプス抑圧はリコンビナントタウオリゴマーによっても誘導可能であること、またシナプス抑圧には細胞内タウに依存した NMDA 誘導型 LTD 様の過程が関与していることを明らかとし、さらに細胞外タウオリゴマーは NMDA 型受容体は直接的に接着することで毒性を示す可能性を示すことができた。

先に示した様に NMDA 誘導型 LTD は細胞内タウに依存し、加齢個体では NMDA 誘導型 LTD はタウのオリゴマー形成を誘導する。従って、細胞外タウオリゴマーの刺激は細胞内タウオリゴマーの形成を誘発し、これがさらなる細胞外オリゴマーのシードとなることで、脳内タウオリゴマーは増量しさらなるシナプス抑圧を誘導することが予想される。この様に、タウ病理とシナプス障害はリンクしながら増悪することは可能であり、多くの症例報告でも両者の高い相関は報告されており、比較的進行した AD の脳でもこの過程が実際に起きている可能性がある。

【タウ病理増悪機構に基づいた創薬の可能性】

新たに発見したシナプス／タウ病理増悪機序は基本的に NMDA-LTD メカニズムを介在したものであり、シナプスの抑圧と脳内のタウオリゴマーの増大を伴う

協調的過程である。Nelson 等（2007）が示した NFT 頻度および認知症の発症と老人斑の相関図では老人斑の頻度とこれ等 2つのパラメータの間には線形な相関はないものの、積分過程を仲介する様な非線形な相関があることを示している。このことより、アミロイドによる老人斑形成メカニズムの認知症形成における関与は明らかであるものの、それに駆動される他の認知症形成メカニズムの存在も示唆している。実際、最近の老人斑をターゲットとした免疫療法の結果は、少なくともその後期過程は老人斑形成と相関を失うことを挿しめしている。この非線形性を保証する積分過程の生物学的病理学的実態がたった 1つの過程によることは考えにくいものの、ここで発見しつつあるシナプス/タウ病理増悪機序はその重要な一部をなしている可能性は高い。

CSF タウの研究は、それが加齢とともにさらには AD 発症とともに増大することを明らかにしている。残念ながら、未だに神経組織内細胞外液中の分子論的状态がヒトで明らかにされたことはないものの、タウオパチーモデルマウスではタウオリゴマーが存在しているとの報告がある。さらにタウオリゴマーの細胞内取り込みと分泌の過程は培養細胞系で確認されており、そしてそれ等は神経ネットワーク上でのタウ病理の伝搬/拡散メカニズムとして注目されている。これまでに我々は NMDA-LTD 経路を介するタウオリゴマーの取り込み/合成/分泌メカニズムを病理の増悪メカニズムとして紹介してきたが、当然のようにそれは病理の拡散メカニズムの一部を担う。これまでの研究でタウオリゴマーの細胞内取り込みメカニズムを具体的に明らかにしたものはなく、その一部を明らかにしつつあるという意味でも、本研究は注目に値するものであろう。

これ等のことから、細胞外タウオリゴマーの細胞内取り込み過程とそれに伴うシナプス抑圧過程を制御する化合物の検索は認知症克服に向けた大きなステップとなりうる。これまでも NMDA 受容体の不活性化が認知症治療の 1つのターゲットとなりうることを示されてきたが、その病態生理学的意義は明らかにされていない。本研究を介して、その介在メカニズムを明らかにし、これ等の阻害剤構造の変更をより論理的に行うことで、より汎用性の高い化合物が得られることは十分考えられる。本研究においても、より論理的な化合物スリーニングを目指したシステム開発を開始した。将来、中規模スクリーニングを行い、新奇な創薬ターゲットを見出すとともに、既存の受容体抑制剤の構造変換を行うことでより良い治療薬の開発も可能と考えられる。

【タウの生理機能】

先に、加齢時にタウまたはタウオリゴマーがオートファジーを介して AMPA 受容体の細胞内動態に影響する可能性を示した。木村等 (2007, EMBOJ) は野生型ヒトタウを過剰発現するマウスが加齢すると entorhinal 皮質でリン酸化タウの蓄積とシナプス障害が発症することを報告した。このシナプス障害のメカニズムは未だに明らかにされていないが、リン酸化タウの増量はオートファジーを介して AMPA 受容体の細胞内動態に強く影響することを示す事例とも考えられる。一方で、我々は、タウノックアウトマウスの海馬では LTD が障害されていることも既に報告した。最近の報告によると、タウの PHF1 サイトのリン酸化を抑制することでも同様な LTD 障害が誘導されるので、タウのリン酸化が LTD 形成に重要な役割を持つことも示された。この LTD 形成におけるタウの貢献は上述のオートファジーを介した作用と区別される。何故なら、今回の報告では詳しく示さなかったが、LTD 形成におけるタウノックアウト効果には加齢依存性が認められず、オートファジー経路の修飾作用とは区別される為である。

本報告書では、AMPA 受容体の動態をシナプス、スパイン、樹状突起内部と階層的に解析するというユニークな方法を用い、タウの有無が AMPA 受容体の細胞内トラフィックメカニズムに大きな影響を与えていることを示した。このことは重要であり、LFS 誘導型タウ凝集体形成が AMPA 受容体の代謝経路に依存しているという先の結論を強く支持する結果と言える。本実験でも明らかにしたように、正常な神経における NMDA 誘導型 LTD においては、シナプスの AMPA 受容体は樹状突起内部の顆粒状構造体にストックされる。MG132 などによるプロテオソーム抑制は、EEA1 陽性エンドソームの蓄積を促し、リガンドの細胞内取り込みを障害することは既に Green 等によって報告されている。基本的には AMPA 受容体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソームシステムにより処理されると考えてよい。ここで用いた分画システムでは粗シナプス分画 (P2) は EEA1 を多く含むことも報告されている

(Corera 等)。野生型の NMDA 誘導 LTD では樹状突起内の GluA2 シグナルが刺激直後に増大し、これはシグナルパンクタのサイズ変化を反映したものであり、エンドソームのマチュレーションと関係した変化と考えられる。この時、

RIPA-insoluble fraction ではシグナルの減少が起きており、受容体の移動を伴う変化と考えてよい。

一方で、タウノックアウトではパンクタ数の減少を伴うシグナルの減弱が見られた。この変化には、生化学的にみた GluA2 強度の変化が伴わなかったの
で、代謝の影響というより細胞体への移動の影響による変化と見てよい。実
際、パンクタサイズにも NMDA 投与の影響が見られておらず、このこともこの
推定を支持する。従って、本研究で示された結果は、これまでに示されること
のなかった新たな樹状突起タウの新たな機能を明らかにしたと言える。すなわ
ち、タウは細胞内 GluA2 ストックすなわち GluA2 含有理サイクリングエンドソ
ームの空間安定性を保証することで、グルタミン受容体トラフィックを安定化
する機能を有している。細胞内 GluA2 ストックがシナプスの可塑性の発現に非
常に重要な役割を果たしていることは多くの報告であきらであり、タウの過剰
リン酸化やオリゴマー形成などによる分子的变化が直接的に可塑性に影響する
可能性は高い。タウ病理形成とタウ機能との関係を明らかにすることで、新た
な創薬ターゲットが見出される可能性は高い。

E. 健康危険情報

なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Contribution of the nucleus accumbens core (AcbC) on behavior control during a leaned resting period: introduction of a novel task and lesion experiments. C. Sato, M. Hoshino, N. Ikumi, K. Oba, O. Shouno, T. Sekiguchi, T. Kobayashi, T. Machida, G. Matsumoto, H. Furudate, T. Kimura (責任著者), PloS ONE, 9(4):e95941 (2014)
- 2) Female hippocampus vulnerability to environmental stress as precipitating factor in tau aggregation pathology. I. Sotiropoulos, J. Silva, T. Kimura, A. J. Rodrigues, P. Costa, O. F. X. Almeida, N. Sousa, A. Takashima, J. Alz. Des. 43(3): 767-774, (2015)
- 3) Y. Soeda, M. Yoshikawa, O. F. Almeida, A. Sumioka, S. Maeda, H. Osada, Y. Kondoh, A. Saito, T. Miyasaka, T. Kimura, M. Suzuki, H. Koyama, Y.

Yoshiike, H. Sugimoto, Y. Ihara, A. Takashima. Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups. Nat Commun.16:10216. (2015)

- 4) M. Suzuki, T. Kimura (責任著者) Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways. Neurosci. let. in Printing (2017)

2. 学会発表

- 1) 鈴木真美子, 木村哲也 「シナプス可塑性におけるタウの役割」 第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日、横浜
- 2) Tetsuya Kimura Contribution of Tau on Physiological Functions and Pathogenesis 第 38 回日本神経科学大会 シンポジウム, 2015 年 7 月 28 日 神戸市
- 3) Sato C, Hoshino M, Ikumi N, Oba K, Koike A, Kobayashi T, Machida T, Furudate H and Kimura T. Contribution of Nucleus Accumbens Core (AcbC) to Behavior Control during a Learned Resting Period. 第 40 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 37 回大会 合同大会, 2015 年 12 月 11-13 日, 広島市

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし