

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

タウ関連タンパク質の翻訳後修飾を標的とした治療薬開発  
(23-38)

主任研究者 吉池 裕二 国立長寿医療研究センター  
アルツハイマー病分子病態・治療開発プロジェクトチーム (プロジェクトリーダー)

研究要旨

酸化ストレスは老化や加齢とともに生じる神経変性疾患の原因と考えられている。一方、最近の報告によるとある条件下では酸化ストレスが老化に対して抑制的に働くとされる。我々はタウを過剰発現させた神経細胞と遺伝子改変マウスを用いてアロキササンという薬剤によって生じる軽度の酸化ストレスが神経変性疾患の一つであるタウオパチーの症状の幾つかを軽減することを報告した。またポリフェノールなどの低分子化合物がβアミロイドの凝集を抑制するといった内容の共同研究に協力することができた。更に以前行ったアルツハイマー病における GABA 抑制機構についての研究を関連する文献を交え総説としてまとめた。

主任研究者

吉池 裕二 国立長寿医療研究センター

アルツハイマー病分子病態・治療開発プロジェクトチーム (プロジェクトリーダー)

分担研究者

なし

A. 研究目的

アルツハイマー病患者は世界中で3000万人に達するという報告もあり、特に高齢化が進む先進国間で速やかな対応策が必要とされる疾患の一つである。本研究プロジェクトの目標はアルツハイマー病の病態を分子レベルで解明し、それに基づき治療法を探し出すことにある。私はこれまでβアミロイドを標的とした研究を神経化学的手法を用いて行い、その研究から GABA 抑制の過剰な亢進がアルツハイマー病における認知機能の低下につながることを報告した。このことに基づき GABA 抑制を阻害する薬剤がアミロイドを過

剰発現するモデルマウスの認知機能を改善することを見つけた。これらのことを他の知見と合わせて総説としてまとめることはこれからその方向性を進めるにあたり重要ではないかと考えた。またアミロイドを標的とした研究を行っている共同研究者との連携も引き続き行っていくことで様々な視点からアルツハイマー病の病態及び治療開発に挑めると考えられた。このような経緯もあり分子病態から治療へという GABA 抑制の研究から培った研究の進め方をもう一つの原因タンパク質タウを標的に応用することにした。タウが主成分である神経原線維変化の形成頻度は認知機能の低下とよく相関することが知られている。また脳の老化の関連も示唆されていることからタウ病変と老化の關係に着目した。老化の原因として最も有名なのが酸化ストレスである。酸化ストレスはタウのリン酸化を亢進することで神経原線維変化の形成を促進するという報告がある一方、ある種の酸化ストレスはタウのリン酸化を抑制するといった報告もある。アロキサンという薬剤をマウスの腹腔に投与すると活性酸素を発生して膵臓の  $\beta$  細胞を破壊して一型糖尿病を引き起こすことが知られている。またこのときマウス脳内のタウのリン酸化は亢進する。アロキサン投与はタウを過剰発現する遺伝子改変マウスにおいてどのような効果があるか検討するとともにタウ病態を軽減するような条件が見つかるか検討した。

## B. 研究方法

はじめにアロキサンが糖尿病様の症状を生じる濃度を野生型マウスを用いて検証した。文献等からおおよその濃度は知られているのでその付近の濃度をかえて腹腔内に投与した後、マウスの体重を量るとともに血液を採取して血糖値を測定した。これにより体重の減少や血糖値の増加といった一型糖尿病に特有の症状が出る濃度を特定した。次に糖尿病を引き起こす濃度のアロキサン投与の結果マウス脳内のタウ分子への影響を生化学的に解析した。野生型マウスとタウの遺伝子改変マウスにそれぞれアロキサンを投与して体重の低下および血糖値の増加を確認後、脳を回収しホモジェナイズ後ウェスタンブロット法にてリン酸化タウや不溶性タウの量を検定した。次に体重の減少や血糖値の有意な増加が見られない濃度のアロキサン投与では脳内に酸化ストレスが生じるのかどうか検討した。これは酸化ストレスのマーカである過酸化脂質 MDA の量を脳のホモジェネートから測定することで見積もった。また生化学解析を行う前に認知機能への影響もモーリス水迷路等の行動実験を行うことで検討した。

動物実験については予め動物実験倫理委員会へ申請し承認を受けた。また実際に実験するにあたっては動物愛護の精神に則ってこれを遂行した。

## C. 研究結果

様々な濃度のアロキサンをマウスに投与した結果濃度依存的な体重と血糖値の変化が確認できた。体重が減少し血糖値が増加する濃度のアロキサン投与したマウスの脳を生化学

的に解析したところ、野生型マウスではリン酸化タウに対する抗体の反応性が著しく増加することが分かった。一方タウを過剰発現した遺伝子改変 (TG) マウスに高濃度アロキサンを投与した場合はリン酸化タウに大きな変化は見られなかった。その理由の全貌ははっきりしないが、アロキサン投与した TG マウス群の GSK3 $\beta$  量が有意に減少していたこと、にもかかわらず不活性状態を示すリン酸化(Ser9)GSK3 $\beta$  の反応性が増加していたことが考えられる。このようなこと、またある条件下では酸化ストレスがタウのリン酸化を抑制する以前の報告などを考え合わせ更にアロキサン投与によるタウ病態への影響を検討した。体重の減少や血糖値の増加といった糖尿病の症状が出ない濃度のアロキサンをマウスに投与した。このとき脳ホモジェネート中の酸化ストレスのマーカーである MDA の量を測ったところわずかながら有意にアロキサン投与群での増加が観られた。すなわち脳内に軽度な酸化ストレスが生じたことを示している。次に生化学的な解析から TG マウス脳内の不溶性画分のタウが低濃度アロキサン投与によって減少したことがわかった。この不溶性タウの減少は MDA つまり酸化ストレスの増加と相関した。次にタウの生理的機能の一つである微小管の安定性について検討した。様々な議論はあるものの安定な微小管にはアセチル化されたチューブリンが多く含まれることが知られている。アロキサン投与群ではアセチル化チューブリンに対する抗体の反応性が増加していた。またこれに伴ってその脱アセチル化を担う酵素 HDAC6 の量が減少していた。さらに低濃度アロキサン投与したタウ TG マウス群では加齢に伴う HDAC2 やリン酸化タウの減少と空間記憶の間に正の相関が確認された。

GABA 抑制に関する総説は投稿して出版された。また共同研究についてはアミロイドの毒性が各種ポリフェノールによって抑制されることが分かり、これらの研究についても論文として国際誌に発行された。

#### D. 考察と結論

酸化ストレスは老化の原因とされていること、老化はアルツハイマー病の原因であることから酸化ストレスはアルツハイマー病の原因と考えられている。一方、最近軽度の酸化ストレスが老化に抑制的に働くといった報告が幾つかある。低濃度の活性酸素発生物質 juglone がせん虫の寿命を延ばすこと。せん虫に対して与えるグルコースの量を減らすことで寿命が延びるのは酸化ストレスが亢進しているから。さらには酵母の寿命がカロリー制限で延びる理由も過酸化水素レベルが増加するためという報告もある。これらのことから重度の酸化ストレスは老化を促進するものの軽度では老化を抑制する可能性が考えられる。もし老化が抑制されるとしたらアルツハイマー病にも抑制的に働く可能性がある。本研究の結果、低濃度アロキサン投与による軽度の酸化ストレスがアルツハイマー病の病態の一つであるタウに関連する病態に対し抑制的に働きうるということが分かった。この現象は軽度酸化ストレスが老化を抑制することで生じた結果なのかどうか検証する必要がある。このため平成 23 年度から低濃度アロキサン投与によるマウスの寿命への効果を検証している。

高齢であればあるほどアルツハイマー病のリスクは高くなるが、特に長寿国である日本においては長生きしつつアルツハイマー病にならないで済むことが求められる。長寿とアルツハイマー病にならないという2つの要素に軽度な酸化ストレスがどのように関係するか今後も追求していく。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yoshiike, Y., Yamashita, S., Mizoroki, T., Maeda, S., Murayama, M., Kimura, T., Sahara, N., Soeda, Y., Takashima, A. “Adaptive responses to alloxan-induced mild oxidative stress ameliorate certain tauopathy phenotypes.” *Aging Cell* 11, 51-62 (2012).
- 2) Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., Takashima, A., Teplow, D. B., Zagorski, M. G., Yamada, M. “Phenolic compounds prevent amyloid beta-protein oligomerization and synaptic dysfunction by site specific binding.” *J. Biol. Chem.* (2012) In press.
- 3) Takasaki, J-I., Ono, K., Yoshiike, Y., Hirohata, M., Ikeda, T., Morinaga, A., Takashima, A., Yamada M. “Vitamin A has antioligomerization effects on amyloid  $\beta$ -protein in vitro.” *J. Alz. Dis.* 27, 271-280 (2011).
- 4) 吉池裕二:「GABA 神経伝達」*認知症学*・上 69, 219-223 (2011).

##### 2. 学会発表

- 1) 第30回日本認知症学会学術集会、2011.6.30、東京 吉池裕二、及川尚人、道川誠、滝川修、高島明彦、柳澤勝彦 「タウ関連病態に影響をおよぼす因子の解析」
- 2) 第4回名古屋グローバルリトリート、2012.2.24-25、大府(愛知) 吉池裕二 「Roles of oxidative stress and insulin signal in tau pathology of Alzheimer's disease」

#### 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