

長寿医療研究開発費 平成26年度 総括研究報告

抗タウ治療薬候補の動物モデルを用いた薬効評価（26-31）

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

アルツハイマー病による認知機能低下は神経原線維変化の形成に伴って生じると考えられている。神経原線維変化はタウタンパク質が線維状に凝集して細胞内に蓄積した病理像である。したがってタウの脳内蓄積を抑制するような物質の探索が治療戦略のひとつとなっている。これまでタウタンパク質の凝集を阻害する物質がスクリーニングされてきたが、その結果見つかった多くの化合物に共通した性質は酸化還元活性であることに着目した。タウを標的とした治療薬として先陣を切るメチレンブルーにも酸化還元活性がある。私はこれまでの研究から酸化ストレスに応答して生じる適応機構がタウの代謝を促進するのではないかと考えている。生物がシステムとして有する適応応答機構は培養細胞など分離した組織では得にくい現象である。そこで *in vivo* のモデル系でタウの脳内蓄積を抑制するような物質を探索するためショウジョウバエを用いることにした。メチレンブルー投与はタウの蓄積を抑制しただけでなく行動異常も改善したものの生存率低下などの毒性もみられた。つぎにメチレンブルーと共通の機序で酸化活性を有していながら安全性の高い物質を投与したところ、毒性がなく有効性が見られた。この探索系によって見つかった物質を治療薬として開発する目的で老齢カニクイザル使用の検討を始めた。

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

少子高齢化に寿命が延びたことが相まって老年病の問題が深刻となっている。とりわけ認知症をとりまく問題は我が国にとどまらない人類の最重要課題のひとつと言える。その認知症の中でもアルツハイマー病の割合が最も高く世界中の研究者が治療法開発のためにしのぎを削っているにもかかわらず有効な薬は存在しない。私たちはアルツハイマー病の治療薬となるシードを探索し開発のパイプラインにのせるために説得力のある実験的証拠を得ようとしている。今までの研究の流れの中で何が問題で治療薬開発が成功しないのか、その理由のひとつは病気の原因と発症までの時間的ギャップがあまりにも大きいことが挙げられる。このような背景をふまえ神経原線維変化の形成と認知機能低下の度合いの相関にもとづき神経原線維変化形成阻害を標的とすることにした。タウの脳内蓄積を抑制することで学習記憶能を改善する薬のもととなる物質を見つけ出すことが本研究の目標である。

B. 研究方法

タウタンパク質の凝集阻害ではなくタウの脳内蓄積を抑制する物質を探索するため *in vivo* の実験モデルとしてショウジョウバエを用いた。ヒトタウを発現したショウジョウバエは既に作製されており、その報告によると神経原線維変化は認められないものの行動に異常が生じると言われている。私はまず生化学的に不溶性画分からタウを検出できることを確認した。またこのタウの蓄積に伴ってハエのクライミング活性（重力に逆らって登ろうとする性質）に異常が生じることを見つけた。これらの結果をふまえタウの脳内蓄積阻害剤の探索にショウジョウバエモデルが使えると判断した。

化合物は餌となる寒天の中に溶かすことで投与した。投与期間は1月間と決め、投与後クライミング活性を測定してからハエの頭部を回収した。ハエの頭部をホモジェナイズして可溶性画分と不溶性画分に分けた。各画分中のタウの量をウェスタンブロット法によって解析した。クライミング活性はハエを空のバイアルに入れて軽く台にタップしその後ハエがバイアル中を登る様子を録画し、タップしてから10秒後ハエがバイアルの底から3 cm以上登る割合から算出した。また薬物投与がハエの生存率に与える影響をみることで毒性を解析した。一つのバイアルに25匹のハエを入れ1週間に2~3回生存するハエの匹数を数えた。

タウの脳内蓄積を測る目的には主にタウをショウジョウバエの複眼に発現させた系統を用いた。また並行してクライミング活性や生存率をはかる実験にはタウを神経に発現させた系統を用いた。一方、ハエの学習記憶能を測る実験では脳のキノコ体に特異的にタウを発現させた系統を用いた。ハエが嫌う2種類の匂いをそれぞれチェンバーに流しハエを一定の時間各チェンバーに入れる。一つのチェンバーでは匂いの他に電気刺激も併せて与える。その後二つのチェンバーの真ん中にハエを放しどのくらいの数のハエが電気刺激を与えなかったチェンバーに移動するかを数える。電気刺激を与えなかったチェンバーに移動

したハエは匂いを記憶したものと解釈した。

ショウジョウバエを用いた研究から見出したタウ蓄積を阻害すると思われる化合物についてよりヒトに近いモデルで評価するために老齢のカニクイザルを用いることにした。老齢のカニクイザルには神経原線維変化も観察されており、自然発症的なアルツハイマー病モデルとして最適と思われる。しかし個体数が少ないことと時間がかかることが短所とも言える。薬剤投与の効果を評価するのに脳内のタウ蓄積に与える影響を解析するだけではもったいない。そこで認知機能を評価項目に加えた。それまで行われていた行動試験では十分に認知機能を評価できないと判断し、タッチパネル式の視覚弁別学習記憶検査装置を導入した。一度表示された形に触れたら報酬としてサルが好むペレットを与えるという原理の試験を行う。

(倫理面への配慮)

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実験指針に基づき、動物愛護の精神に則ってこれを遂行した。また組み換え DNA 実験についても遺伝子組み換え生物等にかかる遺伝子組み換え実験の承認手続きを行い承認を受けた後、当研究所における組み替え DNA 実験指針に基づきこれを遵守することで実施した。

C. 研究結果

タウの蓄積が確認できるショウジョウバエにメチレンブルーを投与したところタウ蓄積が減少した。またメチレンブルー投与によってクライミング活性の異常も改善した。しかし野生型並みに回復したという訳ではなく、メチレンブルー投与は野生型ハエのクライミング活性を低下させただけでなく生存率も著しく低下した。このように有益な効果と有害な効果、相反する二つの効果の原因はメチレンブルーの持つ酸化活性に依るところであろうと推測した。そこでメチレンブルーの酸化活性の元となっている一重項酸素を発生する化合物で安全性が良く知られたものを探した。その結果見つかった化合物の投与はメチレンブルーほど効果的ではないもののタウの蓄積や行動異常を改善した。一方メチレンブルーで見られたような毒性は検出されなかった。さらにメチレンブルー投与では致死率が高くて認知機能検査はできなかったが、私たちが同定した化合物の投与ではショウジョウバエモデルの認知機能が改善した。メチレンブルーの投与によって酸化ストレス応答やオートファジー関連分子の増加がみられたことから作用機序にそれらの分子に関わる機構の関与が示唆された。

ショウジョウバエモデルを用いて行った研究から見出した化合物が治療薬の候補となるかどうかはよりヒトに近い動物モデルを用いた評価結果に依存する。このような薬効評価のために老齢のカニクイザルの使用を検討した。当初タウの脳内蓄積に与える影響だけを

解析する予定であったが、タウを標的とした薬であるならば認知機能に及ぼす効果も解析すべきと考え視覚弁別学習記憶検査装置を導入した。これまでにカニクイザルに応用した実績はあるものの実際に使用する個体が好む報酬のペレットの種類の検討から始めた。その結果報酬用のペレットについては多くの個体が好むものを同定した。次に検査対象となる個体を選びつつ検査前の訓練を始めた。

D. 考察と結論

ショウジョウバエモデルには神経原線維変化が検出されないという報告があることから今までタウの蓄積を標的とした薬の探索にこのモデルは使用されてこなかった。このモデルから不溶性画分にタウを検出し、行動異常との相関がとれたことはモデルとしての妥当性を支持することができたと考えている。これまでタウを標的とした薬の探索は精製タンパク質の *in vitro* 凝集アッセイ系を使ってよく行われている。ここでショウジョウバエを用いる理由は単純に *in vivo* であるからよりヒトに近いといったことからではなく、ハエモデルを用いた探索の対象にストレスに対する適応応答を促進するような物質が念頭にあったためである。メチレンブルーを陽性対照に用いて新たに可能性のある物質を同定することが出来た。しかしこの物質を治療薬のシードとして開発するためにはよりヒトに近いモデルを用いた実験証拠を得る必要がある。理由は定かでないがマウスモデルを用いたメチレンブルーの薬効評価からは必ずしも 100%明確な結果は得られていない。また他の物質のマウスモデルにおける薬効評価が有効であった場合も即臨床開発に移行することにはならない。当然最終的にヒトで効く薬となるかどうかはヒトに移行する前の段階でどれだけ厳しい評価項目を突破できるかにかかっている。しかし今ある全てのモデルと実際の病気の間には少なくとも時間という大きなギャップがある。したがってアルツハイマー病の分野においては薬効だけでも正確に評価するためのモデルが必ずしもまだ構築できていない。今手元にあるモデルで最大限有望な物質を探索するとともに老齢カニクイザルを薬効評価に用いるためのモデルとして示すことが次の課題と考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉池裕二:酸化ストレスと抗タウ治療薬. *Geriatric Medicine (老年医学)*, 52 : 977-997, 2014.

2. 学会発表

- 1) Sahabudeen Sheik Mohideen, Yasutoyo Yamasaki, Leo Tsuda, Yuji Yoshiike “Effects of methylene blue and another oxidant on human tau transgenic fly models.” 12th International Conference on Alzheimer’s & Parkinson’s Diseases, March 20, 2015, Nice, France
- 2) Sahabudeen Sheik Mohideen, Yasutoyo Yamasaki, Yasuhiro Omata, Leo Tsuda, Yuji Yoshiike “Effects of methylene blue and another oxidant on human tau transgenic fly models.” Society for Neuroscience 2014, November 19, 2014, Washington DC, USA
- 3) Sahabudeen Sheik Mohideen, Yuji Yoshiike “Identification of a seed for targeting tau accumulation in drosophila model.” Cell Symposium, November 13, 2014, Arlington VA, USA
- 4) Sheik Mohideen Sahabudeen、山崎泰豊、小又尉広、津田玲生、吉池裕二 “Effects of methylene blue and another oxidant on human tau transgenic fly models.” 第33回日本認知症学会学術集会，平成26年11月30日，横浜
- 5) Sheik Mohideen Sahabudeen、山崎泰豊、小又尉広、津田玲生、吉池裕二 “Effects of methylene blue on human tau overexpressing drosophila” 第7回NAGOYAグローバルリトリート，平成27年2月13日，大府

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明者：吉池 裕二

発明の名称：タウオパチー治療薬およびそのスクリーニング方法

出願年月日：国内出願 平成26年10月22日

出願番号：特願2014-215409（国内）

出願人：独立行政法人国立長寿医療研究センター

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし