

長寿医療研究開発費 平成23年度 総括研究報告

認知症治療薬の開発を目指した抗タウオパチー薬の創出およびタウ新規機能に基づく標的分子の設定に関する研究（23-39）

主任研究者 高島 明彦 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（部長）

研究要旨

認知症治療に向けた抗タウオパチー薬開発のためタウ凝集阻害剤のスクリーニング、線虫を用いた抗タウオパチー薬のスクリーニング、新規認知症モデルマウス開発を行った。更にタウの新規機能を見だし脳老化と認知症に対する治療または予防の標的分子を見いだそうとしている。タウ凝集阻害剤スクリーニングでは *in vitro* スクリーニングから候補物質 X1 を見だし、動物モデルでタウ凝集阻害とそれに関連する神経脱落、脳機能障害の抑制を確認した。線虫を用いた研究ではタウオパチーにより運動障害を引き起こす線虫のスクリーニング系を確立し、タウ凝集阻害とは異なる機構で運動障害を軽減する化合物を得ている。この化合物の作用点を探索することで新規タウオパチー薬開発へ向けて研究を継続している。新規動物モデル開発では β アミロイドオリゴマーを形成を促進する変異を有する APP と変異タウを発現するマウスの掛け合わせマウスを作成し解析した。その結果 β アミロイドオリゴマーがタウ病変を加速することを見いだしている。このマウスモデルはアルツハイマー病治療薬開発に強力な手段となる。タウ新規機能としてタウノックアウトマウスの解析から NMDA-dependent LTD に必要な因子であることを見いだした。LTD 誘導の機構としてリン酸化タウが AMPA 受容体の取り込みを加速することを見いだした。すなわち、タウノックアウトマウスは NMDA-dependent LTD のみが抑制されるマウスである。このマウスの行動、および脳活動を Mn-enhanced MRI でモニターし、加齢に伴う LTD の増大が加齢脳の機能維持には必要で、それは嗅内野／海馬における神経原線維変化形成に関与することが考えられた。

主任研究者

高島 明彦 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（部長）

分担研究者

木村 哲也 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部（室長）

富山 貴美 大阪市立大学大学院医学研究科脳神経科学 (准教授)
宮坂 知宏 同志社大学生命医科学部 (助教)

A. 研究目的

世界の認知症患者数は現在約 3560 万人と推定され、今後さらなる増大が予想される。現在においても年間 6 億 400 万ドルが介護に費やされており、2050 年には倍増が予想されている。認知症の大多数はアルツハイマー病であり、その予防法、根本的治療法は現在まで確立されていない。1991 年 β アミロイド仮説が提唱されて以来今日まで β アミロイドを減少させる療法が試みられてきたが、いずれもアルツハイマー病と診断された患者において顕著な認知機能低下を阻止することが出来ていない。これに対し、本研究では認知機能低下と相関するタウ病変に注目して、アルツハイマー病における認知機能低下機構、及びその阻止について研究を行い、認知機能低下進行を阻止する薬剤の開発およびそのための標的分子の探索を目指す。

この研究課題では主任研究者らは異なる段階のタウ凝集がシナプス消失、神経脱落に関与し、その結果、神経原線維変化が形成される部位では脳機能低下が引き起こされていることを見いだしている。この結果を元に特定のタウ凝集を阻害することでタウ凝集阻害と脳機能低下阻止を示す化合物を同定する。

タウ凝集の上流となる分子シグナルは新規抗タウ薬の標的分子となる。神経原線維変化は加齢に伴って嗅内野/海馬に始めに出現する。これは、75 歳を超える 9 割以上の人で観察される。老化に伴い嗅内野/海馬には神経原線維変化が蓋然性を持って出現している。加齢に伴う認知機能低下を引き起こすタウ凝集の上流シグナルを明らかにすることで、脳老化機構を明らかにし、治療可能な新規ターゲット分子を見いだす。

B. 研究方法

これまでにスクリーニングしたタウに結合する化合物の中から試験管内タウ凝集をチオフラビンでモニターすることによってタウ凝集を阻害する化合物を選択する。蔗糖密度勾配遠心によってタウ凝集体を分離しどの凝集過程で阻害しているかを決定する。これらの化合物は不溶性タウを生じるタウ発現 N2a 株化細胞に添加し細胞レベルでのタウ凝集抑制作用を調べる。IC50 が 100nM 以下になる化合物をこの時点で選択する。更に、タウリン酸化、微小管安定への寄与について生化学的に調べ、それぞれの化合物の特徴をカテゴリー分けし、動物実験への優先順位を決定する。

20ヶ月令になった動物から3ヶ月間化合物を含む餌を経口投与する。摂取量は各個体の体重を毎日測定することで一定となるように調節する。この方法は既に確立している。投与後マウスは行動実験、脳機能解析、シナプス量、神経細胞密度を計測し、タウによる神経変性を有意に抑制し、神経機能回復を示す化合物を決定する。

(倫理面への配慮)

国立長寿医療研究センター、動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

タウ凝集阻害剤のスクリーニングははじめに化合物ライブラリーからタウと結合する化合物を見いだすため低分子化合物マイクロアレイを用いて検索し、その後、SPR (Surface plasmon resonance) を用いて結合強度を確認した。これらタウ結合低分子化合物は試験管内タウ凝集試験によってタウ線維形成阻害を示す化合物に絞り込まれた。その中から神経脱落に関与する顆粒状タウオリゴマー形成阻害を示す3化合物をタウ凝集阻害剤候補物質とした。このうち2化合物は共通の骨格を持つ C2 グループとした。この骨格を持つ他の化合物を検討した結果この部位にタウ凝集阻害活性があることが判明した。C2 グループの化合物から細胞膜透過性を持つ化合物 X1 について細胞を用いた検討を行った。P301L 変異を持つタウを発現する細胞株 N2a に異なる濃度の X1 を添加し培養後、不溶性タウの量を調べたところ、X1 濃度増大に伴い不溶性タウ形成が低下した。その IC50 は 10nM であり、治療薬として使用するのに十分な低濃度でのタウ凝集抑制効果を示した。次にサルコシル不溶性タウの出現と神経脱落を示す P301L を発現するマウスモデルに脳内濃度が 100nM となるように X1 を3ヶ月間経口投与した。その結果 X1 投与群では対照群と比べて有為なサルコシル不溶性タウ量の減少、神経脱落の阻止を示した。この結果をもとに C2 グループによるタウ凝集阻害と神経脱落阻止効果に関する特許を出願中である。また、臨床応用を進めるため研究センター協力のもと X1 の臨床試験を準備している。

脳の加齢に伴う機能変化を調べるため Mn-MRI を用いて場所記憶時の脳活動を調べた。その結果、若齢期には基底核、嗅内野/海馬の活性が観測されたが、老齢期には基底核の活性の減弱と嗅内野/海馬の活性増大が観察された。このことは、脳活動は場所記憶に関して加齢に伴い嗅内野/海馬依存的になることが示唆された。タウ遺伝子ノックアウトマウスでは老齢期に基底核の脳活動は維持されるものの嗅内野/海馬活性の低下が見いだされた。この結果を支持するようにモリス水迷路では老齢野生型マウスより空間認知能低下が観察されている。これらの結果は老齢期における基底核の活性の減弱と嗅内野/海馬の活性増大にはタウが関与していることが示唆された。海馬におけるタウの役割は電気生理学的手法を用いて調べ、NMDA 依存性シナプス長期抑圧(LTD)に必要なことが明らかになった。タウ遺伝子ノックアウトマウスでの老齢期の嗅内野/海馬神経活動低下は LTD 誘導喪失によることを示唆している。このことから、加齢に伴う LTD の増大が嗅内野/海馬における神経原線維変化形成に関与することが考えられた。現在、LTD 誘導と神経原線維変化形成について検討中である。

D. 考察と結論

※「D. 考察」、「E. 結論」としても差し支えないこと。

本研究ではタウ凝集阻害剤候補化合物 X1 を見だし、動物モデルにおいて神経脱落阻害を示した。さらに、行動学的、脳機能改善が観察されタウオパチー治療薬の可能性を示す。タウ凝集阻害は認知症発症後、または、MCI と呼ばれる状態であっても、その進行を阻止することことが期待され、抗アミロイド療法を補完し、アルツハイマー病治療の根本的治療になりうると期待される。X1 にはその生理活性に副作用が生じる可能性が考えられており、これを克服するため光学異性体である D-X1 を合成し X1 同様動物実験まで検討を行う。さらに X1 の結合部位を見だしその部位に対する他の化合物をスクリーニングしタウ凝集阻害剤を得ることをエーザイ（株）と共同で進める。

タウ凝集上流の解析ではテロメア長の短縮が細胞老化の因子であるようにタウが脳老化因子である可能性がわずかに見えてつある。この解析を継続することにより脳老化を引き起こす要因とその機構をシナプス可塑性、神経回路のレベルで明らかにし、それに関与する分子群を同定する。これらの分子群の中からタウ凝集阻害、脳老化遅延のための分子標的を見いだすことが可能になるだろう。これらは認知症予防薬、または根本的治療薬として認知症患者数の減少に大きく寄与すると期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Ono K, Li L, Takamura Y, Yoshiike Y, Zhu L, Han F, Mao X, Ikeda T, Takasaki J, Nishijo H, Takashima A, Teplow DB, Zagorski MG, Yamada M.

Phenolic Compounds Prevent Amyloid β -Protein Oligomerization and Synaptic Dysfunction by Site-specific Binding. J Biol Chem. 2012 Apr 27;287(18):14631-43.

2) Ferree A, Guillily M, Li H, Smith K, Takashima A, Squillace R, Weigele M, Collins JJ, Wolozin B.

Regulation of Physiologic Actions of LRRK2: Focus on Autophagy. Neurodegener Dis. 2012;10(1-4):238-41.

3) 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*. 2012 Feb;11(1):51-62.

4) Mutsuga M, Chambers JK, Uchida K, Tei M, Makibuchi T, Mizorogi T, Takashima A, Nakayama H.

Binding of curcumin to senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in the aged brain of various animals and to neurofibrillary tangles in Alzheimer's brain. *J Vet Med Sci*. 2012 Jan;74(1):51-7.

5) Takasaki J, Ono K, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M.

Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- β in vitro. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(2):271-80.

6) Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF.

Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J Neurosci*. 2011 May 25;31(21):7840-7.

7) Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N.

Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the nucleus accumbens in tauopathy model mice. *Neurobiol Dis*. 2011 Jun;42(3):404-14.

2. 学会発表

1. シンポジウム、特別講演

高島明彦

第 39 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「アルツハイマー病治療薬一対症療法から根本治療へ」2011 年 10 月 19 日、東京

国際学会発表

1) Takashima A

Role of tau and GSK-3 β in synaptic plasticity connecting to tauopathy. Tau workshop in UCSF. San Francisco, March 27-30, 2011.

2) Takashima A

Physiological role of tau in synaptic plasticity, synaptic function affect on NFT

formation, Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York, June 16, 2011

3) Takashima A

Role of tau aggregation in neurodegenerative disease. New York state university Albany symposium, Dialogue. June 15, 2011

4) Takashima A

The relations of Tau and β amyloid, Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris France, July 16-21, 2011

5) Takashima A

Relationship between tau aggregation and synapse loss, and neuronal loss
3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, Melbourne, Australia, July 31-August 4, 2011

6) Takashima A

Pathological and physiological function of tau; how tau is involved in neurodegeneration. International Symposium of neurodegenerative disease Nantong, P.R.China, 9 October

7) Takashima A

Pathological and physiological function of tau; how tau is involved in neurodegeneration. Wuhan medical school, P.R. China, October 13, 2011

8) Takashima A

General overview on Tau, Advances in Neuroscience for Medical Innovation, Saint-Jean Cap Ferrat, France, November 17-19, 2011

9) Takashima A

Tau and GSK-3 β are required for maintaining brain function at old age. AACL (Asian Aging Core for Longevity), Nagasaki, Nov. 21-22, 2011

10) Takashima A

The biology and pathology of Tau and its role in tauopathies II
8-9 January 2012

Robinson College Cambridge, UK

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

発明者 : 高島明彦、添田義行、長田裕之

発明の名称 : タウ凝集阻害剤

出願年月日 : 国内出願 平成 23 年 10 月 3 日

出願番号 : 特願 2011-219059 (国内)

出願人 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

※予定を含めて記載すること。該当がない場合には「なし」と記載すること。