

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 (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)

住岡 暁夫 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (室長)

宮坂 知宏 同志社大学 生命医科学部 (助教)

富山 貴美 大阪市立大学大学院 医学研究科 (准教授)

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として X1 を見いだした。この化合物が顆粒状タウ凝集体形成を阻害することで神経脱落を阻止し、認知症進行の阻止または減速を目指すというタウオパチー治療コンセプトに合致することを確認するため、蔗糖密度勾配遠心によってタウ凝集体を分離し顆粒状タウ凝集体形成阻害しているかを確認した。X1 を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と IC50 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、神経機能回復それぞれの項目について調査する。

(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

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、IC50 が 100nM 以下で、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が有る事を見いだした。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 X1 を 3 ヶ月間経口投与した。X1 脳内濃度は 40nM に達しており、タウ凝集阻害が期待された。X1 投与群では対照群と比べて有意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。更にプレリンビックにおける神経活動低下の阻止とそれに関連した行動異常の抑制が観察された。これらの結果をもとに臨床試験を行う準備を進めている。この準備段階で問題となった可能性のある副作用を回避するため異性体を用いたタウ凝集阻害能の検討を行っている。

タウの生理機能についてこれまでの研究からタウが海馬シナプスの長期抑制 (LTD) 形成に含まれる生理機構に関与する事はあきらかにしてきた。しかしながら、海馬シナプスで知られている 2 つの LTD, すなわち NMDA 受容体誘導性 LTD と metabotropic Glu 受容体誘導性 LTD のどちらの過程に含まれるかは明らかではなかった。これを解決する為に NMDA あるいは DHPG 誘導性 LTD をタウ欠損マウス海馬スライスで調べた。タウ遺伝子欠損マウスでは DHPG 刺激によって LTD を誘導できるが、NMDA 刺激では LTD 誘導を見いだすことができなかった。これらのことからタウは NMDA 依存性 LTD 誘導に必須の因子であることが示された。LTD は AMPA 受容体の取り込みによって引き起こされており、そのメカニズムとして PICK1 が介在することが知られている。野生型マウス海馬スライスの NMDA 刺激では Pick1/GluA2 結合増大が観察されるのに対してタウ遺伝子欠損マウス海馬スライスでは Pick1/GluA2 結合増大は観察されなかった。細胞への発現実験では PICK1/GluA2 結合はタウの存在下で増大し、リン酸化タウの存在で更に増大を示した。すなわち、NMDA によりタウがリン酸化すると AMPA 受容体の取り込みが起り LTD を誘導することが示された。

住岡は膜脂質によるタウ病変制御モデルを提案し、平成24年度は、主に 研究目標 I. タウと脂質二重膜の相互作用の検証 を計画し、これを遂行した。その結果生体内のタウの膜局在を確認するため、マウス海馬を生化学的に分画し、膜画分、細胞質画分を SDS-PAGE で泳動し、Western Blot でタウの発現を観察した。その結果、膜画分に強いタウの発現が観察され、タウの多くが膜に局在していることを確認した。また、タウと膜脂質の相互作用の可能性を検証するため、大腸菌リコンビナント系から精製したタウとマウス脳から抽出した脂質で調整した人口リポソームを用いてリポソーム浮遊法によって相互作用を観察した。その結果、タウが脳由来脂質 2 重膜に結合することを明らかにした。更にタウに結合する膜脂質成分を明らかにするため、膜オーバーレイ法によっ

てタウと30種の膜脂質成分との相互作用を観察した。その結果、新たにタウが特異的に結合する膜脂質成分の同定に成功した。

D. 考察と結論

X1 に関してはこれまでに薬理効果を動物モデルを用いて証明しておりヒトにおける POC を示す必要がある。その為に、薬理効果を示す血中濃度と安全な濃度範囲を決定する必要がある。

DX1 は新規薬物と認定されるため体内動態、安全性試験など非臨床試験を早急に行い臨床試験へと進める必要がある。非臨床試験以降は橋渡し拠点である名古屋大学、同志社大学、東北大学と共同で進める。

タウ生理機能に関して LTD と膜にタウが関与することが見いだされている。いずれの場合も神経原線維変化形成に深く関与することが示唆されており、更なる検討によって標的となる分子を見いだす予定である。

タウの新規修飾が見いだされた。今後この修飾とタウ凝集との関連を見いだすことから、神経原線維変化形成の調節機構が明らかになる事が期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

原著

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. doi:10.1074/jbc.M111.325456. Epub 2012 Mar 5. PubMed PMID: 22393064; PubMed Central PMCID: PMC3340280.

総説

1: Takashima A

GSK-3 β and memory formation.

Front Mol Neurosci. 2012;5:47. doi: 10.3389/fnmol.2012.00047.

Epub 2012 Apr 23. PubMed PMID: 22536172; PubMed Central
PMCID: PMC3332229.

2: 高島明彦

特集 アルツハイマー病の根本治療に向けた研究最前線：アルツハイマー病に
おける Tau タンパク質の役割

細胞工学 Vol. 31, No. 10 監修：鈴木則宏 伊藤大介 秀潤社 P1135-1138
2012年9月22日

3: 吉池裕二, 木村哲也, 高島明彦

認知症における抑制性シナプス

Clinical Neuroscience 別冊 Vol. 30 No. 12, 2012年12月1日

4: 高島明彦

顆粒状タウオリゴマー：神経脱落を引き起こすタウ線維中間体

Psychiatry Today No. 31 2013年3月

5: 高島明彦

タウを指標とする抗アルツハイマー薬の創薬

HUMAN SCIENCE Vol. 24 No. 2 2013年4月 (印刷中)

2. 学会発表

シンポジウム、特別講演

1: 高島明彦

抗タウ薬の開発：現状と展望

アルツハイマー病の最先端研究シンポジウム in 熊本, 9月29日, 熊本

2: 高島明彦

抗タウ薬の開発：現状と展望

ゲノム創薬フォーラム第15回シンポジウム, 11月2日, 東京

3: 高島明彦

タウを標的とした認知症治療について

第3回アルツハイマー病診断・治療薬創出に向けた革新的探索系構築に関する
研究会, 2月27日, 愛知

4: 高島明彦

脳プロジェクト DX1 開発状況

同志社大学大学院脳科学研究科公開シンポジウム, 3月23日, 京都

2. 国際学会発表

1: Takashima A

Neurofibrillary Tangle Formation Process and Neurodegenerative System

and Onset of Dementia Mechanism

Aging and Neurodegenerative Diseases, 26-27 Apr. the Republic of Korea

2: Takashima A

Intermediate of Tau Fibril is Involved in Neuronal Loss

Alzheimer's Association International Conference, 14-19 Jul. Canada

3: Takashima A

Tau and GSK-3 β are required for maintaining brain function at old age and NFT formation in AD

4th Brain Plasticity Symposium, 3-5 Sep. Australia

4: Takahima A

Granular tau oligomer : Intermediate of tau fibril is involved in neuronal loss

11th Biennial Meeting of the Asian Pacific Society for Neurochemistry,
2 Oct. Kobe

5: Kimura T, Yamashita S, Suzuki M, Yoshikawa M, Takahima A.

Function of MAP Tau in normal aging of mouse brain

Neuroscience 2012, 13 Oct. U.S.A. (ポスター発表)

6: Takashima A

Tau, Microtubules, in AD

Asian Aging 2012: Korea-Japan Joint Conference on Aging, Metabolism and Neurobiology, 23-24 Nov. the Republic of Korea

3. 国内学会発表

1: 高島明彦

タウオパチーからみたアルツハイマー病

第19回九州老年期認知症研究会, 6月9日, 福岡

2: 高島明彦

タウ凝集阻害による認知症治療の可能性

第34回日本生物学的精神医学会, 9月30日, 神戸

3: 高島明彦

タウとシナプス可塑性について

第31回日本認知症学会学術集会, 10月26日, つくば

4: 高島明彦

タウ凝集阻害による認知症治療の可能性

日本神経治療学会総会, 11月28日, 北九州

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、井原康夫、宮坂知宏、杉本八郎

発明の名称：タウ凝集阻害剤

出願年月日：国際出願 2012 年 10 月 3 日

出願番号：PCT/JP2012/006363 (国際)

出願人：独立法人国立長寿医療研究センター、学校法人同志社

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし