

## 総括研究報告

長寿医療研究開発費 平成25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

#### 3年間全体について

アルツハイマー病の特徴的病理像のひとつである神経原線維変化の主成分はタウタンパク質である。このタウは様々な翻訳後修飾を受けていることがわかっており、またそれが神経原線維変化形成に重要な役割を果たすという説がある。神経原線維変化の形成頻度は認知機能低下の度合いとよく相関することからタウの翻訳後修飾を制御することで治療法開発の糸口を見いだそうとした。

平成23年度当初はタウのアセチル化に着目して研究をはじめたが、その代謝との関連を探るうちに代謝機構とタウの蓄積の関係に研究の視点を移した。具体的にはA $\beta$ からタウへ至る病態経路におけるタウの代謝を担うオートファジーの位置づけを解析した。一方、タウ病態を改善する因子の探索から軽度の酸化ストレスにタウ病態を改善する効果があることを報告した。平成24年度には当研究所の特有の資源である加齢育成動物を用いて、軽度の酸化ストレスがマウスの最長寿命を延ばす可能性を示す結果を得た。タウの代謝と軽度酸化ストレスによるタウ病態の改善効果について接点を見いだそうとしていたこの頃、全く異なる分野から酸化ストレスがオートファジーを誘導する機構についての報告が出た。そこで平成25年度には軽度酸化ストレスがオートファジーを誘導してタウ病態を改善するのではないかという作業仮説を立て検証を行った。

#### 平成25年度について

仮説の検証にはタウを発現させたショウジョウバエを用い、また軽度酸化ストレスを与えるインプットとしてメチレンブルーを用いた。その結果、メチレンブルーや他の高酸化活性物質をモデルハエに投与することで不溶性タウの蓄積が減少し、これにともなってモデルハエの行動異常に改善が見られた。

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

研究期間 平成23年4月1日～平成26年3月31日

## A. 研究目的

当研究プロジェクトの最終的な目標は二つある。一つはアルツハイマー病の病態を解明することであり、もう一つは治療薬を開発することである。アルツハイマー病の特徴的病理像である老人斑と神経原線維変化、言い換えればそれぞれの主成分タンパク質 A $\beta$  とタウの間にある関係性を分子レベルで解明することで治療法のきっかけをつかむことを目的として本研究を計画した。タウの翻訳後修飾のうちでも代謝は A $\beta$  沈着が起点となり得るが、病態の進行に伴ってこれがどのように変化してタウの蓄積に至るのかについてはわかっていない。この課題の解析から研究を始めた。タウタンパク質は通常微小管に結合してその安定性に寄与すると言われていた他、最近ではシナプスの機能にも関与することが報告されている。タウの代謝はその蓄積を抑制する可能性があるが、脳システムにより制御されている認知機能やその他の機能にどのような影響があるかわからない。タウ代謝促進がタウ蓄積による機能異常その他に与える影響を解析することでタウの代謝促進はアルツハイマー病の治療戦略となるのかどうかを検証する。

## B. 研究方法

### 3年間全体について

タウの翻訳後修飾を解析するためヒトタウを過剰に安定発現させた Neuro2A 細胞を用いた。培地に様々な薬剤を添加することでタウのリン酸化等を生化学的に解析した。タウの遺伝子改変マウスにはアロキサソールという活性酸素を発生するような薬剤を腹腔内投与して脳内のタウやその他タウ病変に関係するタンパク質に与える影響を解析した。また加齢育成動物のうち 18 ヶ月齢の雄マウスにアロキサソールを投与してその寿命をモニターした。更に軽度酸化ストレスがタウ病態に及ぼす効果を解析するためにタウを神経細胞あるいは複眼に発現させたショウジョウバエを用いた。ショウジョウバエの餌となる寒天培地にメチレンブルーなどの酸化活性を有する化合物を混ぜ羽化後一ヶ月間投与した。ショウジョウバエには重力に逆らって動く性質[負の重力走性]がある。この性質にタウを発現させたハエ

では異常がみられる。薬剤投与後、ショウジョウバエの負の重力走性異常に改善がみられるかどうか解析した。その後ショウジョウバエの頭部を解剖して生化学的に解析した。

#### 平成25年度について

主にショウジョウバエを用いて研究を行った。通常ショウジョウバエを飼うための空のヴァイアルにハエを入れ、机に数回軽くタップするとショウジョウバエはヴァイアルの底に集まる。正常なハエはその直後ヴァイアルの上を目指して登るが、タウを発現させたハエはあまり登らない。この負の重力走性異常に薬剤投与が及ぼす影響を解析した。1回の実験では25匹程のハエをヴァイアルに入れて実験するが、全てのハエが同じ動きをする訳ではない。机にヴァイアルをタップしてから10秒後にヴァイアルの底から1/3のラインよりも上にいたハエの数をかぞえて評価した[クライミングアッセイ]。また1/3ラインの上にいたハエと下にいたハエを分けて回収しそれぞれの頭部におけるタウの蓄積度合いも解析した。さらに薬剤投与がハエの寿命に及ぼす影響も解析した。

#### (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換え 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

#### 3年間全体について

アミロイド仮説ではAβの蓄積がきっかけとなってタウその他の病変を引き起こすと考えられている。Aβはシナプスの可塑性に影響を及ぼすことが知られる。特に海馬におけるシナプス可塑性を左右する要素の一つは神経伝達物質であるグルタミン酸である。そこでグルタミン酸を培地に加えた結果タウの量が増加した。グルタミン酸によるタウの増加はNMDA受容体の阻害によって抑制されたことからNMDA受容体を介すと考えられる。またアクチンの重合を阻害する薬剤によってもタウの増加が見られた。タウの代謝機構の一つであるオートファジー発動時にはアクチンの再構築が起こることがわかっている。そこでタウの代謝機構の一つオートファジーを促進したところグルタミン酸あるいはアクチン重合阻害剤によるタウの増加が抑制された。以上のことからオートファジーにより代謝が制御されているタウのタンパク質レベルはNMDA受容体を介して細胞外グルタミン酸濃度から影響を受けること、またアクチンの重合状態に依存することがわかった。

タウの凝集阻害剤として見つかったメチレンブルーは第II相臨床試験で有効性を示した

ため、私たちが凝集阻害剤の探索を行った結果アロキサンという化合物にタウ凝集抑制作用があることが *in vitro* でわかった。アロキサンをタウの遺伝子改変マウスに投与したところ、不溶性タウが減少した。このとき可溶性タウも減少していたことからアロキサン投与は単に凝集を抑制した訳ではないと考えられたものの、その機構については同定できなかった。アロキサンは活性酸素を発生するような化合物である。軽度の酸化ストレスは寿命を延ばすといった報告が幾つかのグループから報告されている。そこで加齢育成動物から18ヶ月齢のマウスにアロキサンを投与した結果、平均寿命には大きな影響を及ぼさないものの最長寿命を5ヶ月程延ばす傾向がみられた。

タウには様々な翻訳後修飾があるが代謝はタウの蓄積を抑制することになる。代謝機構の中でもオートファジーはタウの代謝を担うであろうことは主に平成23年度に行った実験証拠がこれを支持していた。オートファジーの促進によるタウ蓄積抑制は治療戦略となる可能性がある。オートファジーを促進する因子はこれまでも知られているが、酸化ストレスもその一つである。アロキサンによる軽度酸化ストレスのタウ病態抑制効果を報告したもののアロキサンのもつ毒性からこれを薬として開発することは難しいと判断した。そこで酸化ストレスを生じるもののその毒性について良く知られた、安全性の高い化合物を探したところ、メチレンブルーもその一つであることがわかった。メチレンブルーはタウの凝集阻害剤として見つかった化合物であるが *in vivo* での作用機序はわかっていない。そこでショウジョウバエのモデルを用いてメチレンブルーがタウの蓄積に及ぼす影響を解析した。

#### 平成25年度について

メチレンブルー投与により不溶性画分のタウが減少した。このことは *in vitro* におけるメチレンブルーのタウ凝集抑制効果がハエでも再現できた可能性はある。しかしアロキサンの場合同様、メチレンブルー投与は可溶性画分のタウも減少させたことから凝集抑制以外の作用もはたらいたことが考えられる。また可溶性画分の総タンパク質レベルもメチレンブルー投与群では減少していた。メチレンブルーはオートファジーを促進することから、タンパク質代謝の促進がタウの蓄積の抑制につながったとも考えられる。またクライミングアッセイにおいてメチレンブルー投与はモデルハエの負の重力走性異常を改善することがわかった。クライミングアッセイでよく上に登ったハエは登ることができなかったハエに比べてタウの蓄積が少ないことがわかった。これらのことからメチレンブルー投与によるタウ蓄積の抑制が負の重力走性異常を改善したと考えられる。その一方、メチレンブルー投与はハエの致死率を上げて寿命を短くした。またメチレンブルー投与はモデルハエの負の重力走性異常は改善したものの、野生型ハエの負の重力走性異常は逆に悪化した。これらはメチレンブルーの毒性によるものと考えられる。そこで高酸化活性は有しつつ毒性の低い化合物を検索した。その結果、メチレンブルーよりも有効性は低いものの毒性は低い化合物を見いだすことができた。

#### D. 考察と結論

酸化ストレスは老化を促進し、アルツハイマー病の危険因子であると考えられてきた。活性酸素を発生する化合物アロキサン(Aloxi)の低濃度投与がモデルマウスにおける不溶性タウの蓄積を抑制したことから、軽度酸化ストレスにはタウ病態改善効果があることが示唆できた。しかしながらその機構については明確に示すことができず、またアロキサンの毒性はこれを治療薬として開発することを困難とした。そこでアルツハイマー病の病態とは何かという問いに立ち返り、*in vitro* で薬理学的手法を用いて考えられることを行った。その結果、分子レベルではオートファジーのタウ代謝における役割を示すことができたものの、病態の進行まで解明するためには電気生理システムが必要と考えられたがそのセットアップには時間がかかる。このような経緯で当研究プロジェクトの二つの命題である病態の解明と治療薬開発についていずれも行き詰まってしまった。

軽度酸化ストレスはタウ蓄積を抑制する。オートファジーはタウ代謝を担う。私たちの平成23、24年度の研究はこの2点にまとめることができる。これらの接点を探してみると酸化ストレスはオートファジーを促進すること、またその分子機構が最近解明されたことがわかった。これらのことを考え合わせ、軽度酸化ストレスはオートファジーを誘導することでタウ代謝を促進し、その蓄積を抑制するという作業仮説を立てた。このことを検証するためにマウスではなくショウジョウバエモデルを用いた。プロジェクトの任期を考慮すれば生存期間が数ヶ月のハエを使うほうが生存期間が数年のマウスよりも現実的に思えたためである。メチレンブルーには活性酸素を発生するほど高い酸化活性がある。にもかかわらず臨床試験を行うことが出来る理由はその安全性についての情報量の多さにあると考えた。未だにメチレンブルーの *in vivo* における作用機序はわかっていないことから、メチレンブルー投与がタウ病態に与える影響を解析することにした。その結果、メチレンブルー投与はタウの蓄積を抑制したとともにモデルハエの負の重力走性異常を改善した。しかしメチレンブルー投与は生存率を著しく低下させたり、野生型ショウジョウバエの負の重力走性を悪化させたりといった毒性も確認された。そこで安全性の良く知られた高い酸化活性を有する化合物を投与した結果、タウ蓄積抑制や行動改善などの有益な効果はメチレンブルー程高くはないものの毒性は低いことがわかった。今後メチレンブルーや今回用いた化合物の薬理機構を解析するつもりである。その結果これらの化合物の酸化活性が起点となってオートファジーによるタウ代謝が促進されるということになった場合、次に評価しなければならないのは有効性と毒性のバランスになる。製薬企業による薬の開発では有効性の他に新規性、薬らしさや安全性、高い選択性なども重要視される。また幾つものアルツハイマー病治療薬開発の失敗がリスクをとまなう開発を避ける傾向がある。動物モデルによって副作用を出来る限り減らして高い有効性を示すことが出来るかどうかは本研究を治療法開発に導くための今後の課題であると認識している。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成23年度

- 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) 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).
- 3) 吉池裕二 : 「GABA 神経伝達」 *認知症学・上* 69, 219-223 (2011).

平成24年度

- 1) Liao, Y. H., Chan, Y. J., Yoshiike, Y., Chang, Y. C., Chen, Y. R. : "Negatively charged gold nanoparticles inhibit Alzheimer's amyloid- $\beta$  fibrillization, induce fibril dissociation, and mitigate neurotoxicity." *Small* 8, 3631-3639 (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.* 287, 14631-14643 (2012).
- 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* 30, 1425-1427 (2012).

平成25年度

- 1) 吉池裕二 : 「抗タウ治療薬の現在と未来」 *老年精神医学雑誌* 第 25 巻増刊号-I, 76-80 (2014).
- 2) 吉池裕二 : 「タウ凝集制御薬の開発」 *認知症の最新医療* 3, 133-138 (2013).

2. 学会発表

平成23年度

- 1) 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. 第30回日本認知症学会学術集会, 平成23年6月30日, 東京.
- 2) 吉池裕二. Roles of oxidative stress and insulin signal in tau pathology of Alzheimer's disease. 第4回名古屋グローバルリトリート, 平成25年2月24日, 大府.

平成24年度

- 1) Yuji Yoshiike, Sumihiro Maeda, Yoshiyuki Soeda, Tetsuya Kimura, Naruhiko Sahara, Akihiko Takashima. Anti-tauopathic and anti-aging effects of alloxan-induced mild oxidative stress in mouse. Society for Neuroscience 2012, 10月17日, New Orleans.
- 2) Yuji Yoshiike, Sumihiro Maeda, Yoshiyuki Soeda, Tetsuya Kimura, Naruhiko Sahara, Akihiko Takashima. Anti-aging and anti-tauopathic effects of low-dose alloxan in mouse. Keystone Symposium 2012, 10月24日, 東京.
- 3) 吉池裕二、小又尉広、津田玲生. HDAC 制御によるタウ代謝機構の解析. 第31回日本認知症学会学術集会,平成24年10月27日, 筑波.
- 4) 吉池裕二. Quest for a novel pathway connecting A $\beta$  and tau. 第5回名古屋グローバルリトリート,平成25年2月1日, 大府.  
平成25年度
- 1) Yuji Yoshiike. On the roles of oxidation and oxidative stress in Alzheimer's disease and aging. 1<sup>st</sup> Annual World Congress of Geriatrics and Gerontology 2013, 10月12日,大連.
- 2) Yuji Yoshiike. In vitro study suggests a pathway connecting A $\beta$  and tau. Society for Neuroscience 2013, 11月12日, San Diego.
- 3) 吉池裕二、Sheik Mohideen Sahabudeen. タウ発現培養細胞を用いた A $\beta$ からタウにいたる経路の解析. 第32回日本認知症学会学術集会,平成25年11月9日, 松本.

#### 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