

長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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

2年間全体について

アルツハイマー病患者の脳には老人斑と神経原線維変化と呼ばれる二つの特徴的病理像がみられる。そのうち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ため、神経原線維変化の形成を抑制することで認知症の進行を阻止できるのではないかと考えられる。本研究課題では神経原線維変化の主成分であるタウタンパク質の凝集・蓄積を標的とした治療薬開発のために、候補物質の探索を目的としたスクリーニングシステムの開発を行なった。ショウジョウバエを用いたこのシステムは *in vitro* システムほど効率よく多くの化合物の効果を評価出来ないものの、タウの凝集自体ではなく生体システムとしてその蓄積を抑制するという新たな標的に対して有効な化合物の探索に利用可能であることがわかった。

ショウジョウバエのシステムから見出された候補物質について、よりヒトに近いモデルで薬効を評価するために超老齢のカニクイザルの使用を検討した。ショウジョウバエモデルにおいてタウの脳内蓄積を抑制する効果が見つかったローズベンガルという化合物を超老齢のカニクイザルに1年間投与し、その間種々の行動試験や血液採取を行なった後脳を解剖し検索を進めた。

平成27年度について

ショウジョウバエをモデルとしたスクリーニング方法について昨年度出願した特許について米国に出願した。またその内容と実際にスクリーニングを行なって見つかったローズベンガルの結果について学術論文として報告した。さらにより有効で安全な物質を探索して興味深い効果を示す化合物を見出しつつある。カニクイザルへのローズベンガル投与実験については行動試験を行ない、脳を解剖した。

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）

研究期間 平成26年4月1日～平成28年3月31日

A. 研究目的

アルツハイマー病患者の脳にみられる病理像である神経原線維変化はタウタンパク質が凝集し細胞内に蓄積する。認知症は神経原線維変化の形成にともなって進行するため、神経原線維変化すなわちタウ凝集・蓄積を抑制すれば認知症の進行を阻止できるのではないかと考えられる。これまで精製したタウタンパク質の凝集を抑制するような化合物の探索が行なわれてきたが、この *in vitro* システムの最大の懸案は得られた化合物のタウに対する特異性である。そこで *in vivo* のシステムでタウ病態を標的とした探索を行なうことで新たな抗タウ治療薬開発への糸口を見出そうと考えた。一方、探索の結果得られた候補薬物の投与効果をヒトでみる前に評価するシステムとして過剰発現系のマウスモデルが用いられているが、よりヒトに近い自然発症型のモデルの必要性を考え超老齢のカニクイザルの利用を検討した。

B. 研究方法

2年間全体について

ヒトタウ（野生型 2N4R）を複眼、神経、キノコ体それぞれに発現するように遺伝子操作したショウジョウバエを用いた。複眼にタウを発現したハエは複眼の表面に異常が見られ、また複眼そのものが通常よりも小さくなっている。この表現型をもとにタウ蓄積の効果を見積もる方法があるが、本研究では他に用いた遺伝子改変ハエよりもヒトタウの発現量が多く、生化学的解析が容易であったためにタウタンパク質の凝集・蓄積に与える影響を解析する目的でこの系統を用いた。

神経にヒトタウを発現させたハエはその負の重力走性に異常がみられる。ハエが通常重力に逆らって登ろうとする性質、負の重力走性はバイアル中にハエを入れて軽く机にタップし一定時間に登ったハエの割合をみるだけで計測することができる（クライミングアッセイ）。この系統はまず負の重力走性に与える効果をみた後、タウの蓄積を生化学解析するために用いた。

キノコ体はハエの脳の中でも学習記憶を担う領域である。そのキノコ体特異的にヒトタウを発現したハエは学習記憶に異常がみられる。ハエの嗅覚を利用した匂い弁別学習試験を用いてこの系統は短期記憶が正常に比べて劣っていることを確認した。薬剤の投与がこの系統の短期記憶を改善するか検証する目的でこの系統を用いた。

一方、投与薬剤の毒性を評価する目的で野生型のハエを用いた。投与後にハエの負の重力走性をみることで薬剤の正常な負の重力走性に悪い影響がないか評価する。また同様の目的で生存率も測る。

ショウジョウバエシステムを用いて見つかった候補物質について、ヒトへの外挿が可能

なモデルとして超老齢のカニクイザルを用いた。餌であるリンゴに薬剤の水溶液を塗り1年間与えた。この投与期間中に食物回収試験やタッチパネル式装置を用いた視覚弁別学習試験を行なって認知機能に及ぼす効果を数値化できないか試みた。その後脳を解剖して半脳をパラフィンブロックとして、残りの半脳は部位分けして凍結保存した。

平成27年度について

ショウジョウバエシステムを用いたより有効で安全な抗タウ薬候補の探索および超老齢カニクイザルを用いた薬効評価については平成26年度から引き続き行なった。

3系統の遺伝子改変ハエと野生型ハエを用いた探索を進める中で探索の効率促進を検討した。神経原線維変化からタウを抽出する方法でサルコシル不溶性画分をとり、その量からタウの蓄積レベルを見積もってきた。しかしタウの凝集蓄積の程度を知るためにより簡便に分画する方法について検討した。

(倫理面への配慮)

2年間全体について

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

2年間全体について

ヒトタウを発現したショウジョウバエは15年程前に報告されている。その報告によればそのハエは神経原線維変化様のタウ蓄積を認めることなく神経変性が生じるとされた。その理由として神経原線維変化からタウを抽出する方法で得られたサルコシル不溶性画分中に神経原線維変化中の特徴的な線維状のタウ凝集物が検出できなかったことが挙げられている。しかしサルコシル不溶性画分からタウを抽出する方法はもともと生化学的な解析を意図した手法である。ヒトの脳からサルコシル不溶性画分を抽出し、その試料をウェスタンブロットで解析するとスメア状に抗PHF抗体が反応するという特徴がある。ヒトタウを発現させたハエの頭部を回収してサルコシル不溶性画分をとり、これをウェスタンブロット法で解析した結果ラダー（ハシゴ状）と高分子量領域ではスメアの反応性がみられた。この結果は少なくとも生化学的には遺伝子改変ショウジョウバエからタウの蓄積が検出できることを示している。

このタウの蓄積量に伴って負の重力走性に異常が出ることをクライミングアッセイ中に登れるハエと登れないハエを分けて解析することで示した。またタウの凝集阻害剤として開発が進むメチレンブルー投与によってタウの蓄積が減少しただけでなく、負の重力走性の異常が改善した。これらの結果からヒトタウを発現したショウジョウバエではタウの蓄積と負の重力走性異常の間にはなんらかの因果関係があることがわかった。

ヒトタウを複眼に発現したハエについては頭部を回収し生化学的にサルコシル不溶性タウ量を解析することで薬剤投与の効果を検証した。またタウを神経に発現したハエの負の重力走性をクライミングアッセイにより解析した。さらに野生型にも同様の投与を行なった後クライミングアッセイによって投与薬物の安全性を解析した。このような方法でタウ病態を改善する毒性の低い化合物としてローズベンガルを同定した。ローズベンガルは食品添加物として厚生労働省から指定を受けた物質でもあり、毒性はハエにもみられなかったがメチレンブルーほど高い抗タウ病態効果はみられなかった。そこで次にメチレンブルーよりも有効で安全な化合物を探索した結果、再現性よくタウ病態を改善する物質はほとんど見つからなかった。神経にタウを発現したハエについてタウ蓄積を抑える効果が幾つかの物質でみられたものの、同じ物質が複眼にタウを発現させたハエでは効かないことが度々みられた。これはタウの発現部位や発現量などの違いによるものと考えられるが、明確な原因は特定できなかった。

そこで次にハエモデルにおけるタウの凝集・蓄積について再考することにした。神経原線維変化はあらゆる溶媒に不溶性であるという性質がその抽出の元になった生化学的特性である。その後サルコシル不溶性画分中のタウが神経原線維変化由来のタウであることが同定された。ヒトの脳から抽出したサルコシル不溶性タウはウェスタンブロットにおいてバンドではなくスメアとなることが知られている。しかし、ショウジョウバエの頭部から抽出したサルコシル不溶性タウについてはモノマーとオリゴマーと思われるバンドからなるラダー状が主な反応様式であり、ヒトの神経原線維変化のようなスメアとは大きく異なっていた。その後条件検討した結果、スメア状の反応を示すような画分を同定した。この抗タウ抗体に反応するスメアは老齢のハエのほうが若齢のハエよりも著しく多いことがわかった。一方、可溶性のタウは加齢に伴って β アクチンのようなタンパク質とともに減少していた。これらの現象はヒトにおけるアルツハイマー病病態をタウ発現ハエが一部模倣することを示唆している。今後、タウ蓄積抑制を標的とした薬剤の探索にあたり、サルコシル不溶性タウだけでなくショウジョウバエモデルにおけるタウの蓄積に対する効果をみることを主目的とした探索方法を考えたい。

超老齢のカニクイザルにローズベンガルを1年間投与し、その間に3ヶ月毎に食物回収試験を行うとともに血液を採取した。途中からではあるがタッチパネル式の視覚弁別学習記憶試験の導入を試みたがサルがそのデバイスに慣れるまでに時間がかかることが判明し、投与期間内には学習記憶を試験するまでには至らなかった。投与終了時にサルの脳を解剖し、半脳は部位分けして凍結するとともに半脳はパラフィンブロックとして保存した。

平成27年度について

ヒトタウを発現させたショウジョウバエがアルツハイマー病の治療薬候補を探索する目的で使えることを確認した。この探索システムを用いてメチレンブルーよりも効果的にかつ安全にタウの蓄積を抑制し、タウ蓄積に伴う機能不全を改善するような物質を探した。メチレンブルーやこれまでに同定したローズベンガルをもとにその構造的あるいは化学性質上に類似すると思われる物質について投与効果を検証した。基本的にショウジョウバエの餌に物質を混ぜて羽化後1ヶ月飼育することで投与した。投与後、神経にタウを発現したハエについてはクライミングアッセイを行ってから、また複眼にタウを発現したハエについてはそのまま頭部を超遠心チューブ内に切断回収した。この頭部からTBS可溶性画分およびサルコシル不溶性画分を抽出した。抽出したサンプルはウェスタンブロット法にてまずタウが含まれる量を解析した。コントロールに比べてタウの量が減少するかどうかの評価のポイントであった。種々の物質の投与効果を解析した結果、神経にタウを発現させたハエを用いた場合については幾つかの物質がわりと再現性よくサルコシル不溶性タウを減少させた。しかし同じ化合物についてタウを複眼に発現させたハエで評価すると効果に大きなバラツキがみられた。この結果を受け、サルコシル不溶性画分中のタウ量の解析については神経にタウを発現させたハエを用いることとした。一方、複眼にタウを発現させたハエについて効果にバラツキがあることからその原因を知るためにも、タウを発現させたハエにおけるタウの凝集・蓄積について再度考え直す必要性が生じた。

サルコシル不溶性タウは神経原線維変化からタウを抽出する方法として確立しているが、ショウジョウバエにおいて神経原線維変化程の強固な凝集ではなくとも凝集とそれにもとづく機能性変化を検出することが出来れば凝集・蓄積を抑制する物質の探索に適用できる。そこで様々な条件において抽出した画分についてタウを解析した。このときタウが凝集しているかどうかの指標として神経原線維変化の解析で認められるブロット上の特徴、すなわちスメアがみられるか否かを検討した。タンパク質が単量体で修飾を受けていない場合、ウェスタンブロットではバンドとして通常は検出される。しかしタンパク質が種々の修飾を受けている場合やSDS耐性の凝集をしている場合、バンドではなくスメアとなる。そこでスメアとして検出できるような条件を検討し、そのスメアが加齢依存的に増えているかどうかを解析した。その結果、スメアとして抗タウ抗体が認識する抽出条件を見いだすことに成功した。またそのスメア状の反応性はより老齢のハエの方が若齢のハエよりも濃いことがわかった。これらの結果はこの抽出方法がハエモデルにおけるタウの蓄積を評価するための解析方法として適している可能性を示している。

平成26年度に開始したローズベンガルの超老齢カニクイザルへの投与試験は平成27年度秋まで続き、合計1年間の投与後に脳を解剖するとともに脳脊髄液を採取した。投与前にも行っていた食物回収試験は個体差の大きさから解釈の難しさが懸念されたため平成27年度に入り、新たな記憶学習試験としてタッチパネル式の試験導入を検討した。しかしこ

の試験に用いるタッチパネル式の機器にサルがおびえず、また積極的に興味を示すまでには少なくとも数ヶ月の期間を要することが判り、投与期間中にこの機器を用いた記憶学習試験を行うことは出来なかった。投与後に採取した脳や脳脊髄液などの資料はそれぞれ適切に保存しており、今後詳しく解析する予定である。

D. 考察と結論

タウを標的とした薬の開発において重視されるのがその脳内蓄積と認知機能低下の相関性である。ショウジョウバエモデルを用いた候補薬剤の探索においてはサルコシル不溶性画分中のタウの蓄積と何らかの相関がある機能的変化を見いだすことを目標とし、少なくとも負の重力走性異常という行動的な異常との相関を見つけた。この相関性にもとづき探索を行い、ローズベンガルというメチレンブルーよりも安全にタウ病態を改善する物質を新たに同定することが出来た。しかしその後、必ずしも全てのタウ発現ハエモデルにおいてタウ蓄積に対して同じ効果が無い物質がみられたことはこの探索システム自体がまだ完全には確立できていない可能性も考えられた。またタウ創薬における最大の問題はその蓄積と神経機能不全との間にある因果関係でありまたその機序である。ショウジョウバエモデルから抽出したサルコシル不溶性タウはラダー状であり、ヒトのスメアーとは異なる。この点から再度生化学的な検討を行った結果スメアー状の反応性を見いだしたことは一つの前進であった。このスメアー状の反応はサルコシル不溶性タウとは異なるためタウ発現ハエをタウの蓄積モデルとして考えた場合、サルコシルに不溶化までは至らないもののタウが凝集・蓄積していると捉えることができる。この状態のタウがハエの脳内において機能異常を引き起こすメカニズムはヒトのアルツハイマー病において神経原線維変化形成時に認知機能障害を引き起こすメカニズムとは必ずしも一致しないことも考えられる。このことはモデルとしての確度が低いと解釈することにもなるが、一方でタウの *in vivo* における凝集・蓄積を解析し評価する目的においては全ての機序を模倣できていなくともよいと考えることも出来る。ヒトの神経原線維変化から抽出する方法で検出されるタウはその抽出方法自体に意義があるものの、モデル生物を用いてタウの凝集・蓄積が機能異常を引き起こすメカニズムを解析するためにはその抽出方法ではなくタウ凝集・蓄積を示す生化学的現象を捉えることがタウ病態の本質を解明するためには重要なのではないかと考える。

超老齢のカニクイザルはげっ歯類では補いきれない霊長類としての共通性を生かした外挿性の高さに期待することが多い。しかしその個体数の少なさや研究時間の長さなどはそのモデル動物としての利用を困難とする。本研究で合計 6 頭の超老齢個体を用いることができたことはまさに僥倖であり、その資料の解析を慎重にかつ大胆に行って行く所存である。

モデル生物を利用した研究は様々な目的に応じて広がっている。ショウジョウバエモデルを用いた *in vivo* スクリーニング系の構築を目指したが、そのより良い評価ポイントを決めることやタウ病態の解明に向けた研究など課題はまだ多いことがわかった。全てのモデ

ルはヒトの病態とは完全には一致しないといった前提をふまえた上でヒトでは出来ない研究を行うことでアルツハイマー病病態の解明に一步近づきたいと考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

平成 26 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：「酸化ストレスと抗タウ治療薬」 *Geriatr. Med.* 52, 977-997 (2014).

平成 27 年度

1) Soeda Y, Yoshikawa M, Almeida O, Sumioka A, Maeda S, Osada H, Kondoh Y, Saito A, Miyasaka T, Kimura T, Suzuki M, Koyama H, Yoshiike Y, Sugimoto H, Ihara Y, and Takashima A. "Toxic tau oligomer formation blocked by capping of cysteine residues with 1,2-dihydroxybenzene groups." *Nat. Commun.* 6, 10216 (2015).

2) Sheik Mohideen S, Yamasaki Y, Omata Y, Tsuda L, Yoshiike Y. "Nontoxic singlet oxygen generator as a therapeutic candidate for treating tauopathies." *Sci. Rep.* 5, 10821 (2015).

2. 学会発表

平成 26 年度

1) 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." 日本認知症学会学術集会, 2014, 横浜

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, Washington DC

3) Sahabudeen Sheik Mohideen, Yuji Yoshiike "Identification of a seed for targeting tau accumulation in drosophila model." Cell Symposium, 2014, Arlington

4) 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" 名古屋グローバルリトリ-

ト、2014, 大府

5) 吉池裕二、津田玲生、山崎泰豊、小又尉広、杉本昌隆、橋本理尋、高島明彦、Sheik Mohideen Sahabudeen “Analyses on the use of oxidative eustress for potential Alzheimer's therapy” 日本基礎老化学会、2014, 大府

平成 27 年度

1) 吉池裕二、土屋由加子、Sheik Mohideen Sahabudeen 「In vivo スクリーニングシステムを用いたタウ蓄積阻害剤の探索」 日本認知症学会、2015, 青森

2) Sahabudeen Sheik Mohideen, Yasutoyo Yamasaki, Leo Tsuda, Yuji Yoshiike “Effects of methylene blue and another oxidant on human tau transgenic fly models.” International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases, 2015, Nice

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

平成 26 年度

発明者：吉池 裕二

出願人：独立行政法人 国立長寿医療研究センター

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：平成 26 年 10 月 22 日

出願番号：(国内) 特願 2014-215409

平成 27 年度

発明者：吉池 裕二

出願人：国立研究開発法人 国立長寿医療研究センター

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：平成 27 年 10 月 21 日

出願番号：(米国) 14/919241

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし