

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（27-17）

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

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  $\beta$  アミロイド仮説が提唱されて以来今日まで  $\beta$  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について研究を進め、認知機能低下進行を阻止する薬剤の開発、標的分子の探索、タウを介した脳機能低下を鋭敏に検知するバイオマーカーの開発を目指す。

これまでの研究から、タウは老化または  $\beta$  アミロイドの蓄積などにより速やかに過剰リン酸化され細胞質で互いに会合することで可溶性オリゴマーを形成する。40 分子のタウで形成されたオリゴマーが  $\beta$  シート構造を持つと不溶性の顆粒状構造物となり、これらが互いに結合することでタウ線維を形成し、神経原線維変化となる。タウトランスジェニックマウスの解析から可溶性タウオリゴマー形成はシナプス消失に、顆粒状凝集体形成は神経細胞脱落に関与することを主任研究者らは明らかにしている。さらに、顆粒状タウオリゴマー形成をカテコール核を持つ化合物が抑制することを示した。カテコール化合物はキノン体となりタウのシステインに存在する SH 基による求核反応により共有結合をする。システイン残基をカテコールによって修飾されたタウはオリゴマー形成が出来ないことを見出した。神経伝達物質の量に変化を与えず、血液脳関門を通過する化合物としてイソプロテレノールを選択し動物モデルへの経口投与でタウ凝集抑制と神経脱落を阻止が見出された。血中濃度、脳内濃度の測定では臨床用量でタウ凝集阻害濃度に達することが推定され、カニクイザルに臨床用量 8 週間連続経口投与し安全性を確認した。シナプス消失阻害薬を目指し、タウ mRNA 運搬、タウ結合膜脂質 LX1 の創薬標的分子を見いだすことを目的とした研究を行った。タウ mRNA は樹上突起に運搬する RNA 結合蛋白顆粒の中に含まれ、シナプス蛋白と同様神経刺激によってタウ発現が起こることを見出した。このタウ発現により神経変性時に観察されるタウの somatodendritic 局在が引き起こされる。

これまでに Mn-enhanced MRI で見出された加齢、 $\beta$  アミロイドによる神経の過活動が神経変性の原因となることが推測された。膜脂質 LX1 の合成酵素を欠損させたマウスで膜脂

質 LX1 の減少とタウの過剰リン酸化が観察された。LX1 の減少はアルツハイマー病脳でも観察されており LX1 の代謝経路とその調節シグナルがアルツハイマー病治療の創薬標的になると考えられた。

#### 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

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)

添田 義行 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (外来研究員)

吉川 弥里 国立長寿医療研究センター 分子基盤研究部 (研究員)

小林 俊亮 日本大学 薬学部 (准教授)

#### A. 研究目的

認知症患者数の増大により 2050 年までに介護費用が倍増予想されている。認知症の中で最も多い原因疾患であるアルツハイマー病の予防法、根本的治療法は $\beta$ アミロイドを減少させる療法が試みられてきたが、現在まで確立されていない。タウ病変は認知機能低下と明らかな相関が認められているものの、その治療法開発は注目を浴びていなかった。しかし、基礎研究の進展に伴い、神経原線維変化形成過程で微小管変性、シナプス消失、神経脱落が起こり、それが認知機能低下の要因であることが明らかになり、タウを標的とした治療法開発が注目されてきている。これまで本研究では神経脱落に関与するタウ凝集体を見いだし、その凝集阻害剤をスクリーニングし既存薬でもある化合物イソプロテレノールを見いだした。臨床用量でイソプロテレノールはタウ凝集抑制の十分な脳内濃度に達することが予想され臨床試験が視野に入ってきている。その為、タウ凝集阻害、神経脱落抑制を短期間の試験で正確に示すバイオマーカーが必要とされ、この開発を行う。更に Mn-MRI による脳活動測定から APP マウスで MCI 患者と同様の海馬過活動が観察されたため、既存薬からこれを抑制し記憶学習改善を引き起こすものを検索する。タウ凝集以外の標的設定に関してこれまでの長寿医療研究開発から 2 つの新たな知見が明らかになってきている。タウは生理機能としてシナプス可塑性に関与することを明らかにしている。住岡はタウと特異的に結合する膜脂質 LX1 を見だし、この LX1 がタウと結合することでタウ凝集阻害能を持つことを示した。文献検索ではアルツハイマー病患者脳や、アルツハイマー病のモデル動物脳で LX1 の減少が報告されている。さらに住岡は、LX1 の合成酵素遺伝子を欠損させたマウスの脳で、LX1 の欠損とともにタウの異常なリン酸化が亢進することを明らかにした。これらの知見は、生体内での LX1 の代謝の異常がアルツハイマー病の発症・増悪に関与する可能性を示唆しており、LX1 を対象としたアルツハイマー病の補充療法や病勢評価を期待できる。そこで、動物モデルを用いてタウ・LX1 結合の生物学的意味を検討する。

変性を起こしている神経細胞ではタウの分布が軸索から細胞体・樹状突起へと変化している。このタウの分布変化が神経変性を解く鍵になると考えられている。そこで、小林らはタウの樹状突起分布に関わる因子を新たな標的分子として設定し、それに作用する化合物を得てタウの過剰な分布を制御することでシナプス脱落の抑制を目指す。タウ mRNA は他のシナプスタンパク同様、樹状突起 mRNP (RNA・タンパク質複合体) に含まれ、後シナプス部へ輸送されることがわかってきた。さらに神経細胞をグルタミン酸で刺激すると、短時間の内に樹状突起内でタウの翻訳増大と、リン酸化が起こる事を示す結果が得られている。これらのことから、mRNA 輸送と刺激による過度の翻訳およびリン酸化が樹状突起へのタウの分布とシナプス消失の過程に関連していることが示唆される。したがって、樹状突起 (シナプス) 内のタウの量を調節することは有効であると考えられる。そのためにタウ mRNA の樹状突起輸送機構と刺激に応じた翻訳活性化機構を解析し、制御に関わる分子標的に作用する化合物を見出す。

本研究グループはこれまでアルツハイマー病におけるタウ凝集機構と脳機能低下について基礎研究を行いタウ凝集過程とシナプス消失、神経脱落の関係を明らかにしている。この課題によってタウ凝集以外を標的とする抗タウ創薬を目指す。

## B. 研究方法

X1 に関してこれまでにタウ凝集阻害作用機序、薬理効果を得るための血中濃度、脳内濃度の決定がマウスで行われ、安全性についてサルを用いて検討を行っている。文献等から得られる情報からヒト臨床用量で十分なタウ凝集抑制脳内濃度になることが予想されており、これら検討後臨床試験へと進める。臨床試験を行う上で評価項目としてタウ PET、脳脊髄液タウ量を測定することを予定しているが、タウ凝集阻害とこれらの関係は不明であり、動物モデルを用いて関係性を明らかにする。また、短期に病勢変化を見いだせるバイオマーカー開発を行う。(高島、添田)

Mn-MRI 法を用いて APP マウスでは MCI 患者で観察されるのと同様の海馬過活動、前頭前野の活動低下が観察され、モリス水迷路による学習記憶障害を示す。これを指標にすでに使用されている薬剤を用いて海馬過活動と前頭前野の低活動を抑制し、学習記憶を改善する薬剤を検索する (高島、吉川)

タウ・膜脂質 LX1 結合の生物学的意味を明らかにすると共に細胞モデル、動物モデルを用いて治療薬としての可能性またはバイオマーカーとしての可能性を評価する。LX1 によるタウ病変制御の解析：生体内における LX1 とタウの結合の生理的意味を、動物モデルを用いて明らかにすることを目的に LX1 欠損マウスの脳内タウについて、発現量・リン酸化修飾・局在変化を、生化学的分画と免疫組織染色で観察する。また特にタウの凝集への作用を明らかにするため、LX1 が欠損し P301L タウを遺伝子導入したマウスを作成する。作製

したマウス脳内よりサルコシル不溶性タウを調製し、LX1によるタウの凝集への作用を評価する。さらにアルツハイマー病にみられるLX1の代謝異常の仕組みを明らかにするため、アルツハイマー病モデルにおけるLX1とその前駆体・代謝産物、及びそれらの合成・代謝酵素の発現・動態を明らかにする。以上の目標を通して、LX1を対象とする補充療法や病勢評価の可能性を検証する（住岡）。

#### （倫理面への配慮）

本研究課題の遂行にあたっては、モデル動物を対象とした検証実験が必要となるが、それらの実施にあたっては、国立長寿医療研究センター内の動物実験委員会での承認を受け、また同センターが定める動物実験指針に従い動物愛護に十分留意する。

### C. 研究結果

高島らは化合物スクリーニングから見出されたタウ凝集阻害剤イソプロテレノールが、我々の所有するP301LTgマウスだけではなく、PS19,rTg4510マウスにおいてもタウ凝集阻害効果を示し、さらに神経脱落による脳室拡大を抑制することを示した。タウ凝集阻害機構を検討した結果、カテコール核が酸化体（キノン体）となった時にCysのSH基から求核反応を受け、共有結合することが見出された。Cys残基にイソプロテレノールが結合しアミノ酸修飾することで、ジスルフィド結合を介したタウ・タウ相互作用が阻害される。その結果、タウオリゴマー形成が行われなくなることで毒性を持つ顆粒状タウ凝集体形成が阻害されることが示された。イソプロテレノールの効果は我々の作成したマウスモデルだけでなくPS19（P301Sを発現するマウス）、rTG4510（P301Lタウを内在性タウの30倍量発現するマウス）においてもタウ凝集阻害と細胞脱落抑制が観察された。

マウスモデルを用いた時のタウ凝集阻害有効最低血漿中濃度は3.12 ng/ml(12.5nM)で、脳内で濃度は実測出来なかったものの、高濃度投与群から測定した脳内濃度から計算した推測値として、0.07 ng/ml (0.28 nM)が得られた。ヒトへのイソプレナリン0.2 mg/kgの経口投与で300ng/mlの血中濃度となることが報告されているため、長期投与の安全性確認のため、プロタノールS錠を臨床用量前後で1日2回カニクイザルに8週間連続投与したところ、血液生化学、一般状態、心筋梗塞マーカー、剖検いずれにおいても異常は見出されず、脳内濃度も7.5mg投与でタウ凝集抑制に十分な濃度を示した。また、単回投与でプロタノール15mg400錠相当をカニクイザルに投与したが、一般状態でアドレナージック受容体の活性化に起因する異常は観られなかった。これらのことから、7.5mgプロタノール投与は十分な安全性とタウ凝集抑制による神経脱落阻止に有効であると結論した。バイオマーカーとしてはタウPETの使用が確実な結果をもたらすと考えられた。さらに産業総合研究所小島博士とデータ検討を行った結果、脳脊髄液中のp75レベルがMMSEとよく相関することが分かった。p75はdeath domainを持つ受容体であるが通常細胞外ドメイ

ンが切られている。このことから脳脊髄液中の p75 レベルは細胞死の程度を反映しているのではないかと考えている。

住岡は、これまでに、タウが特異的に結合する脂質成分 LX1 を同定した。生体内における LX1 の欠乏による効果を検討したところ、脳内タウの過剰リン酸化を引き起こすこと、また、培養細胞系で LX1 投与によるタウ凝集抑制作用を明らかにした。

LX1 の合成代謝は、古典的な代謝経路として、合成酵素と代謝酵素および補酵素が明らかになっている。そこで、内在性 LX1 量を調節する因子を決定するため、合成酵素遺伝子と代謝酵素遺伝子に対する RNAi を試みた。各遺伝子の標的配列を 1-3 箇所設計し、pGeneClip-hyg システムでベクターを構築した。培養細胞系での一過的発現系で、RNAi の有効な配列を決定し、Tau 発現 N2a 細胞から、定常的に shRNA を産生する株を作成した。

個体レベルで内在性 LX1 の役割を評価する系として、合成酵素遺伝子を欠損させたマウスが LX1 の欠乏によって脳内タウの過剰リン酸化を引き起こすことを確認している。そこで次に、分解酵素遺伝子を欠損させ、内在性 ST の増大を起こすマウスを作成した。これらのマウスを用いて LX1 のレベルとタウ凝集の関係を調べるため、ヒトタウ P301L 変異体を大脳皮質に発現するマウスと交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作成中である。

吉川らは若齢 APP トランスジェニックマウス J20、及び老化コントロールマウスにおいてヒト MCI で観察されるのと同様の海馬神経過活動が観察された。このことは  $\beta$  アミロイドが老化促進因子であることを示している。さらにタウノックアウトマウスと掛け合わせるとこの海馬過活動がコントロールレベルまで戻ることが観察された。この海馬過活動と行動の関係を明らかにするためモリス水迷路を行った。タウノックアウトと掛け合わせた J20 の海馬過活動は元のレベルに戻ったが水迷路における場所記憶障害は改善されなかった。この結果は Mucke らの報告した結果と異なる。Mucke に確認したところ再現が取れていないとのことで、これらのことから海馬過活動と J20 の記憶障害は関連がないと結論付けた。一方、新規環境における初期の活動量と海馬神経活動に正に相関することが観察された。抗炎症作用を有する飲料成分が記憶障害の改善と J20 マウスの海馬過活動を低下させることを見出した。この化合物はタウ Tg マウスにおいても抗炎症作用を示した。

#### D. 考察と結論

認知症治療薬としてタウ凝集抑制剤カテコール核を持つ化合物の中からイソプロテレノール見だし、モデルマウスを用いた動物実験では、投与用量、期間に依存的なタウ凝集抑制、それに伴う神経脱落阻害と神経機能障害の抑制が観察された。この効果は複数の異なるトランスジェニックマウスでも確認され、イソプロテレノール投与がヒトにおいても十分なタウ凝集阻害と神経脱落抑制をもたらすことが強く期待される。カニクイザルを用

いた安全性試験では臨床容量のイソプロテレノールを8週間1日2回経口投与しても副作用相互作用を阻害し、単回投与では臨床容量の100倍まで副作用を示さなかった。この時、血中濃度と脳内濃度を測定した結果、血中から20%の移行が観察された。臨床容量の半量で十分なタウ凝集阻害を引き起こす脳内濃度に達することが示された。これらの結果は臨床容量以下のイソプロテレノール投与は十分なタウ凝集阻害が見込まれる認知症治療薬となりうることを示している。タウのシステイン残基がタウ凝集阻害剤の標的になりタウオリゴマー形成が阻止することを示している。この結果からさらに安全性が高く阻害効率の高い化合物開発が進むことが期待される。現在、カテコール核を持つパーキンソン病治療薬L-DOPSの家族性タウオパチー患者に投与し、タウPETでその進行抑制を観察する臨床研究が順天堂大学と進められている。イソプロテレノールは本研究センターで、マイクロドーズ投与によるヒト試験から臨床研究を進める予定である。

LX1の研究はタウとアルツハイマー病にみられる脂質の代謝異常を結びつける点でユニークな研究であり、認知症治療へのValidationから薬品会社と共同で研究が進められている。海馬過活動については飲料会社が持つ抗炎症作用を持つ成分が抑制効果を持つことから臨床研究に向けた研究が進められている。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 添田義行, 高島明彦. 認知症根本治療に向けたタウ標的薬剤の開発. 日本認知症学会誌 **DEMENTIA JAPAN** 29 (2), 184-194. 2015
- 2) Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Hayakawa H, Nagai M, Ohyama M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 $\beta$  signaling pathway. *Hum Mol Genet.* 2015 Sep 1;24(17):4879-900. doi: 10.1093/hmg/ddv212. Epub 2015 Jun 8.
- 3) Xie C, Soeda Y, Shinzaki Y, In Y, Tomoo K, Ihara Y, Miyasaka T. Identification of key amino acids responsible for the distinct aggregation properties of microtubule-associated protein 2 and tau. *J Neurochem.* 2015 Oct;135(1):19-26. doi: 10.1111/jnc.13228. Epub 2015 Aug 26
- 4) Yagishita S, Murayama M, Ebihara T, Maruyama K, Takashima A. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ -mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate

Receptor Subunit GluA2. *J Biol Chem*. 2015 Dec 4;290(49):29438–48. doi:  
10.1074/jbc.M114.619668. Epub 2015 Oct 15.

- 5) Soeda Y, Yoshikawa M, Almeida OF, 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*. 2015 Dec 16;6:10216. doi:  
10.1038/ncomms10216.
- 6) Moreira PS, Sotiropoulos I, Silva J, Takashima A, Sousa N, Leite-Almeida H, Costa PS. The Advantages of Structural Equation Modeling to Address the Complexity of Spatial Reference Learning. *Front Behav Neurosci*. 2016 Feb 26;10:18. doi:  
10.3389/fnbeh.2016.00018.

## 2. 学会発表

- 1) 高島明彦. Therapy against toxic tau aggregation in AD. 第 56 回日本神経学会学術大会, 新潟市, 2015 年 5 月 21 日
- 2) 住岡暁夫. 脂質代謝異常によるタウ病変形成の制御. 小野医学研究財団第 26 回研究成果報告会, 大阪府豊中市, 2015 年 6 月 6 日
- 3) 住岡暁夫. 膜脂質によるタウの病変制御. 新学術領域研究「脳タンパク質老化と認知症制御」第 2 回班員会議・リトリート, 熱海市, 2015 年 6 月 12 日
- 4) 添田義行. タウ凝集阻害剤の探索. 新学術領域研究「脳タンパク質老化と認知症制御」第 2 回班員会議・リトリート, 熱海市, 2015 年 6 月 12 日
- 5) 高島明彦. アルツハイマー病治療に向けて: タウ研究からのアプローチ. 第 10 回青森神経科学談話会, 弘前市, 2015 年 6 月 27 日
- 6) Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Nagai M, Takahashi K, Ohyama M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T LRRK2 iPSC-derived neurons exhibit increased Tau phosphorylation. 第 38 回日本神経科学大会, 2015 年 7 月 28 日 神戸市
- 7) 住岡暁夫. 脂質によるタウ病変制御. 2015 タウ研究ミーティング, 2015 年 9 月 4 日, 京都市
- 8) 添田義行. タウ凝集形成に関わるタウの配列の解析. 2015 タウ研究ミーティング, 2015 年 9 月 4 日, 京都市
- 9) 高島明彦. タウを標的とした認知症治療薬の開発. 神経学セミナー, 2015 年 9 月 4 日, 東京都文京区
- 10) 高島明彦. タウ蛋白質を標的にしたアルツハイマー病治療薬開発. 厚生労働省委託事業「ヒト幹細胞情報化推進事業」SKIP セミナー/慶應義塾大学総合医科学研究

センターセミナー， 2015年9月11日， 東京都新宿区

- 11) 高島明彦. タウイメージングに期待されること. 第34回日本認知症学会学術集会, 2015年10月2日, 青森市
- 12) 高島明彦. Mechanism of neurodegeneration through tau and therapy for taupathy. 新学術領域研究「脳タンパク質老化と認知症制御」第1回国際シンポジウム, 2015年10月9日, 名古屋市
- 13) 高島明彦. Strategy of tau related therapy. 第55回日本核医学会学術総会 シンポジウム, 2015年11月6日, 東京都新宿区
- 14) 住岡暁夫, 後藤麻子, 添田義行, 高島明彦. 脂質によるタウ病変制御. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ, 2015年12月2日, 神戸市
- 15) Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Nagai M, Ohyama M, Ryo M, Ogino M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F, Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3beta signaling pathway. International Anesthesia Research Society 2015 Annual Meeting and International Science Symposium, 2015年12月9日, Honolulu, Hawaii.
- 16) Takashima A. Mechanism of Neurodegeneration through Tau and Therapy for AD. The 1st International Gachon Neuroscience Symposium, 24 Feb. 2016, Incheon, Korea.
- 17) 吉川弥里, 木村哲也, 高島明彦. in vivo マンガン増強MRI法を用いたhAPP Tgマウスにおけるタウタンパク質の役割. 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月11日, 横浜市.
- 18) 太田悦朗, 仁平友子, 内野彰子, 今泉陽一, 岡田洋平, 赤松和土, 高橋加代子, 永井真貴子, 大山学, 梁正淵, 荻野美恵子, 村山繁雄, 高島明彦, 西山和利, 水野美邦, 望月秀樹, 小幡文弥, 岡野栄之. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons exhibit increased Tau phosphorylation. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月17日, 大阪市.

#### 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