

長寿医療研究開発費 平成24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

一般的に酸化ストレスは老化やアルツハイマー病の原因であると考えられているが、一方で軽度の酸化ストレスは寿命を延ばすなどの報告もある。昨年度アロキササンという活性酸素を発生する化合物を低濃度投与することでモデルマウスの幾つかのタウ病変が改善することを報告した。そこで低濃度アロキササン投与のマウスの寿命に与える影響をみたところ平均寿命は変わらないものの最長寿命を5ヶ月ほど延ばすという予備的な実験結果が得られた。その他今年度は培養細胞を用いてタウの代謝・凝集に影響を与える因子の解析を進めるうちに  $A\beta$  の蓄積がきっかけとなってどのような経路でタウの蓄積に至るのか薬理学的実験から仮定するに至った。また津田プロジェクトチームの協力のもと、タウを発現するショウジョウバエのモデルを使ってタウの蓄積やそれにもなう表現型を解析する実験系を立ち上げた。

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

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。これまで低濃度アロキササン投与による軽度酸化ストレス応答がタウの病態を改善することを見つけた。しかし酸化ストレスは老化の原因として信じられていること、そして老化はアルツハイマー病のリスク因子であることから酸化ストレスを一次作用にした治療薬の開発は難しいと思われた。そこ

でまず低濃度のアロキサン投与が寿命に与える影響を調べることで老化への作用を解析した。[研究テーマ 1]

タウは様々な翻訳後修飾を受けるタンパク質として知られる。神経原線維変化中に見られるタウの修飾も重要と思われるが、本研究では特にタウの代謝に着目した。その理由は通常タンパク質は生成と分解のサイクルによって維持されているが、分解が上手くはたらかなくなれば蓄積するからである。タウの代謝機構に影響を与える因子を解析すればアルツハイマー病の発症機序がわかるだけでなく治療薬の標的もみつかる可能性があると考えた。[研究テーマ 2]

これまでタンパク質、培養細胞、マウスモデルを用いて解析を行ってきた。タンパク質と培養細胞の間もさることながら、*in vitro* 培養細胞と *in vivo* マウスの間には様々なギャップがあることを認識するに至った。このギャップを埋める方策としてショウジョウバエを使うことにした。ショウジョウバエには哺乳動物にある血液脳関門が無いなどの違いがあるものの多くの種類の細胞が器官、組織を作り生命現象をかたち作る点ではヒトと同じであり培養細胞では構築することが難しい性質を有する。またマウスモデルの使用経験からマウスの寿命が 2~3 年に及ぶことから、老化を伴うより正確なアルツハイマー病のモデルを用いた研究を計画すればマウスを飼育し維持するために最低でもそれだけの時間を要することを念頭に入れなければならない。当プロジェクトに与えられた時間は最大で 5 年間であり、例えば候補となる薬物の投与実験を考えたとき複数個試すことはおろかたの一つであっても投与量、投与開始時期、投与期間を検討するには制限時間がボトルネックになる。そういった意味においても寿命が 2~3 ヶ月と比較的短いショウジョウバエを用いる利点が見込まれる。このような理由からショウジョウバエモデルを用いた実験系を準備することにした。[研究テーマ 3]

## B. 研究方法

当研究所にはエイジングファームという素晴らしい施設がある。エイジングファームではマウスやラットを加齢飼育し様々な月齢の動物群が実験に使用できるよう準備されている。18ヶ月齢のマウスに低濃度のアロキサンを腹腔内投与して血糖値の上昇や体重の低下が無いことを確認後それぞれのマウス個体の寿命をモニターした。[研究テーマ 1]

ヒトタウを過剰発現した培養細胞に様々な化合物を添加して数時間後細胞を回収する。細胞を破碎して分画したものを生化学的に解析する。まずタウへの効果を解析しその後化合物による作用に関連すると思われるタンパク質を解析した。[研究テーマ 2]

今年度新しく流動研究員として Sheik Mohideen Sahabudeen (サハ) 氏を採用した。彼には新しい実験技術を学ぶ意欲があったこと、そして何よりも創薬モデル動物開発研究プロジェクトの津田先生をはじめとして小又さん、山崎さん達の多大なるご厚意によりサハさんにショウジョウバエを用いた実験手法をご教授くださったことでショウジョウバエを用いた実験系をセットアップすることができた。[研究テーマ 3]

(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

実験に用いたマウスの匹数がさほど多くないのでまだ予備実験の段階ではあるが低濃度アロキサン投与はマウスの平均寿命には大きな影響を及ぼさなかったものの最長寿命を5ヶ月ほど延ばす傾向がみられた。[研究テーマ 1]

アミロイド仮説によれば  $A\beta$  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。 $A\beta$  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レベルが増加した。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 受容体を介したプロセスがはたらいたと考えられる。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。グルタミン酸やアクチン脱重合によりタウだけでなくポリユビキチン化されたタンパクも増加していた。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これら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。[研究テーマ 2]

津田プロジェクトの維持しているショウジョウバエの中から最も長いアイソフォームのヒトタウを過剰発現する系統を提供していただいた。ハエを飼育し繁殖して維持する方法も津田プロジェクトの方々にご教授いただいた。使用するタウのハエモデルは2種類ある。一つはハエの複眼にタウを発現させたものであり、もう一つはハエの脳に発現させたものである。タウを複眼に発現させたハエはその複眼の表面に凸凹ができる。これを SEM で解析する。また脳にタウを発現させたハエに起こる行動異常はハエが重力に逆らって動く性質を利用して解析する。これらのハエの頭部を切断して回収しホモジェナイズ後分画して生化学的に解析する方法を確立した。[研究テーマ 3]

### D. 考察と結論

微量の活性酸素発生物質の投与はせん虫の寿命を延ばすといった報告もあるので、少な

くとも寿命の観点からすると軽度酸化ストレスは老化を促進するようには効かない可能性がある。それでも活性酸素は細胞毒性を持つことは知られており、またアロキサンから発生する活性酸素がすい臓のβ細胞を破壊して1型の糖尿病を生じることなどはアロキサンそのものを治療薬として開発する大きな障壁となる。しかし活性酸素が持つ高い酸化活性とタウの凝集について最近興味深い報告が出た。メチレンブルーはそのタウの凝集阻害活性から治療薬としての開発が進み現在第3相臨床試験が行われている。これまでメチレンブルーによるタウ凝集阻害の機構について分っていなかったが、二つのグループがメチレンブルーはタウタンパク質を酸化修飾することでその凝集を阻害することを報告した。メチレンブルーは活性酸素を発生する化合物であり、医学生物学的にはオキシドールと同属とみなされている。とすればメチレンブルーによって発生した活性酸素がタウを酸化して凝集を抑制したとも考えられる。まだ生体内におけるメチレンブルーの作用機序は明らかになっていないが、抗タウ治療効果における酸化あるいは酸化ストレスの役割を解明できれば新しい戦略を立てることができる。[研究テーマ1]

現在アルツハイマー病に処方される薬は症状の悪化を遅らせるが止めることはできない。そこでアルツハイマー病の原因とされる老人斑や神経原線維変化を標的にした根本治療薬開発が進んでいる。メチレンブルーの第2相臨床試験の結果は認知機能の低下を著しく抑制するというものであった。このことから抗タウ治療薬は症状の悪化を阻止する薬として期待できる。一方で、病気の進行を阻止するだけでなく既に進行してしまった患者の認知機能改善を目的とした薬の開発も進めなければならない。そのためにはアルツハイマー病の病態をもっとよく知る必要がある。老人斑と神経原線維変化がアルツハイマー氏によって発見されてからおよそ100年が経つがこの二つの病理像の間にある関係はまだ解明されていない。ただ実験技術の向上によって多面的な解析が可能になり多くのことが分ってきたのも事実である。それらの研究報告を考え合わせてAβからタウに至る経路を培養細胞という単純化された実験系で検証した。この研究からAβからタウに至る経路を仮定する幾つかの分子レベルの傍証を得た。これまでの他の研究報告とあわせて私はAβによるグルタミン酸の取込み阻害がシナプス外NMDA受容体を活性化して長期抑制(LTD)様のスパイン消失を生じた結果、アクチンが再構築できずにオートファジーが阻害されタウが蓄積すると考えている。このように仮定した経路には分子だけでは描ききれない現象が含まれている。それらを今後追跡したい。[研究テーマ2]

ショウジョウバエモデルの実験系を用いて薬剤投与実験の準備を始めている。投与方法はいろいろあるが餌にまぜることで与える方法を検討している。この方法ではショウジョウバエが取り込んだ薬剤の量にばらつきが予想される。どのようにしてその点を解消するかもしくはばらつきがある中でも明確な効果が得られる薬剤を選択するかが当面の課題である。ショウジョウバエを用いた研究は当研究プロジェクトのサハさんに担当してもらっているが、ハエの飼育・繁殖・維持・解析方法を短期間で習得したこともさることながら研究者としての態度、心構えといったものが出来つつあり今後更なる成長が期待される。[研

## 究テーマ 3]

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Liao YH, Chan YJ, Yoshiike Y, Chang YC, Chen YR: 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 DB, Zagorski MG, 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.

#### 2. 学会発表

- 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, ニューオリンズ.
- 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.

### 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