

20116003B

厚生労働科学研究費補助金

認知症対策総合研究事業

リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しい
アルツハイマー病の根本治療法に関する研究

総合研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成24年(2012年)5月

目 次

I. 総合研究報告書

- リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しい
アルツハイマー病の根本治療法に関する研究……………1
武田 雅俊

II. 分担研究報告書

1. 重合核依存性タウ凝集モデルの構築とタウ蓄積の制御……………8
長谷川 成人
2. 顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究……………13
高島 明彦
3. 神経変性に対するシャペロン誘導剤の効果に対する研究……………18
工藤 喬
4. タウの分解・重合過程に関する研究……………21
田中 稔久
5. タウオパチーとしてのアルツハイマー病患者の精神行動評価……………28
数井 裕光
6. 小胞体ストレスによる神経細胞内タウ凝集に関する研究……………30
武田 雅俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………33

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………39

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）
総合研究報告書

リン酸化タウの凝集阻害及び分解促進を標的とした新しいアルツハイマー病の
根本治療法に関する研究

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: 本研究は、リン酸化タウ凝集阻害やその分解促進を行うことでシナプス消失、神経脱落を抑制し、アルツハイマー病(AD)の根本的治療法を確立する事を目的とした。タウの凝集すなわち tauopathy の形成メカニズムの検討では、小胞体(ER)ストレスによりタウ蛋白の蓄積が認められ、ER ストレスの抑止がタウ凝集阻害に繋がる可能性が示された。また、細胞にタウ線維を導入試薬で導入すると、細胞内にタウの凝集が観察され、タウの伝播が tauopathy 形成に関与する事が示された。凝集阻害の観点からは、神経脱落に関与する顆粒状タウ凝集体形成を阻害する既存薬 X1 が得られ、P301L タウ発現マウスに投与したところ、神経障害の抑止が認められた。また、ポリフェノール化合物やフェノチアジン化合物をタウ発現マウスに投与すると、リン酸化タウの蓄積減少が確認されている。さらに、タウ発現マウスにリン酸化タウペプチドを用いたワクチンを投与したところ、タウの蓄積の現象が観察された。分解促進の観点からは、シャペロン誘導剤 BIX は神経変性過程を抑止する可能性が示された。また、アルツハイマー病に対するタウ線維凝集阻害物質の臨床治験をおこなうための臨床評価としては、精神行動障害の評価尺度としての NPI の有用性を示唆するものとも考えられた。

キーワード: タウ、tauopathy、オリゴマー、シャペロン、ER ストレス、ワクチン、NPI

分担研究者

高島明彦 国立長寿医療研究センター・分子基盤研究部長

長谷川成人 東京都精神医学研究所・プロジェクトリーダー

工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科・准教授

田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・講師

数井裕光 大阪大学大学院医学系研究科・講師

A.研究目的

AD の病態仮説として「アミロイドカスケード仮説」が提唱され、広く指示を受けている。この仮説に基づいたアミロイドワクチンやセクレターゼ阻害薬などは近年精力的に開発が進められている。しかし残念なことに、これらの臨床治験結果は芳しいものが少なく、「アミロイド仮説」以外の治療法開発も模索され始めている。

タウで構成される神経原線維変化はアミロイドによる老人斑とともに AD の主要な神経病理変化であるが、従来から認知症の

重症度は神経原線維変化が相関すると指摘されてきた。神経原線維変化はタウが凝集して形成され tauopathy と呼ばれるが、AD 以外にも tauopathy によって発症する認知症もあり、特に前頭側頭葉変性症の FTDP-17 はタウ遺伝子の変異がプライマリーに認知症を起こすことが注目されている。また、アミロイドをこころ発現させた AD のモデルマウスにタウのノックアウトマウスを掛け合わせると、神経障害が軽減するとの報告 (Roberson, et al. Science, 2007) もあり、タウの認知症状発症への関与が注目されている。

そこで、本研究では tauopathy 形成に繋がるタウ病理のメカニズムを検討し、タウの凝集阻害およびタウの分解促進の視点での新たな治療薬開発を進めた。また、開発された治療薬の臨床治験を行うにあたっての臨床評価法についても検討した。

B. 研究方法

①ER ストレスによる神経細胞内タウ凝集の研究

神経細胞 (SY5Y 細胞、初代培養神経細胞) に、グルコース除去、tunicamycin、thapsigargin、DTT で ER ストレスを与え、タウをウエスタン法で検討した。

ER ストレスによるタウの産生過程に対する影響を検討する目的で、ER ストレス下でのタウの mRNA 変化について RT-PCR を行った。また、翻訳に対する影響を検討する目的で、タウ遺伝子の 5'UTR を有するタウ発現コンストラクトと 5'UTR を欠失したタウコンストラクトを構築し、細胞に導入して ER ストレスによる反応の差について検討した。

ER ストレスによるタウの分解過程の変化を検討する目的で、パルスチェイスを行った。また、タウのエピキチン E3 ライゲースである CHIP について、ER ストレス下の変化について検討した。

②タウの伝播性の研究—培養細胞内へのタウ線維の導入

大腸菌に発現し、精製した 3 リピート (3R) タウ、4 リピート (4R) タウをヘパリン存在下でインキュベートすることにより線維化タウを作製した。超音波処理後、遺伝子導入と同じようにリポフェクタミンを用いて培養細胞内に導入した。対照としては線維化しない可溶性タウを用いた。また細胞はあらかじめヒト 3R タウ、あるいは 4R タウを発現させた SH-SY5Y 細胞、あるいは何も強制発現しない細胞を用いた。培養 3 日後に細胞を固定し、リン酸化タウを特異的に認識する抗体などを用いて、蛍光抗体法によるタウの免疫染色を行い、局在、凝集を観察すると共に、界面活性剤を用いた段階的抽出した試料をイムノプロット法により生化学解析した。

③顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

化合物マイクロアレイとリコンビナントヒトタウ溶液をインキュベートし洗浄後、抗タウ抗体によってマイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得る。得られた化合物は試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定する。更にどの段階での凝集阻害であるかを原子間力顕微鏡を用いて決定する。化合物は P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し

SDS 不溶性タウの形成阻害効果を細胞レベルで検討する。その中から IC50 が 100nM 以下で阻害効果を示す化合物を選択する。

④タウ線維化阻害剤の研究

P301L 変異タウを発現する Tg マウス (hemi 接合体, 雌, 12 週齢) に、ポリフェノール化合物の exifone, gossypetin, フェノチアジン化合物の lacmoid, ポルフィリン化合物の hematin を、それぞれ、粉餌に 0.05 あるいは 1% の濃度で混合し、32 週齢まで経口投与した。その後、マウスの脳、脊髄に蓄積するリン酸化タウを免疫組織化学、及びウエスタンブロットにて解析した。

⑤タウワクチンの開発

2 種類のリン酸化タウペプチド (RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHL:pS396/404), (STGSIDMVDSPLATLADE:pS422) を、16 週齢から 34 週齢まで、2 週-4 週おきに合計 6 回、免疫した。5 ヶ月齢の時点で採血し、免疫した抗原に対する抗体価の上昇を ELISA 法で測定すると共に、脳脊髄を採取し、免疫組織学的にタウの蓄積を観察した。

⑥シャペロン誘導剤 BIX の開発

BiP のプロモーター領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系によりコンパウンドライブラリーを検索した結果、BIX (BiP inducer X) を開発した。BIX を神経細胞に添加し、ウエスタン法やリアルタイム PCR などを用いて、BiP 誘導以外の ER ストレス反応 BIX が起こさないことを確認した。BIX を神経芽細胞腫 SK-N-SH に添加し、tunicamycin などによる ER ストレスによる神経細胞死を LDH アッセイや caspase のアッセイを行った。

ddY マウスの麻酔し、左総頸動脈から栓

子を挿入して中大脳動脈の起始部を閉塞して脳虚血モデルを作成した。BIX は虚血 30 分前、5 分後、3 時間後、6 時間後に脳室内投与した。虚血 24 時間後に神経学的症状を検討した後、断頭し脳切片を作成した。梗塞巣は TTC 染色により検討した。

スナネズミは、麻酔後総頸動脈を動脈瘤クリップで 10 分間閉塞し、再灌流 7 日後に脳切片を作成した。BIX は虚血前に脳室内に投与した。

⑦tauopathyとしてのAD病患者的の精神行動評価についての研究

大阪大学医学部附属病院神経科精神科神経心理専門外来を受診し、以下のADとMCIの診断基準を満たす患者に対して Neuropsychiatric Inventory (NPI) で精神行動障害の評価を行った。ADの診断基準はNINCDS-ADRDAのprobable ADの診断基準を満たす患者とした。またMCIの診断基準はPetersenの基準で、物忘れを自覚、または他覚しているが、日常生活は自立している、MMSE > 23、Clinical Dementia Rating が0.5、Wechsler Memory Scale- Revised の論理的記憶検査で健常者の平均点から1.5SD以上低いこととした。また頭部MRIや脳血流SPECTの結果も診断の参考とした。

C. 研究結果

①ER ストレスによる神経細胞内タウ凝集の研究

神経細胞 (SY5Y 細胞、初代培養神経細胞) に、グルコース除去、tunicamycin、thapsigargin、DTT で ER ストレスを与えると、タウ蛋白は上昇する。しかし、RT-PCR

によれば、ER ストレスによってタウの mRNA は上昇しない。また、5'UTR の有無によって、グルコース除去によるタウ誘導に差がないことから、ER ストレスはタウの転写および翻訳には影響しない事が示唆された。

ER ストレス下でタウのパルスチェイスを行うと、タウ分解が遅延していることが示された。また、タウの E3 ライゲースである CHIP が ER ストレス下では減少しており、ER ストレス下ではタウのエピキチン化が遅延して、プロテアソームでの分解が遅延し、タウが蓄積する傾向にある事が示唆された。

②タウの伝播性の研究—培養細胞内へのタウ線維の導入

ヒト 3R タウ、あるいは 4R タウを発現した SH-SY5Y 細胞に、予め試験管内で線維化した 3R タウ、あるいは 4R タウを遺伝子導入試薬を用いて導入した。4R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入するとリン酸化タウ陽性の凝集体形成が観察された。細胞の外から導入したタウ線維と細胞内に発現したタウを区別するため、GFP タグを付加したタウを細胞内に発現する実験も行ったが、外から導入したものを核として細胞内に発現するタウが凝集することが確認された。興味深いことに、4R タウを発現する細胞に 3R タウの線維を導入しても 4R タウの凝集が起こらず、3R タウを発現する細胞に導入した場合には凝集が観察された。逆に 3R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入しても凝集がおこらず、3R タウ同種のタンパク質の線維が導入された場合に限って凝集が進むことが判明した。

③顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に

関する研究

理研化合物バンク 6600 から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPR によって親和性の高い化合物約 100 種類が得られた。これらの化合物から試験管内タウ凝集系を用いて神経毒性を示すタウ凝集阻害を示す 3 化合物が選択された。その内 2 化合物は共通の骨格を有しており、この骨格を持つ既存薬でタウ凝集阻害効果を検討したところ全てでタウ凝集阻害が確認された。この骨格を持ち細胞膜透過性を有する X1 を第一の候補とし P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した。X1 は 100nM 以下で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察されることが示された。そこで、P301L 変異タウを発現するモデルマウス 19ヶ月令を用いて 3ヶ月間経口で X1 を投与した。非投与群と較べ投与群では脳各部位でのサルコシル不溶性タウ量は有為に 25%-50%低下を示した。神経細胞数を脳各部位で計測したところ P301L では non-Tg 群と比べて 15-25%の有為な神経細胞脱落観察されるが、X1 投与群では non-Tg マウスと同程度の細胞数を示し、タウ凝集による神経細胞脱落を阻止していることが示された。Mn-enhanced MRI 法はマウスなど小動物の行動課題中の神経活動をモニターする方法である。P301L マウスと non-Tg を比較すると場所記憶時に prelimbic で P301L マウスの神経活動の低下が観察される。X1 投与群ではこの活動低下は抑制され、non-Tg と同様の神経活動を示すようになる。P301L マウ

スの神経活動低下と X1 によるその抑制を確認するためオープンフィールドを利用した行動実験を行った。全体の行動量で変化は見られなかったが P301L マウスは最初の 1 分間で有為な行動低下を示す。これは P301L マウスでは prelimbic の関与する恐怖抑制機能が低下していることを示す。X1 投与群では最初の 1 分間での行動は non-Tg と同程度であり、恐怖抑制機能が正常に作用することを示した。

④ タウ線維化阻害剤の研究

タウの線維化阻害剤を経口投与したマウスの脳脊髄に蓄積するタウの異常病変の広がり免疫組織化学的に検討した。異常リン酸化タウの検出には、AT8 (pS202/pT205)、pS396 抗体を用いた。その結果、薬剤を投与しない対照マウスと比較して、1% exifone 投与マウスにおいて顕著なリン酸化タウ陽性構造物の減少が観察された。

マウス脳脊髄に蓄積するタウを定量的に解析するため、薬剤投与終了後、マウスから脊髄を取り出し、サルコシル不溶性画分を調製し、ウエスタンブロット解析した。その結果、個体間のばらつきはあるものの、1% exifone 投与群で約 50%、0.1% lacmoid で約 75% のリン酸化タウ蓄積量の減少を認めた。一方、1% lacmoid, 1% hematin, 1% gossipetin も投与群では対照群とほぼ同程度の量のタウ蓄積が観察された。

⑤ タウワクチンの開発

S396/S404 がリン酸化されたタウペプチド (pS396/pS404)、S422 がリン酸化されたタウペプチド (pS422) を免疫し、抗体価の上昇、タウ蓄積への効果を解析した。その結果、いずれの抗原を投与したマウスにおいても、免疫したペプチドに対する抗体価の

上昇が観察された。タウ蓄積への効果については、pS396/pS404 のリン酸化ペプチドを免疫したマウスにおいては不溶性タウの減少は観察されなかったが、pS422 を免疫した群では不溶性タウの減少傾向が観察された。N 数が少ないが、リン酸化 S422 のペプチドワクチンによってタウ蓄積が減少する可能性が示唆された。

⑥ シャペロン誘導剤 BIX の開発

SK-N-SH 細胞に BIX を投与したところ、濃度依存性に BiP を誘導することが示された。また、BIX は calreticulin などのシャペロンを若干誘導するものの、ほぼ選択的に BiP を誘導し、他の ER ストレス反応の分子への影響は認められなかった。

SK-N-SH に 5 μ M の BIX を 12 時間投与し、tunicamycin で ER ストレスをかけたところ、36、48 時間後のアポトーシスが抑制される。

マウスの中脳動脈を閉塞した脳梗塞モデルに BIX を脳室内投与した。TTC 染色を用いた梗塞巣の面積を検討したところ、虚血後 5 分後に 20 μ g を投与した群では有意に虚血巣が縮小していた。TUNEL 染色でアポトーシスを検討すると、虚血後 BIX 投与群では梗塞周辺部ペネンブラにおける TUNEL 陽性細胞は減少していた。

虚血後の投与時間であるが、5 分後と 3 時間後 BIX 投与が、有意に虚血巣を検証させ、脳浮腫も軽減することができた。

スナネズミを用いた一過性脳虚血では、cresyl viole 染色によれば、vehicle 投与で見られた虚血 7 日後の神経細胞の欠落が観察されたが、40 μ g BIX 投与群では有意に神経細胞の存続が認められ、10 μ g BIX 投与群にもその傾向が観察された。また NeuN 染色に

よれば、10 μ g および 40 μ g BIX とともに、7 日後の遅発性神経細胞死を有意に抑制していた。虚血 7 日後の CA1 領域の TUNEL 染色では、10 μ g および 40 μ g BIX とともに TUNEL 陽性錐体細胞の出現を有意に抑制していた。

⑦tauopathyとしてのAD病患者的の精神行動評価についての研究

AD の認知機能評価には、信頼性、および過去の研究における使用頻度から MMSE と ADAS が有用であると考えられた。

AD の精神行動障害の対象となった AD は 50 例であった。平均年齢は 73.0 \pm 8.7 歳、MMSE の合計点の平均は 17.2 \pm 5.6 点であった。NPI で評価した 12 の精神行動障害を有する患者の率は、多い順に、無為 (44%)、興奮 (42%)、不安 (32%)、妄想 (30%)、うつ (30%)、異常行動 (19%)、易刺激性 (17%)、食行動異常 (12%)、睡眠障害 (9%)、脱抑制 (8%)、幻覚 (4%)、多幸 (0%) であった。

MCI の精神行動障害の対象となった MCI は 16 例であった。平均年齢は 74.1 \pm 9.5 歳、MMSE の合計点の平均は 25.9 \pm 1.6 点であった。NPI で評価した 12 の精神行動障害を有する患者の率は、多い順に、無為 (63%)、興奮 (38%)、不安 (25%)、うつ (19%)、妄想 (13%)、睡眠障害 (6%)、易刺激性 (6%)、異常行動 (0%)、食行動異常 (0%)、脱抑制 (0%)、幻覚 (0%)、多幸 (0%) であった。

D. 考察

「アミロイドカスケード仮説」を基盤とした AD の治療法開発は、現在のところ足踏み状態と

いわざるを得ない。従って、アミロイド仮説に替わる仮説に則った治療法開発が模索され始めている。AD などに見られる tauopathy という神経病理から、タウの蓄積に対する治療法開発は、きわめて重要である。そこで本研究は、タウの蓄積過程を明らかにし、タウの凝集阻止及び分解促進という観点から治療法開発に取り組んだ。

ER ストレスが神経変性に関与しているとする知見は多く報告されているが、タウ蓄積との関連についてはきわめて報告が少ない。今回の検討で ER ストレスがタウ蛋白を蓄積することが明らかになった。このタウ蓄積について、機序を検討したところ、タウのユビキチンライゲースである CHIP が ER ストレス下で減少しており、プロテアソームにおけるタウの分解が遅延することにより、タウが蓄積することが示唆された。従って、ER ストレスを防止することが、タウ蓄積を抑止できる可能性が示された。

今回、あらかじめ線維化したタウを細胞に導入すると、それを核にしてタウが凝集していくことが明らかになり、タウが伝播することで病変が広がっていく可能性が示された。この減少は、今後の tauopathy を抑止する治療法開発には重要な示唆を与えてくれるものである。

今回、顆粒状タウ凝集体を阻害する物質を検索した結果、既存薬である X1 が見付き、tauopathy モデルである P301L タウ発現マウスに投与して、効果が認められたことはきわめて重要な成果である。なぜならば、既存薬であり、毒性等の懸念は低く、早期に臨床応用が可能であるからである。また、ポリフェノールやフェノチアジンの中にもタウ凝集を阻害するものが見つかっており、これらの物質も比較的身近なものであり、早期の臨床応用も可能かもしれない。タウワクチンに関しては、まだまだ多くの検討

事項を残しているが、将来的には tauopathy の治療法開発としての一方向性であるといえよう。

分子シャペロンは不正蛋白に作用して構造を改善することで働くが、今回、シャペロン BiP を誘導する薬剤 BIX の開発に成功した。この薬剤は、脳梗塞巣周囲のペネンブラ拡大を抑制したり、遅発性神経細胞死を抑制する効果が示され、神経変性過程そのものを抑制する効果が期待される。

AD の病理学的変化は老人斑と神経原線維変化であるが、精神症状の発現には神経原線維変化との関係があることが指摘されている。Farberらは109名のAD患者のフォローアップと死後の剖検の検討の結果、精神症状を呈した患者の新皮質の神経原線維変化量は、精神症状がなかった患者の2.3倍であったと報告している。(Farber, N.B., et al., Arch Gen Psychiatry, 57: 1165-1173, 2000)。一方、Tekinらは31名のAD患者の生前NPIと剖検脳の実験の結果、興奮や異常行動といった症状が眼窩前頭皮質の神経原線維変化量と相関し、無為と前帯状回の神経原線維量と相関することを報告している。(Tekin, S., et al., Ann Neurol, 49: 355-361, 2001) このように、ADのタウオパチーである神経原線維変化と精神行動異常の相関が示唆されており、この点を踏まえた臨床評価が必要である。

E. 結論

タウ蓄積/tauopathy に対する薬物の候補として、既存薬 X1、ポリフェノール、フェノチアジン、タウワクチン、シャペロン誘導剤 BIX が上げられた。さらにタウの伝播阻止あるいは、ER ストレスに効く薬物の可能性を検討した。

これらの薬剤の臨床評価には、精神行動評価が重要である事が示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. J Biol Chem. 285: 34885-98, 2010.
2. Mutsuga M, Chambers JK, Uchida K, Tei M, Makibuchi T, Mizorogi T, Takashima A, Nakayama H. Binding of curcumin to senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in the aged brain of various animals and to neurofibrillary tangles in Alzheimer's brain. J Vet Med Sci. 2012 Jan;74(1):51
3. Oida Y, Hamanaka J, Hyakkoku K, Shimazawa M, Kudo T, Imaizumi K, Yasuda T, Hara H. Post-treatment of a BiP inducer prevents cell death after middle cerebral artery occlusion in mice. Neurosci Lett 2010; 484: 43-46.

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

重合核依存性タウ凝集モデルの構築とタウ蓄積の制御

研究分担者：長谷川成人¹⁾

研究協力者：鈴掛雅美¹⁾，野中隆¹⁾

¹⁾ 東京都医学総合研究所 病態細胞生物研究室

研究要旨

アルツハイマー病はその症状、病態が時間経過に伴って悪化する「進行性」の変性疾患であり、その病態とタウの異常病変の広がり強く相関することが示されている。研究分担者の長谷川は、異常タウが正常タウの構造を異常に変換しながら細胞から細胞へ伝播することにより、病変が拡大することによって病気が進行する蛋白癌仮説を提唱した。また線維化したタウを細胞内に導入することによってタウの蓄積がおこる細胞モデルを構築した。さらに P301L 変異タウ Tg マウスに、タウ線維化阻害剤、リン酸化ペプチドワクチンを投与することにより、タウ蓄積が減少することが示唆された。

キーワード：タウ，化合物，ワクチン，リン酸化，伝播

A.研究目的

アルツハイマー病(AD)において、変性する部位の細胞内にタウの蓄積病変が観察され、その蓄積タウの脳内分布と臨床症状が密接に相関することが示されている。Braak の病理ステージの報告にあるように、タウ病変は海馬傍回から始まり、徐々に辺縁系、大脳皮質に広がって認知症を発症するが、このタウ病変の広がり機序については長い間議論すらされてこなかった。研究分担者の長谷川は、異常タウが正常タウの構造を異常に変換しながら細胞から細胞へ伝播すると考えればこの病変の広がりが容易に説明できると考え、「蛋白癌」仮説を提唱した。そして遺伝子導入試薬を用いて線維化したタウを細胞内に導入する新規タウ蓄積モデルの構築を行ってこの仮説を支持する証拠を得た。また、タウの蓄積を抑える目的で、P301L 変異タウ Tg マウスに線維化阻害効果のある化合物を経口投与し、その効果を解析した。さらに 2 種類のタウのリン酸化ペプチドをワクチンとして投与し、その効果についても検討した。

B.研究方法

1. 細胞モデルの構築

大腸菌に発現し、精製した 3 リピート(3R)タウ、4 リピート(4R)タウをヘパリン存在下でインキュベートすることにより線維化タウを作製した。超音波処理後、遺伝子導入と同じようにリポフェクタミンを用いて培養細胞内に導入した。対照としては線維化しない可溶性タウを用いた。また細胞はあらかじめヒト 3R タウ、あるいは 4R タウを発現させた SH-SY5Y 細胞、あるいは何も強制発現しない細胞を用いた。培養 3 日後に細胞を固定し、リン酸化タウを特異的に認識する抗体などを用いて、蛍光抗体法によるタウの免疫染色を行い、局在、凝集を観察すると共に、界面活性剤を用いた段階的抽出した試料をイムノプロット法により生化学解析した。

2. タウの線維化阻害剤、ワクチンの効果

P301L 変異タウを発現する Tg マウス(hemi 接合体、雌、12 週齢)に、ポリフェノール化合物の exifone、

gossypetin, フェノチアジン化合物の lacmoid, ポルフィリン化合物の hematin を、それぞれ、粉餌に 0.05 あるいは 1% の濃度で混合し、32 週齢まで経口投与した。その後、マウスの脳、脊髄に蓄積するリン酸化タウを免疫組織化学、及びウエスタンブロットにて解析した。

ワクチンの検討は、2 種類のリン酸化タウペプチド(RENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSQDTSRHL: pS396/404), STGSIDMVDSPLATLADE: pS422)を、16 週齢から 34 週齢まで、2 週-4 週おきに合計 6 回、免疫した。5 ヶ月齢の時点で採血し、免疫した抗原に対する抗体価の上昇を ELISA 法で測定すると共に、脳脊髄を採取し、免疫組織学的にタウの蓄積を観察した。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は当研究所の専門委員会に遺伝子組換え生物等の使用等に関する申請を提出して承認をうけ、実験指針に従って行った。また、動物実験に関しても研究所の動物実験倫理委員会の審査、承認を受けて行った。

C. 研究結果

1. 培養細胞内へのタウ線維の導入

ヒト 3R タウ、あるいは 4R タウを発現した SH-SY5Y 細胞に、予め試験管内で線維化した 3R タウ、あるいは 4R タウを遺伝子導入試薬を用いて導入した。4R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入するとリン酸化タウ陽性の凝集体形成が観察された。細胞の外から導入したタウ線維と細胞内に発現したタウを区別するため、GFP タグを付加したタウを細胞内に発現する実験も行ったが、外から導入したものを核として細胞内に発現するタウが凝集することが確認された。興味深いことに、4R タウを発現する細胞に 3R タウの線維を導入しても 4R タウの凝集が起こらず、3R タウを発現する細胞に導入した場合には凝集が観察された。逆に 3R タウを発現する細胞に 4R タウ線維を導入しても凝集がおこらず、3R タウ

同種のタンパク質の線維が導入された場合に限って凝集が進むことが判明した。

2. 線維化阻害剤の効果

タウの線維化阻害剤を経口投与したマウスの脳脊髄に蓄積するタウの異常病変の広がりを免疫組織化学的に検討した。異常リン酸化タウの検出には、AT8 (pS202/pT205)、pS396 抗体を用いた。その結果、薬剤を投与しない対照マウスと比較して、1% exifone 投与マウスにおいて顕著なリン酸化タウ陽性構造物の減少が観察された。マウス脳脊髄に蓄積するタウを定量的に解析するため、薬剤投与終了後、マウスから脊髄を取り出し、サルコシル不溶性画分を調製し、ウエスタンブロット解析した。その結果、個体間のばらつきはあるものの、1% exifone 投与群で約 50%、0.1% lacmoid で約 75% のリン酸化タウ蓄積量の減少を認めた。一方、1% lacmoid, 1% hematin, 1% gossypetin も投与群では対照群とほぼ同程度の量のタウ蓄積が観察された。

3. ワクチンによるタウ蓄積の制御

S396/S404 がリン酸化されたタウペプチド (pS396/pS404)、S422 がリン酸化されたタウペプチド (pS422) を免疫し、抗体価の上昇、タウ蓄積への効果を解析した。その結果、いずれの抗原を投与したマウスにおいても、免疫したペプチドに対する抗体価の上昇が観察された。タウ蓄積への効果については、pS396/pS404 のリン酸化ペプチドを免疫したマウスにおいては不溶性タウの減少は観察されなかったが、pS422 を免疫した群では不溶性タウの減少傾向が観察された。N 数が少ないが、リン酸化 S422 のペプチドワクチンによってタウ蓄積が減少する可能性が示唆された。

D. 考察

培養細胞への重合核導入実験の結果から、線維化したタウなどのアミロイド様分子は条件

が整えば比較的簡単に細胞内に取り込まれ、それがシードとして作用し、プリオンのように正常分子を異常分子に変換して線維化することが明らかとなった。Braakらにより、タウ病変が病気の進行に伴って広がること、さらにその広がり病気の症状と強く相関することが示されているが、このタウ病変の広がりが、異常タウのプリオン様性質で説明できる可能性がある。

タウの蓄積を抑える目的で、タウの線維化抑制化合物を P301L タウ Tg マウスに経口投与した結果、exifone や lacmoid を投与したマウスにおいて、リン酸化タウの減少が観察された。ばらつきが比較的大きいことから、今後、個体数を増やして検討する必要があるが、in vitro で効果がみられた化合物が動物への経口投与においても効果を示す可能性が示唆された。lacmoid は、1% 投与群ではあまり効果が認められなかった理由は不明であるが、濃度が高すぎて餌と分離してしまい、食べなかった可能性が考えられる。

ワクチン療法については、これまでの報告のあった pS396/404 リン酸化ペプチドよりも、最 C 末端に位置するリン酸化部位である pS422 のリン酸化を含むペプチドの方がより効果が強い可能性が示唆された。こちらも一群の引数を増やして検討を行う必要があるが、ペプチドワクチンが細胞内のタウ蓄積にも有効である可能性が示唆された。

E. 結論

1. 線維化したタウ重合核を細胞外から導入する方法を見だし、タウを発現した細胞に導入することでタウの凝集体を形成する新規細胞モデルを構築した。
2. プリオンと同じように、線維化分子が同じ種類の正常分子と相互作用することで、正常分子を異常型に変換し、凝集が進むことが示された。

3. タウの線維化を抑制する低分子化合物をポリフェノール化合物の exifone, フェノチアジン化合物の lacmoid が、P301L タウ Tg マウスの脊髄におけるリン酸化タウの蓄積を減少させる可能性が示唆された。

4. リン酸化タウペプチドのワクチンは異常リン酸化タウの除去に有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nonaka T, Arai T, Buratti E, Baralle FE, Akiyama H, Hasegawa M. Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTL-D-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. FEBS Lett 583: 394-400, 2009.
- 2) Arai T Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, Iritani S, Onaya M, Akiyama H, Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies Acta Neuropathol. Online Jan 13, 2009.
- 3) Fujishiro H, Uchikado H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Yokota O, Tsuchiya K, Togo T, Iseki E, Hirayasu Y. Accumulation of phosphorylated TDP-43 in brains of patients with argyrophilic grain disease. Acta Neuropathol 117: 151-158, 2009.
- 4) Kametani F, Nonaka T, Suzuki T, Arai T, Dohmae N, Akiyama H, Hasegawa M. Identification of casein kinase-1 phosphorylation sites on TDP-43. Biochem Biophys Res Commun 382: 405-9, 2009.
- 5) Nonaka T, Hasegawa M. A Cellular Model To Monitor Proteasome Dysfunction by alpha-Synuclein. Biochemistry 48: 8014-22, 2009.
- 6) Yamashita M, Nonaka T, Arai T, Kametani F, Buchman VL, Ninkina N, Bachurin SO, Akiyama H, Goedert M, Hasegawa M. Methylene blue and

dimebon inhibit aggregation of TDP-43 in cellular models. *FEBS Lett* 583: 2419-24, 2009.

7) Nonaka T, Kametani F, Arai T, Akiyama H, Hasegawa M. Truncation and pathogenic mutations facilitate the formation of intracellular aggregates of TDP-43. *Hum Mol Genet* 18: 3353-3364, 2009.

8) Davidson Y, Amin H, Kelley T, Shi J, Tian J, Kumaran R, Lashley T, Lees AJ, Duplessis D, Neary D, Snowden J, Akiyama H, Arai T, Hasegawa M, Bandopadhyay R, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. TDP-43 in ubiquitinated inclusions in the inferior olives in frontotemporal lobar degeneration and in other neurodegenerative diseases: a degenerative process distinct from normal ageing. *Acta Neuropathol* 118: 359-69, 2009.

9) Yonetani M, Nonaka T, Masuda M, Inukai Y, Oikawa T, Hisanaga SI, Hasegawa M. Conversion of wild-type alpha -synuclein into mutant-type fibrils and its propagation in the presence of A30P mutant. *J Biol Chem* 284: 7940 -7950, 2009.

10) Masuda M, Hasegawa M#, Nonaka T, Oikawa T, Yonetani M, Yamaguchi Y, Kato K, Hisanaga S, Goedert M. (# corresponding author) Inhibition of alpha-synuclein fibril assembly by small molecules: Analysis using epitope-specific antibodies. *FEBS Lett* 583:787-791, 2009.

11) Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of alpha-synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem*. 285: 34885-98, 2010.

12) Asaoka T, Tsuchiya K, Fujishiro H, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Iseki E, Oda T, Onaya M, Tominaga I. Argyrophilic grain disease with delusions and hallucinations: a pathological study. *Psychogeriatrics* 10: 69-76, 2010.

13) Yokota O, Davidson Y, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ishizu H, Terada S, Sikkink S,

Pickering-Brown S, Mann DM. Effect of topographical distribution of alpha-synuclein pathology on TDP-43 accumulation in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 120: 789-801, 2010.

14) Yokota O, Davidson Y, Bigio EH, Ishizu H, Terada S, Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Sikkink S, Pickering-Brown S, Mann DM. Phosphorylated TDP-43 pathology and hippocampal sclerosis in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol* 120: 55-66, 2010.

15) Tamaoka A, Arai M, Itokawa M, Arai T, Hasegawa M, Tsuchiya K, Takuma H, Tsuji H, Ishii A, Watanabe M, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S, Akiyama H. TDP-43 M337V mutation in familial amyotrophic lateral sclerosis in Japan. *Intern Med* 49: 331-4, 2010.

16) Yamaguchi Y, Masuda M, Sasakawa H, Nonaka T, Hanashima S, Hisanaga SI, Kato K, Hasegawa M. Characterization of inhibitor-bound alpha-synuclein dimer: role of alpha-synuclein N-terminal region in dimerization and inhibitor binding. *J Mol Biol* 395: 445-56, 2010.

17) Arai T, Hasegawa M, Nonaka T, Kametani F, Yamashita M, Hosokawa M, Niizato K, Tsuchiya K, Kobayashi Z, Ikeda K, Yoshida M, Nonaka M, Fujishiro H, Akiyama H (2010) Phosphorylated and cleaved TDP-43 in ALS, FTLN and other neurodegenerative disorders and in cellular models of TDP-43 proteinopathy. *Neuropathol*. 30:170-181

18) Tsuji H, et al (2012) Epitope mapping of antibodies against TDP-43 and detection of protease-resistant fragments of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 116-121.

19) Foulds PG, et al (2011) Phosphorylated alpha-synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 25: 4127-37.

20) Foulds PG, et al (2012) Post mortem cerebrospinal fluid α -synuclein levels are raised in multiple system atrophy and distinguish this from the other α -synucleinopathies, Parkinson's disease and Dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 45:188-95.

21) Hasegawa M, et al (2011) Molecular Dissection of TDP-43 Proteinopathies. *J Mol Neurosci* 45:480-485

22) Nonaka T and *Hasegawa M (2011) In vitro recapitulation of aberrant protein inclusions in neurodegenerative diseases, New cellular models of neurodegenerative diseases. *Commun & Integ Biol* 4, 501-502.

23) Meyerowitz J, et al (2011) C-Jun N-terminal kinase controls TDP-43 accumulation in stress granules induced by oxidative stress. *Mol Neurodegener* 6:57.

2. 学会発表

1) Hasegawa M. Therapeutic approaches targeting tau protein for neurodegenerative diseases. International Seminar Aging, Tau Protein and Dementias at French Embassy, Tokyo [2010/10/20]

2) Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H. Molecular dissection of TDP-43 proteinopathies. The 7th International Conference on Frontotemporal Dementias, Indianapolis, USA[2010/10/06]

3) Masuda M, Taniguchi S, Suzuki N, Hasegawa M. Therapeutic approaches of targeting pathological tau protein for neurodegenerative diseases. Neuro2010 Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/03]

4) Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Ikeda K, Akiyama H. Proteomic analyses of TDP-43 proteinopathy. Neuro2010

Joint Conference, The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Kobe, Japan [2010/09/04]

5) Hasegawa M: Molecular pathology of TDP-43 proteinopathies. 3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, 2011. 8. 2, Melbourne.

6) Hasegawa M, Nonaka T, Tsuji H, Yamashita M, Kametani F, Tamaoka A, Arai T, Akiyama H: TDP-43 in Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. International Symposium on Motor Neuron Disease and Perry Syndrome. 2011. 2. 22, Tokyo.

7) Yamashita M, Nonaka T, Akiyama H, Hasegawa M. C-terminal TDP-43 inclusion suppress proliferation mediated by transcriptional dysregulation. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11), 2011.07. Paris, France.

8) Suzukake M, Watanabe S, Suzuki N, Hisanaga S, Hasegawa M. Evaluation of the tau aggregation inhibitors and immunization with phosphorylated tau peptides in tauopathy model mice. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

9) Nonaka T, Watanabe S, Iwatsubo T, Hasegawa M. Cellular models of seeded aggregation of alpha-synuclein and tau. Alzheimer's Association International Conference (AAIC11) 2011.07, Paris, France.

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

1.特許取得 なし

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

顆粒状タウ凝集体を標的とする治療法に関する研究

研究分担者氏名 高島 明彦¹⁾

1) 所属（国立長寿医療研究センター、分子基盤研究部）

研究要旨

タウ凝集体である神経原線維変化形成の過程ではリン酸化タウ、タウオリゴマー、顆粒状タウ凝集体、タウ線維が形成され、リン酸化タウ、タウオリゴマーの形成はシナプス消失、顆粒状タウ凝集体形成は神経脱落に関与することが明らかになった。これらタウ凝集阻害を示す化合物を理研化合物バンク 6600 から化合物アレイを用いてタウと結合する化合物を最初にスクリーニングし陽性反応を示す約100化合物を得た。これらの化合物 P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した所、100nM 以下で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察される化合物 X1 が得られた。X1 を P301L tau を発現するマウスモデルに投与するとタウ凝集、それに伴う神経脱落、学習行動中の神経機能低下と行動異常の阻止が観察された。X1 は既存薬であるため安全性は担保されており、早期の臨床試験開始が期待される。

キーワード：タウ、顆粒状凝集体、認知症治療、化合物

A. 研究目的

世界で認知症患者数は現在約3560万人と推定され介護費用に年間6億400万ドルが費やされている。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。本研究では認知機能低下と相関する神経原線維変化の構成要素であるタウ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を行う。これまでの研究からタウは老化因子、またはβ

アミロイドによって過剰リン酸化され、これらが細胞質で互いに会合し可溶性タウオリゴマーを形成する。オリゴマーが40分子のタウで形成されβシート構造を持つようになる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。これらタウ凝集体と神経変性の関係はタウトランスジェニックマウスの解析から明らかにされ、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が示されている。この課題ではこれらタウ凝集を標的としたタウ凝集阻害剤の検索を目的とする。

B. 研究方法

化合物マイクロアレイとリコンビナントヒトタウ溶液をインキュベートし洗浄後、抗タウ抗体によってマイクロアレイに結合しているタウを可視化しタウと結合活性を持つ化合物を得る。得られた化合物は試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン

存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光で測定する。更にどの段階での凝集阻害であるかを原子間力顕微鏡を用いて決定する。化合物は P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を細胞レベルで検討する。その中から IC50 が 100nM 以下で阻害効果を示す化合物を選択する。

C. 研究結果

理研化合物バンク 6600 から化合物マイクロアレイを作製し、それらをリコンビナントヒトタウ溶液とインキュベート後、抗タウ抗体によって陽性の化合物を得た。その中から再現性が良く、SPR によって親和性の高い化合物約 100 種類が得られた。これらの化合物から試験管内タウ凝集系を用いて神経毒性を示すタウ凝集阻害を示す 3 化合物が選択された。その内 2 化合物は共通の骨格を有しており、この骨格を持つ既存薬でタウ凝集阻害効果を検討したところ全てでタウ凝集阻害が確認された。この骨格を持ち細胞膜透過性を有する X1 を第一の候補とし P301L 変異タウを安定に発現する N2a 細胞株に投与し SDS 不溶性タウの形成阻害効果を検討した。X1 は 100nM 以下で SDS 不溶性タウ形成阻害が観察されることが示された。そこで、P301L 変異タウを発現するモデルマウス 19ヶ月令を用いて3ヶ月間経口で X1 を投与した。非投与群と較べ投与群では脳各部位でのサルコシル不溶性タウ量は有為に 25%-50%低下を示した。神経細胞数を脳各部位で計測したところ P301L では non-Tg 群と比べて 15-25%の有為な神経細胞脱落が観察されるが、X1 投与群では non-Tg マウスと同程度の細胞数を示し、タウ凝集による神経細胞脱落を阻止していることが示された。Mn-enhanced MRI 法はマウスなど小動物の行動課題中の神経活動をモニターする方法である。P301L マウスと non-Tg を比較すると場所記憶時に prelimbic で P301L マウスの神経活動の低下が観察される。X1 投与群ではこの活動低下は抑制され、non-Tg と同様の神経

活動を示すようになる。P301L マウスの神経活動低下と X1 によるその抑制を確認するためオープンフィールドを利用した行動実験を行った。全体の行動量で変化は見られなかったが P301L マウスは最初の 1 分間で有為な行動低下を示す。これは P301L マウスでは prelimbic の関与する恐怖抑制機能が低下していることを示す。X1 投与群では最初の 1 分間での行動は non-Tg と同程度であり、恐怖抑制機能が正常に作用することを示した。

D. 考察

100 種類のタウ結合化合物はさらに試験管内でリコンビナントヒトタウとヘパリン存在化でインキュベートし、凝集阻害活性をチオフラビン蛍光でタウ凝集阻害活性を調べ、さらに原子間力顕微鏡を用いてその中から顆粒状凝集体形成阻害化合物をスクリーニングした。さらに細胞レベルで 100nM 以下で凝集阻害効果を示す化合物が得られた。この化合物は細胞レベルで効果を示すため膜透過性を有する化合物であることが示唆される。マウスに経口投与を行った検討においてもタウ凝集を阻害したことから脳血液関門を投下する化合物であると考えられる。化合物 X1 の動物実験ではタウ凝集抑制と共に神経脱落、神経機能低下、行動異常の抑制が観察された。このことから、アルツハイマー病などで観察される神経脱落、認知症がタウ凝集を起因として生じ、これを阻害することによって治療が可能であることが考えられた。

E. 結論

タウ凝集阻害剤 X1 は既存薬であり、モデル動物を用いた実験でタウ凝集抑制と共に神経脱落、神経機能低下、行動異常の抑制を示した。このことから X1 がアルツハイマー病を含むタウオパチーの有効な治療薬となる可能性が示された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

Kimura T, Fukuda T, Sahara N, Yamashita S,

- Murayama M, Mizoroki T, Yoshiike Y, Lee B, Sotiropoulos I, Maeda S, Takashima A. Aggregation of detergent-insoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss. *J Biol Chem*. 2010 Oct 4. [Epub ahead of print]
- Peethumnongsin E, Yang L, Kallhoff-Muñoz V, Hu L, Takashima A, Pautler RG, Zheng H. Convergence of presenilin- and tau-mediated pathways on axonal trafficking and neuronal function. *J Neurosci*. 30(40):13409-18. 2010
- Miyasaka T, Sato S, Tatebayashi Y, Takashima A. Microtubule destruction induces tau liberation and its subsequent phosphorylation. *FEBS Lett*.584(14):3227-32. 2010
- Naito AT, Okada S, Minamino T, Iwanaga K, Liu ML, Sumida T, Nomura S, Sahara N, Mizoroki T, Takashima A, et al. Promotion of CHIP-mediated p53 degradation protects the heart from ischemic injury. *Circ Res*.106(11):1692-702. 2010
- 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.
- Ferree A, Guillily M, Li H, Smith K, Takashima A, Squillace R, Weigele M, Collins JJ, Wolozin B. Regulation of Physiologic Actions of LRRK2: Focus on Autophagy. *Neurodegener Dis*. 2012;10(1-4):238-41.
- 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*. 2012 Feb;11(1):51-62.
- Mutsuga M, Chambers JK, Uchida K, Tei M, Makibuchi T, Mizorogi T, Takashima A, Nakayama H. Binding of curcumin to senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in the aged brain of various animals and to neurofibrillary tangles in Alzheimer's brain. *J Vet Med Sci*. 2012 Jan;74(1):51-7.
- Takasaki J, Ono K, Yoshiike Y, Hirohata M, Ikeda T, Morinaga A, Takashima A, Yamada M. Vitamin A has anti-oligomerization effects on amyloid- β in vitro. *J Alzheimers Dis*. 2011;27(2):271-80.
- 6: Sotiropoulos I, Catania C, Pinto LG, Silva R, Pollerberg GE, Takashima A, Sousa N, Almeida OF. Stress acts cumulatively to precipitate Alzheimer's disease-like tau pathology and cognitive deficits. *J Neurosci*. 2011 May 25;31(21):7840-7.
- 7: Kambe T, Motoi Y, Inoue R, Kojima N, Tada N, Kimura T, Sahara N, Yamashita S, Mizoroki T, Takashima A, Shimada K, Ishiguro K, Mizuma H, Onoe H, Mizuno Y, Hattori N. Differential regional distribution of phosphorylated tau and synapse loss in the

nucleus accumbens in tauopathy model mice. *Neurobiol Dis.* 2011 Jun;42(3):404-14.

3. 著書、Chapters

Akihiko Takashima

Tauopathy and Brain Aging, (Cytoskeleton of the Nervous System. R.A. Nixon and A. Yuan eds) *Advances in Neurobiology* vol 3, Chapter5, 133-150, Springer, 2011

Akihiko Takashima

Animal Models of Amyloid/PS1 Pathology (Animal Models for Neurodegenerative Disease, J. Avila, J.J. Lucas, and F. Hernandez eds) *RSC Drug Discovery* Chapter 2, 15-38 RSC Publishing, 2011

Yuji Yoshiike and Akihiko Takashima

Presenilin-Based Transgenic models of Alzheimer's disease (Animal models of Dementia (P.P. De Deyn and D Van Dam eds) *Neuro methods* 48, Part4, Chapter 21, 415-438 Springer Protocols, 2011

高島明彦： β アミロイドとタウ、どちらがアルツハイマー病治療薬の標的としてふさわしいのだろうか？

御子柴克彦編、*実験医学増刊、in vivo 実験医学によるひと疾患解明の最前線*、p211-217、2012

高島明彦：アルツハイマー病、山村研一、若菜茂晴編、*中山書店、疾患モデルマウス表現型解析指南*、p58-64、2011

高島明彦：タウオパチーモデルマウス、三品

昌美編、*脳、神経疾患-疾患モデルの作成と利用* LICp138-144,2011

学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

高島明彦

第39回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「アルツハイマー病治療薬-対症療法から根本治療へ」2011年10月19日、東京

国際学会発表

1 Takashima A

Role of tau and GSK-3 β in synaptic plasticity connecting to tauopathy. Tau workshop in UCSF. San Francisco, March27-30, 2011.

2 Takashima A

Physiological role of tau in synaptic plasticity, synaptic function affect on NFT formation, Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, New York, June 16, 2011

3 Takashima A

Role of tau aggregation in neurodegenerative disease. New York state university Albany symposium, Dialogue. June 15, 2011

4 Takashima A

The relations of Tau and β amyloid, Alzheimer's Association International Conference 2011, Paris France, July16-21, 2011

5 Takashima A

Relationship between tau aggregation and synapse loss, and neuronal loss

3rd World Congress of Asian Psychiatry 2011, Melbourne, Australia, July31-August4, 2011

T6 Takashima A

Pathological and physiological function

of tau; how tau is involved in neurodegeneration.

International Symposium of neurodegenerative disease
Nantong, P.R.China, 9october

7 Takashima A

Pathological and physiological function of tau; how tau is involved in neurodegeneration. Wuhan medical school, P.R. China, October 13, 2011

8 Takashima A

General overview on Tau, Advances in Neuroscience for Medical Innovation, Saint-Jean Cap Ferrat, France, November17-19, 2011

9 Takashima A

Tau and GSK-3b are required for maintaining brain function at old age. AACL (Asian Asing Core for Longevity), Nagasaki, Nov.21-22, 2011

10 Takashima A

The biology and pathology of Tau and its role in tauopathies II

8-9 January 2012

Robinson College Cambridge, UK

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

発明者 : 高島明彦、添田義行、長田裕之

発明の名称 : タウ凝集阻害剤

出願年月日 : 国内出願 平成23年10月3日

国際出願 平成16年12月1日

出願番号 : 特願 2011-219059 (国内)

出願人 : 財団法人ヒューマンサイエンス振興財

2.実用新案登録

3.その他

厚生労働科学研究費補助金（認知症対策総合研究事業）

分担研究報告

神経変性に対するシャペロン誘導剤の効果に関する研究

分担研究者 工藤 喬 大阪大学大学院医学系研究科

研究要旨: ADなどの神経変性過程に小胞体(ER)ストレスが関与している事が明らかになってきた。ERストレスに対する反応の1つにシャペロン誘導があるが、今回、シャペロンBiPを誘導する薬物BIXの開発に成功した。BIXはBiPなどERシャペロンのみを誘導して、神経細胞をERストレスによるアポトーシスからレスキューすることを示した。BIXは、脳梗塞マウスモデルに梗塞後投与でも梗塞周囲のペネンブラ領域で効果を発揮し、スナネズミ脳梗塞モデルの遅発性神経細胞死にも効果を持つことが示された。これらのことから、BIXはADを初めとする神経変性の治療薬となることが示された。

キーワード: ERストレス、シャペロン、脳虚血、ペネンブラ、遅発性神経細胞死

A. 研究目的

小胞体(ER)ストレスはアルツハイマー病(AD)をはじめとする神経変性疾患の病理過程に関与するとされている。従ってERストレスからの離脱を図る方法はADの治療法につながる可能性があり、AD脳におけるタウ凝集を防ぐ可能性がある。

ERストレスに対し細胞には、①蛋白の翻訳を抑制してさらなる折りたたみ不整蛋白の蓄積を防ぐこと、②分子シャペロンを誘導して折りたたみ不整蛋白の折りたたみを是正すること、③不整蛋白をユビキチン化しプロテアソームで分解することで、恒常性を保つ。これらの生存経路が破綻を来すことで、アポトーシスが起き、ERストレスによる細胞死が発生する。もし、人為的にこれらの生存経路を活性化してやれば、ERストレスによる細胞死を抑制する方策が得られるかもしれない。そこで、我々は分子シャペロン誘導剤BIXを開発し、薬物療法の検討を開始している。

B. 研究方法

BiPのプロモーター領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系によりコンパウンドライブラリーを検索した結果、BIX(BiP inducer X)を開発した。BIXを神経細胞に添加し、ウエスタン法やリアルタイムPCRなどを用いて、BiP誘導以外のERストレス反応BIXが起こさないことを確認した。

BIXを神経芽細胞腫SK-N-SHに添加し、tunicamycinなどによるERストレスによる神経細胞死をLDHアッセイやcaspaseのアッセイを行った。

ddYマウスの麻酔し、左総頸動脈から栓子を挿入して中大脳動脈の起始部を閉塞して脳虚血モデルを作成した。BIXは虚血30分前、5分後、3時間後、6時間後に脳室内投与した。虚血24時間後に神経学的症状を検討した後、断頭し脳切片を作成した。梗塞巣はTTC染色により検討した。

スナネズミは、麻酔後総頸動脈を動脈瘤クリップで10分間閉塞し、再灌流7日後に脳切片を作成した。BIXは虚血前に脳室内に