

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32606  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2016～2019  
課題番号：16K07050  
研究課題名(和文) In vivoスクリーニングシステムを用いたタウ蓄積阻害剤探索

研究課題名(英文) In search of tau accumulation inhibitors in vivo

## 研究代表者

吉池 裕二 (Yoshiike, Yuji)

学習院大学・理学部・研究員

研究者番号：90415331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の特徴的病理像である神経原線維変化の主成分タンパク質の凝集度合いは認知機能低下の度合いと相関する。タウタンパク質の凝集を阻害するような物質を探索するための In vivoプラットフォームをショウジョウバエを用いて構築した。ヒトのタウタンパク質を発現させたショウジョウバエは加齢に伴いタウの凝集が増加することを示す生化学的また形態学的な証拠を得た。このモデルを用いた探索によりタウ凝集阻害効果のある物質が見つかり、そのスクリーニングシステムの汎用性と新規性にもとづき特許を取得した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー博士の発見した神経原線維変化を構成するタウの凝集体形成はアルツハイマー病を引き起こす原因であると考えられているが、そのことを証明するためにはタウの凝集を阻害する物質がアルツハイマー病の認知機能低下を抑制することを示さなければならない。本研究で構築したタウ凝集の in vivoモデルとそれを用いた凝集阻害物質の同定はタウの凝集がアルツハイマー病の原因である証拠を示すための研究だけでなくアルツハイマー病の根本治療薬の開発に向けた第一歩である。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of tau protein, which constitutes the main component of neurofibrillary tangles seen as the pathological hallmark of Alzheimer's disease, well correlates with the degree of cognitive decline. In this research, I have built in vivo screening platform by using drosophila for the aim of search of such compounds that suppress tau aggregation. Evidence showing accumulation of tau aggregates by age in this fly model expressing human tau was obtained both biochemically and morphologically. Based on the exploration by using this model, a compound with its property to inhibit tau aggregation was identified. And the patent for this discovery along with its versatility was granted.

研究分野：アルツハイマー病

キーワード：タウオパチー アミロイド 神経原線維変化

## 1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病の脳にみられる神経原線維変化は凝集したタウタンパク質からなる。その蓄積度合いと認知機能の低下の程度はよく相関することから、凝集したタウが原因となって認知機能を低下させていることが想像される。しかしその因果関係はタウの凝集を阻害することで認知機能の低下を阻止できることを示すことでしか証明されない。すなわちそれは治験による検証ということになるが、タウの凝集阻害効果を示すメチレンブルーの治験は第 III 相試験で頓挫した。その原因は必ずしも全て明らかではないが、少なくとも早期の臨床試験フェーズから期待されたようなタウの凝集と認知機能低下の因果関係を示す証拠は未だ得られていないことになる。メチレンブルーのタウ凝集阻害効果は *in vitro* で見つかった。In vivo モデルでの効果検証のためにマウスモデルが使用されてきたものの、必ずしも全てのマウスモデルが前臨床試験に耐えうる性質を備えている訳ではない。またマウスモデルを用いてタウ凝集阻害剤をスクリーニングすることはその寿命や繁殖能力などを考慮しても現実的ではない。そこでライフスパンも短く、コストも安価で、また遺伝子操作も比較的容易なショウジョウバエを哺乳動物を用いた前臨床試験の前段階で用いることでその後の開発の成功率を上げることが可能となるのではないかと考えた。ヒトのタウを発現させたショウジョウバエは行動に異常が見られることからその表現型を指標として薬剤の効果を検証するシステムを構築した。このシステムは *in vitro* モデルよりも生体内での薬効評価に適していると思えたが、*in vitro* モデルほど多くの薬剤を試すことは出来ない。タウ凝集阻害剤の探索を実施するにあたり、リソースの問題から標的候補の何らかの絞り込みの必要性の気づきに至った。また生体内での薬効評価という意味においてもアルツハイマー病の病態をどの程度モデル化できているかを確認する必要があった。そこでまずはモデルとしての妥当性を検証する中で標的候補の絞り込みの方法についても模索することとした。

## 2. 研究の目的

本研究をはじめの前までにヒトのタウを発現したショウジョウバエを作製し、それをもとにタウの凝集抑制や行動異常を改善するような物質としてメチレンブルーを用いた解析をしていた。しかしこのシステムを用いてタウの凝集阻害を抑制する物質を探索するためにはこのシステム自体がヒトのアルツハイマー病の病態をどれだけ模写しているかを検証する必要があった。このヒトタウ発現遺伝子改変ショウジョウバエがアルツハイマー病患者の病態を模写する要素といってもアルツハイマー病の病態そのものがさほど分かっていないため何を検証すればよいかすら当初は明確ではなかった。まずはじめに加齢に伴う不溶性タウの量の変化を解析した。次にアルツハイマー病の脳からタウタンパク質を抽出し生化学的に解析した際に見られる電気泳動分析におけるスメア状の反応性に着目した。研究開始当時はヒトタウ発現ショウジョウバエのサルコシル不溶性画分にタウが検出されることだけが分かっていたがこのスメア状の反応は見られていなかった。そこでこのスメア状の反応性が見られるような条件を検索した。またサルコシル不溶性の画分にタウが検出されるということは少なからず凝集したタウが存在することを意味する。とすればアルツハイマー病患者の脳から抽出されるサルコシル不溶性画分に見られる線維状のタウの凝集物がこのヒトタウ発現ショウジョウバエでも見られないか形態学的に解析することにした。ヒトタウ発現ショウジョウバエがこのようなアルツハイマー病の病態を模写することを確認してこの *in vivo* システムをタウ凝集阻害剤の探索モデルとして確立することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 超遠心分画とウェスタンブロット法によるタウの生化学解析

ヒトタウを複眼に発現したショウジョウバエの頭部だけを回収しすりつぶした後に超遠心分画して電気泳動にかけるとウェスタンブロットにてタウを検出できる。この分画にサルコシルという生体物質を可溶化しやすい界面活性剤を用いることで、不溶性の画分に残る分子をサルコシル不溶性画分として分画することが出来る。ヒトタウ発現ショウジョウバエからはサルコシル不溶性画分にタウのバンドが検出されており、それをサルコシル不溶性タウと呼んだ。このようなサルコシル不溶性画分をアルツハイマー病脳から抽出するとスメア状の反応性が認められる。バンドとスメアの違いは明白であり、ヒトタウ発現ショウジョウバエをモデルと呼ぶためにはこの違いについて検証する必要があった。様々な分画条件を検索することで、スメア状の反応性を示す画分を同定した。

### (2) 原子間力顕微鏡による免疫沈降試料内の線維状タウ凝集物の探索

ヒトの脳から抽出されるタウは paired helical filament (PHF) と呼ばれる線維状の形態をとる。この線維状の形態は *in vitro* で重合して出来たタウ凝集体でも同様に認められるがヒトタウ発現ショウジョウバエからはこれまで検出されていない。そこでこのヒトタウ発現ショウジ

ヨウバエから抽出した画分に線維状の形態がないかを原子間力顕微鏡を用いて探すことにした。ただ分画をただけではタウ以外の多くの分子が混入し、線維状の形態があったとしてもそれがタウであるかを判断することは難しい。そこで抗タウ抗体を用いた免疫沈降法でタウだけを抽出した画分内に線維化したタウがあるかどうか探索した。サルコシルは多くのタンパク質を変性させてしまうがヒト脳から抽出したタウの線維状凝集物は変性しきれないためにヒトの脳から抽出したサルコシル不溶性画分に観察された特徴的な PHF 形態はタウであると判明した。しかしショウジョウバエのサルコシル不溶性タウはバンドとして検出されることから、少なくともウェスタンブロット上ではモノマー化しているタウが多いことが想定された。また免疫沈降法で用いる抗体ももしサルコシル不溶性画分に投入すれば変性してしまい抗体の特異的反応性が維持できなくなってタウだけを抽出することが困難となる。そこではじめの研究でみつかったスメア状のタウを検出した分画条件を利用した。サルコシル不溶性画分とは異なるスメア状のタウ反応性を確認した画分に抗タウ抗体を用いて免疫沈降した試料を原子間力顕微鏡で観察して PHF 様の形態物を探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) サルコシル不溶性タウの加齢に伴う増加

以前我々がヒトタウ発現ショウジョウバエの頭部からサルコシル不溶性タウを検出したことはまずこの八エのアルツハイマー病モデルとしての第一歩であった。しかしそれだけではモデルとして持つ性質が充分であるとは言い難い。アルツハイマー病は加齢に伴って発症し進行する。またその病状の進行に伴って神経原線維変化の形成も増えることが分かっている。であればこのヒトタウ発現ショウジョウバエにおいても加齢に伴いその不溶性タウが増えるかどうかでヒトの病態を模写できているかを検証できる。若齢群と老齢群でグループ分けしたヒトタウ発現ショウジョウバエのサルコシル不溶性画分のタウの反応性を比較した。その結果、老齢群のショウジョウバエから抽出したサルコシル不溶性タウの量が若齢群に比べて増加していることがわかった。このことからヒトタウ発現ショウジョウバエにおいて加齢に伴いタウの凝集は増加することが示唆された。

##### (2) スメア状タウの検出

アルツハイマー病の脳の抽出物からタウを検出するためには激しい可溶化処理が必要であった。様々な翻訳後修飾を受けていただけでなくいわゆるアミロイド線維状にシート化したタウの凝集物の不溶性は後に *in vitro* で再構成されたタウ線維でも示されている。そしてそれらの凝集・不溶化したタウは電気泳動の結果、バンドではなくスメア状に検出される。このような不溶性の獲得までには多くの時間とタウタンパク質の量が必要であることが想定される。ヒトタウ発現ショウジョウバエから抗体反応性を得るためには20匹の八エの頭部を集めてすりつぶす必要がある一方、ヒトの脳の解析には脳一つであっても全体をすりつぶすことは通常行われぬ。従って超遠心分画と抗体による検出という共通の分析プロセスとはいえそこにはボリューム的なあるいはサイズの違いがある。またアルツハイマー病が数十年を経て発症する一方、ヒトタウ発現ショウジョウバエの寿命は数ヶ月であることはその発症プロセスがたとえ同様であったとしても時間的な違いもある。それらの違いを考慮すればサルコシル不溶性画分のタウがバンドとして検出されることはヒトの脳内でのタウ凝集物ほど固い凝集物になりきっていないことが想定された。そこで様々な分画の条件を試したが、TBS に可溶化後の超遠心分画ペレットを電気泳動した際に最も多くのスメア状の反応性を検出した。スメアの検出はヒトタウ発現ショウジョウバエにアルツハイマー病脳内の凝集物に似たタウの存在を示唆した。

##### (3) 線維状形態物の観察

アルツハイマー病の脳から抽出したタウの凝集物は線維状の形態をとることが知られている。このような線維状のタウがヒトタウ発現ショウジョウバエにも観られるかどうかを検証した。研究の方法にも記したようにタウの免疫沈降はサルコシル存在下では行えない。一方でスメア様の反応性が TBS 不溶性画分から多く検出されたことからこの画分を抗タウ抗体で免疫沈降することにした。免疫沈降後に回収した試料をマイカの上のせて原子間力顕微鏡で溶液内にて観察した。その結果、多くの粒状の形態物の中に極めて稀ではあるが線維状の固まりを見つけた。この線維状形態物の構造的な特徴については今後の更なる解析が必要であるが、ヒトの脳からの抽出物に認められるタウの線維状凝集体と同様の凝集体がヒトタウ発現ショウジョウバエでも形成されることを示唆する結果であった。

##### (4) まとめ

加齢に伴う凝集の増加、スメア様のタウの検出、そして線維状の形態の観察はヒトタウ発現

ショウジョウバエモデルが完全ではないもののタウ病態を模写していることを示した。この *in vivo* システムを用いれば *in vitro* で見つかった薬の効果を検証することでマウスモデルなどへの投与の前により可能性のある候補を選別できる他、タウの病態を解析することにも応用可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉池裕二
2. 発表標題 アルツハイマー病研究の変遷
3. 学会等名 第13回霊長類医科学フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Therapeutic Agent for Tauopathy and Method for Screening Thereof	発明者 Yuji YOSHIIKE	権利者 NCGG
産業財産権の種類、番号 特許、US Patent No. 10,478,511	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----