

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860075

研究課題名(和文) タウ蛋白を標的とした新たな漢方由来アルツハイマー病治療薬の探索および作用機序解明

研究課題名(英文) Exploration and identification of kampo medicines as therapeutic agent for Alzheimer's disease targeting tau protein

研究代表者

藤原 博典 (Fujiwara, Hironori)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教

研究者番号：10396442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タウ蛋白を標的とした和漢薬由来認知症治療薬の基礎研究として、タウリン酸化酵素であるGSK-3 β の阻害作用を有する黄連解毒湯および三黄瀉心湯の効果を解析した。これらの和漢薬を投与することにより、加齢促進モデルマウスの短期エピソード記憶障害が有意に改善され、その作用機序として、大脳皮質のGSK-3 β 阻害による神経細胞の機能維持に寄与する蛋白であるCRMP2のリン酸化抑制が関与することが示唆された。一方、リン酸化タウは各群で差がなかったことから、SAMP8大脳皮質ではCRMP2がタウより早期にリン酸化されることが明らかとなり、CRMP2が認知症の早期バイオマーカーとなることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To find novel dementia-therapeutic Kampo medicines, we examined the effects of orangedokuto (OGT) and sanosyasinto (SST), kampo medicines including Scutellaria root, on memory deficit and brain GSK-3 β activity in 6-month-old senescence-accelerated prone mice (SAMP8), an aging animal model. The administration of these Kampo medicines significantly improved object recognition memory deficit of SAMP8. Moreover, OGT and SST administration significantly suppressed CRMP2 phosphorylation by inhibiting age-dependent GSK-3 β activation in cortex of SAMP8. On the other hand, tau phosphorylation did not differ between each group, indicating that the phosphorylation of CRMP2 but not tau is involved in early cognitive impairment in SAMP8. These results suggest that OGT and SST could have the potency to be a novel therapeutic agent for dementia, and that CRMP2 may be a new biomarker for dementia.

研究分野：神経薬理学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 GSK-3 β タウ蛋白 CRMP2 黄連解毒湯 三黄瀉心湯

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) は高齢者認知症の 60% を占める代表疾患の一つであり、その病態解明、早期診断および根本的治療と予防の実現は喫緊の課題となっている。AD の病理的特徴として、アミロイド蛋白 (A β) が凝集・蓄積した老人斑の形成や、高度にリン酸化されたタウ蛋白が神経細胞内に凝集・不溶化した神経原繊維変化が挙げられる。従来 AD 研究では A β 蓄積を起点として、その後の全てのイベントを A β 蓄積から説明しようとする「アミロイド仮説」に基づいて、より根本的な予防・治療法になりえる A β 生成阻害薬、A β 重合阻害薬などの研究が進められてきた。申請者のこれまでの研究においても、AD の臨床症状を改善する漢方処方である抑肝散および八味地黄丸の構成生薬である釣藤鈎および牡丹皮が、in vitro において A β の凝集を制御することを見出した (Fujiwara et al. 2006)。また、これらの生薬および漢方を A β 前駆蛋白 (APP) トランスジェニックマウスに経口投与することにより、記憶保持能力の低下が抑えられ、かつ脳内および血漿中の A β 量が減少することも発見した (Fujiwara et al. 2009, 2011)。

しかし最近の知見より、認知症の重症度と最も強く相関するのは老人斑ではなく、神経原繊維変化の密度であることが示唆されている。また、正常高齢者で見られる老人斑は主として A β のみで構成されるびまん性老人斑であるのに対して、AD で出現する典型的老人斑はタウ蛋白を初めとする細胞骨格蛋白やユビキチンを変性神経突起内部に持った老人斑であることが分かってきている。すなわち、タウ蛋白の異常は、正常では認められない AD 特異的エピソードと言える。これらのことから、今後の AD 治療薬開発においては、タウ蛋白リン酸化阻害作用や凝集阻害作用を有するタウ蛋白制御薬の開発がスタンダードとなることが示唆される。

2. 研究の目的

上記の背景の基に本研究では、タウ蛋白のリン酸化を標的とした認知症治療薬としての和漢薬の探索および、その応用の為の基礎研究基盤を目的として、タウ蛋白のリン酸化酵素の一つである Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) に着目した。GSK-3 はムスカリン受容体、NMDA 受容体などの下流に存在しており、PKA、PKC、Akt、MAP kinase などによって調節されている。また、GSK-3 は AD において重要なシグナル伝達分子であり、神経細胞に A β を処理することによって活性化され、タウ蛋白の過剰リン酸化を引き起こすことが報告されている。さらに、A β が神経細胞に障害を及ぼすためには、リン酸化タウ蛋白が必要であることも報告されており、AD において『A β 凝集 GSK-3 活性化 タウ蛋白過剰リン酸化』のカスケードが重要であると言える。この GSK-3 を標的

子として、申請者が先行研究にて GSK-3 阻害活性を見出したオウゴン由来フラボノイド類、およびそれらを有効成分とするオウゴンを含んだ和漢薬の効果について、培養細胞を用いた in vitro 解析および認知症モデル動物を用いた in vivo 解析によって検証した。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた in vitro 解析: 胎生 15 日目のマウスより大脳皮質を摘出し、神経細胞分散液 (Wako) を用いて初代培養神経細胞を作成した。薬物を投与した 24 時間後に細胞を可溶化し、タンパク濃度を測定した後に以下の実験に用いた。

GSK-3 活性測定: ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega) を用い、添付プロトコールに従ってキナーゼアッセイを行った後に、マイクロプレートリーダー (FilterMax F5: Molecular Devices) で測定した。

ウエスタンブロッティング: 10% SDS-ポリアクリルアミドで電気泳動を行い、PVDF 膜に転写した。5% スキムミルク含有 TBS-T でブロッキングした後に、各種抗体と反応させ、LAS-4000 (GE) にて画像を得た。

(2) 実験動物を用いた in vivo 解析:

モデル動物: 老化促進マウス (SAMP8) および嗅球摘出 (OBX) モデルを用いた。SAMP8 を用いた検討では、対照群として正常老化マウス (SAMR1) を用い、6 ヶ月齢から和漢薬投与を開始した。また、OBX マウスは 10 週齢 ddY 系マウスに嗅球摘出手術を施し、その 3 週間後より薬物投与を行った。対照群としては偽手術 (Sham) 群を用いた。どちらのモデル動物においても、雄性マウスを用いた。

薬物投与: オウゴンを含む和漢薬である黄連解毒湯 (OGT) および三黄瀉心湯 (SST) を用いた。各処方収載量の 10 倍量で煎じた後、OGT は人 1 日用量の 3、10 および 30 倍量 (それぞれ 425、1,416 および 4,250 mg/kg) となるように、SST は 30 倍量 (4,500 mg/kg) となるように調整し、1 日 1 回、行動実験終了時まで反復投与した。投与開始 1 か月後より行動実験を開始した。

行動実験: モデル動物の短期記憶能は新規物体認知試験で評価し、長期記憶能は恐怖条件付け試験で評価した。

新規物体認知試験: マウスの新規物体に対する嗜好性を指標とし、はじめにオープンフィールド中に設置した 2 つの同形の物体を探索させ、その 30 分後に一方を別の物体に交換し、再度探索させた際の新規物体に近づいた時間を短期記憶能として、SMART® 解析システムを用いて客観的に解析した。また、新規物体への嗜好性を、以下の式で表される識別指数 (Discrimination index: DI) で示した。

$$DI = \frac{T_n - T_{F1}}{T_n + T_{F1}} \quad \begin{array}{l} T_n: \text{新規物体 (N) の探索時間} \\ T_{F1}: \text{既知物体 (F1) の探索時間} \end{array}$$

恐怖条件付け試験: マウスのすくみ行動を恐

怖記憶の指標とし、マウスに電気ショックを音と関連付けて記憶させた一日後に、音および電気ショックなしで同環境下に戻し、すみ行動の時間を海馬由来の文脈的恐怖記憶として解析を行った。また、その5日後に、環境を変えて音刺激のみを与え、扁桃体由来の音刺激恐怖記憶の解析を行った。両解析は、SMART®解析システムを用いて客観的に定量した。

神経化学的解析：全行動実験終了後、海馬および大脳皮質を摘出した後に、*in vitro*解析と同様の方法で GSK-3 活性測定およびウエスタンブロットングを行った。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた *in vitro* 解析：先行研究において GSK-3 酵素活性阻害作用が見出されたオウゴン由来フラボノイド類である wogonin, baicalin および baicalein を用いて、マウス大脳皮質初代培養細胞における GSK-3 阻害作用について検討したところ、wogonin は 100 μ M で、baicalin および baicalein は 50 μ M で有意に阻害した (Fig. 1)。

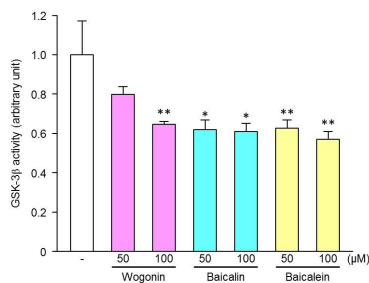


Fig. 1 Effects of scutellarius flavonoid on GSK-3 activity in primary cortical neuron. Primary cortical neurons were treated with several concentrations of flavonoids for 24 h. Each value represents the means \pm S.E.M. from five samples. *P < 0.05 and **P < 0.01 vs the control.

また、アミロイド蛋白 (50 μ M A₂₅₋₃₅) 誘発性細胞傷害によって引き起こされるタウ蛋白リン酸化に対するこれらのフラボノイド類の影響を検討したところ、A₂₅₋₃₅ 処理により主要なタウ蛋白リン酸化部位であるセリン 396 位 (GSK-3 によってリン酸化される部位; Ser396) やスレオニン 205 位 (GSK-3 以外の酵素によってリン酸化される部位; Thr205) のリン酸化が引き起こされたが、フラボノイド類の前処置により Ser396 のリン酸化が抑制されていた。また、baicalein 処置細胞では、Ser396 に加えて Thr205 のリン酸化の抑制作用が認められた (Fig. 2)。

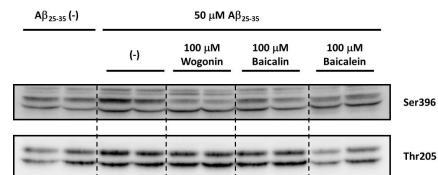


Fig. 2 The effects of scutellarius flavonoid on A₂₅₋₃₅-induced tau protein phosphorylation in primary cortical neuron. Primary cortical neurons were treated with several concentrations of flavonoids for 24 h.

以上の結果からマウス大脳皮質初代培養細胞において、i) オウゴン由来フラボノイド類は GSK-3 阻害作用を有し、ii) GSK-3 によるタウ蛋白のリン酸化を阻害することが示唆された。また、iii) baicalein は GSK-3 阻害作用以外の作用も有する可能性も見出された。

(2) SAMP8 を用いた *in vivo* 解析：はじめに、SAMP8 における短期記憶障害と、それに対する和漢薬の改善効果について、新規物体認知試験で解析した。SAMR1 に比べて SAMP8 では、新規物体に対する嗜好性が顕著に減少しており、短期記憶障害が誘発されていた。その記憶障害に対し、ヒト換算 30 倍量の OGT および SST 投与は顕著な改善効果を示した。また、これらの結果から discrimination index を算出したところ、SAMP8 で見られた障害に対し、OGT 投与では増加傾向を示し、SST では有意に改善した (Fig. 3)。

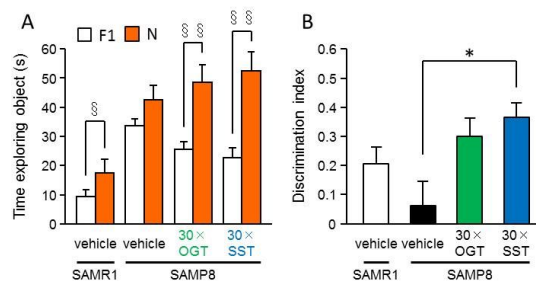


Fig. 3 Effects of 30x OGT and 30x SST on object recognition deficits in SAMP8. (A) The data from the test trials conducted 30 min after the sample trials and (B) Discrimination index. The time each mouse spent exploring objects (New or familiar) was recorded using the SMART system (PanLab, S.L., Barcelona, Spain). Each value represents the mean \pm S.E.M. from 10-11 mice. §P < 0.05 and §§P < 0.01 vs the time spent exploring a familiar object, and *P < 0.05 vs SAMP8-vehicle group.

次に、SAMP8 における長期恐怖記憶障害と、それに対する和漢薬の改善効果について恐怖条件付け試験で解析した。SAMP8 では SAMR1 にくらべて文脈的恐怖記憶および音刺激恐怖記憶試験の両方において、すくみ行動の顕著な減少が見られ、長期恐怖記憶が障害されていることが明らかとなった。それに対し、OGT および SST 投与は無効であった (Fig. 4)。

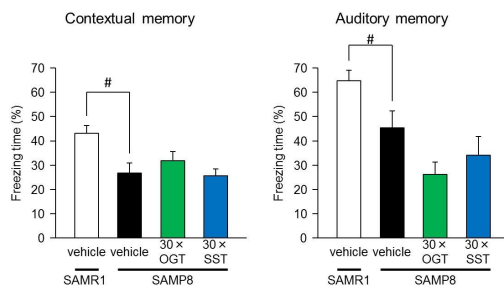


Fig. 4 The effect of 30×OGT and 30×SST on long-term fear memory deficits in SAMP8. Contextual (left) and auditory (right) memories were assessed at 1 and 5 days after fear conditioning. Each value represents the mean ± S.E.M. from 10-11 mice. #P < 0.05 vs SAMR1. *P < 0.05 vs SAMP8-vehicle group.

両和漢薬の作用機序を検討するため、行動実験終了後のマウスより摘出した海馬および大脳皮質での GSK-3 活性を測定した結果、SAMP8 大脳皮質では加齢依存的に GSK-3 活性が上昇し、さらに両漢方薬の投与により顕著に抑制されることが明らかとなった (Fig. 5)。

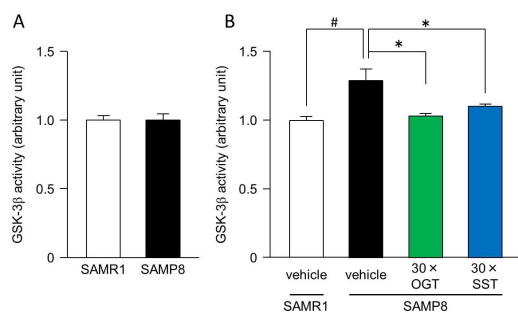


Fig. 5 The effects of 30×OGT and 30×SST on GSK-3 activity in the cortex of SAMP8. A: 2 months, and B: 8 months mice. Each value represents the mean ± S.E.M. from 5-8 brain samples. #P < 0.05 vs SAMR1 and *P < 0.05 vs SAMP8-vehicle group.

一方、GSK-3 およびそのリン酸化体の発現量には変化がなかったことから、加齢による GSK-3 活性の上昇はリン酸化以外に起因すると推測された。また、海馬 GSK-3 活性は各群で有意な変化は認められなかった。

他方、Tau およびそのリン酸化体の発現量は各群で差がなかったため、他の下流分子に

ついても解析したところ、神経細胞骨格維持に寄与している collapsin response mediator proteins (CRMP2) のリン酸化が SAMP8 で顕著に増加し、その増加は OGT および SST により有意に抑制された (Fig. 6)。

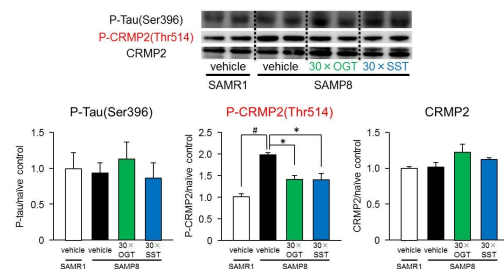


Fig. 6 Effects of 30×OGT and 30×SST on the phosphorylation of tau and CRMP2 proteins in the cortex of SAMP8. Typical photos indicate the levels of p-Tau (Ser396), p-CRMP2 and CRMP2. The densities of these bands were quantified and each value represents mean ± S.E.M. from eight brain samples. #P < 0.05 vs SAMR1 and *P < 0.05 vs SAMP8-vehicle group.

以上の結果より、加齢による短期エピソード記憶障害の発現には、大脳皮質における GSK-3 の活性上昇とそれによる CRMP2 リン酸化体の増加が関与し、OGT および SST はそれらを抑制することにより障害を改善することが示唆された。また、SAMP8 は tau タンパクリン酸化が誘導されるモデル動物として汎用されているが、本研究の結果から、早期の月齢では GSK-3 の活性化に伴い、Tau タンパクリン酸化に先行して CRMP2 のリン酸化が引き起こされ、記憶障害に寄与することが示唆された。

(3) OBX マウスを用いた in vivo 解析: 次に、脳傷害モデルである OBX 動物を用い、SAMP8 と同様の方法で認知行動障害について検討した。新規物体認知試験では、OGT 投与群以外で新規物体に対する探索時間の有意な増加が認められ、OGT 投与群では増加傾向が認められた。この結果から Discrimination index を算出したところ、Sham 群にくらべて OBX 群では有意に減少したが、漢方投与による影響は確認されなかった (Fig. 7)。

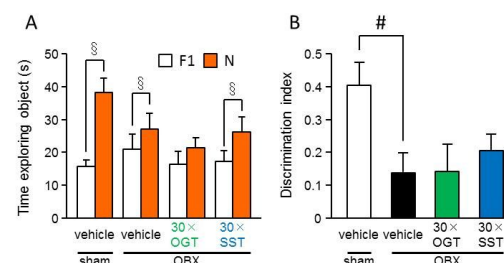


Fig. 7 Effects of t 30×OGT and 30×SST on object recognition deficits in OBX mice. (A) The data from the test trials conducted 30 min after the sample trials and (B) Discrimination index. The time each mouse spent exploring objects (New or familiar) was recorded using the SMART system (PanLab, S.L., Barcelona, Spain). Each value represents the mean ± S.E.M. from 11-14 mice. [§]P < 0.05 vs the time spent exploring a familiar object, and [#]P < 0.05 vs SAMR1-vehicle group.

また、恐怖記憶試験では、OGTはOBX誘発の文脈的恐怖記憶および音刺激恐怖記憶の両方を改善したが、SSTは文脈的恐怖記憶のみ改善を示した (Fig. 8)。

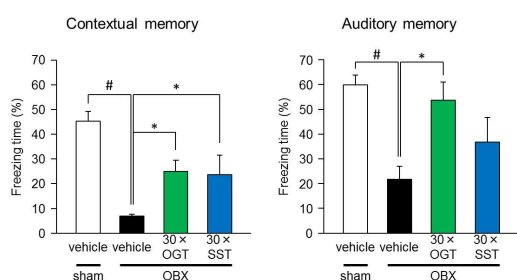


Fig. 8 The effect of 30×OGT and 30×SST on long-term fear memory deficits in OBX mice. Contextual (left) and auditory (right) memories were assessed at 1 and 5 days after fear conditioning. Each value represents the mean ± S.E.M. from 11-14 mice. #p < 0.05 vs Sham group and **p < 0.01 vs OBX-vehicle group.

一方、大脳皮質のGSK-3活性は、shamとOBX群間で差はなく、またOBX群の脳内GSK-3活性はOGTおよびSSTにより軽度抑制されたに過ぎなかった (Fig. 9)。

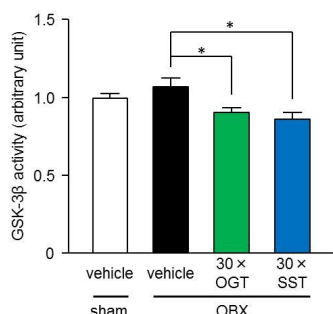


Fig. 9 The effects of 30×OGT and 30×SST on GSK-3 in the cortex of SAMP8. Each value represents the mean ± S.E.M. from 8 brain samples. **P < 0.01 compared with OBX-vehicle group.

従ってOBX誘発の認知機能障害とそれに対する両漢方薬の改善効果に脳内GSK-3系が関与する可能性は小さいと考えられた。また、長期恐怖記憶は扁桃体に依存していることが知られていることから、本研究におけるSAMP8とOBXマウスに見られる長期恐怖記憶障害に対するOGTおよびSSTの反応性の違いを解明するためには、今後それぞれのモデル動物の扁桃体について詳細に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

1. 吉田淳, 星野遥, 藤原博典, 荒井啓行, 工藤幸司, 松本欣三: 老化促進マウスの認知機能低下に対する黄連解毒湯の改善効果, 第33回和漢医薬学会学術大会, 2016年8月27日, 星薬科大学(東京)

2. 吉田淳, 星野遥, 藤原博典, 荒井啓行, 工藤幸司, 松本欣三: 嗅球摘出マウスの認知機能低下に対する黄連解毒湯および三黄瀉心湯の改善効果, 第66回日本薬理学会北部会, 2015年9月18日, 富山国際会議場(富山)

〔図書〕(計1件)

Kinzo Matsumoto, Hironori Fujiwara: Memory/Learning, Dementia and Kampo. Inui A, editor. New York: Humana Press; 2016, Sep. Herbal Medicines, New Horizons, Methods in Pharmacology and Toxicology, p. 181-205.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 博典 (FUJIWARA, Hironori)
富山大学・和漢医薬学総合研究所・助教
研究者番号: 10396442

(2) 研究協力者

吉田 淳 (YOSHIDA, Jun)
星野 遥 (HOSHINO, Haruka)