

令和元年6月25日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09235

研究課題名(和文) Rho-ROCK阻害薬によるタウ蛋白オリゴマー形成抑制機構の解明

研究課題名(英文) Rho-kinase ROCK Inhibitors Reduce Oligomeric Tau Protein

研究代表者

濱野 忠則 (Hamano, Tadanori)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：40334817

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：高度にリン酸化したタウ蛋白はアルツハイマー病(AD)の主たる病因となる。我々は脂質異常症治療薬pitavastatinがリン酸化タウを減少させること、この効果はROCK阻害を介することを報告した。ROCKはアクチン細胞骨格構成に重要な役割を有する疾患治療のターゲットである。今回ROCK阻害薬のタウ蛋白重合抑制機構につき詳細に検討した。ROCK阻害薬によりリン酸化タウは減少し、タウリン酸化酵素が不活性化していた。さらにタウ分解経路であるオートファジーの活性化も示唆された。タウオリゴマー量も減少していた。以上より、ROCK阻害薬はADをはじめとするタウオパチーの治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ROCK阻害薬はアルツハイマー病でみられる高度にリン酸化し、重合したタウ蛋白を減少させる可能性が示された。またこの効果はタウ蛋白リン酸化酵素(GSK3、Cdk5)の不活性化、およびタウ蛋白分解経路であるオートファジーの活性化による可能性が示された。

本研究はアルツハイマー病をはじめとするタウオパチーの新しい治療法を提示する可能性があり、トランスレショナルリサーチへの応用が期待され、学術的、および社会的に極めて重要である。

研究成果の概要(英文)：Neurofibrillary tangles (NFTs), pathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD), consist of highly phosphorylated tau. We previously reported that pitavastatin decreases the total and phosphorylated tau. The reduction of tau was considered to be due to Rho-associated coiled coil protein kinase (ROCK) inhibition by pitavastatin. ROCK plays important roles to organize the actin cytoskeleton, an expected therapeutic target of human disorders. We have examined the effects of ROCK inhibitors on tau phosphorylation in detail by using cell culture model of tauopathy, and a mouse model of tauopathy. The levels of phosphorylated tau, and oligomeric tau were reduced by the ROCK inhibitors. ROCK inhibitor inactivated tau kinases (GSK3beta, Cdk5). Autophagy, which is important for the degradation of tau was activated. Collectively, these results suggest that ROCK inhibitors represent a viable therapeutic route to reduce the pathogenic tau protein in tauopathies, including AD.

研究分野：アルツハイマー病

キーワード：アルツハイマー病 タウ蛋白 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会の進展とともに、認知症患者数は急増している。全認知症患者の半数以上をアルツハイマー病(AD)が占めるが、未だ日常臨床ではアセチルコリンエステラーゼ阻害薬と、グルタミン酸 NMDA 受容体拮抗薬による対症療法のみで、有効な根本治療薬は全く開発されていない。AD の主たる病理所見は、老人斑(SP)と神経原線維変化(NFT)である。SP の構成要素はアミロイドβ 蛋白(Aβ)である。一方 NFT の主たる構成要素は高度にリン酸化され、重合したタウ蛋白である。タウ蛋白は微小管に結合し、安定化させる重要な生理的作用を有するが、GSK3β をはじめとするタウのリン酸化酵素の働きにより、リン酸化が亢進すると、タウの重合が促進し、オリゴマー形成→NFT 形成→神経細胞死に結びつく。また、アポトーシスのシグナル、カスパーゼの活性化により、タウのC 末端が切断し、タウの重合が開始する。微小管結合部位にはβ シート構造を形成させやすくする特性があり、一方 C 末端領域にはタウ凝集を抑制する機能が存在する。なお、タウ蛋白のリン酸化、重合は AD のみならず、他の頻度の高い認知症患者(前頭側頭葉変性症、嗜銀顆粒性認知症、慢性外傷性脳症)でも出現するため、Aβより普遍性が高い。さて、以前から糖尿病、脂質異常症をはじめとする生活習慣病が AD の危険因子であることが注目されてきた。AD の神経病理学的特徴と、コレステロール代謝の変化を結びつけるエビデンスは豊富に存在し、APOEε4 対立遺伝子は遅発性 AD の強力な危険因子であり、脳のリポタンパクおよびコレステロール輸送を調節する経路が AD の発症に影響をおよぼすと示唆されている。AD 患者脳の Aβ ペプチドの分解は、脂質付加された ApoE によって促進されることから、コレステロールの ApoE への効率的な輸送により、SP の沈着が予防されることが示唆される。また NFT (Distil et al 2003)や SP へのコレステロールの蓄積も報告されている。興味深いことに、血漿 HDL 値が高いほど、AD の発症リスクが低下することが明らかにされた(Reitz et al. 2010)。脂質異常症治療薬スタチンを服用している患者に AD をはじめとする認知症の発症が有意に少ないという報告がある(Haag et al., 2009)。そこで、我々は、HDL 上昇効果が期待できるスタチン:pitavastatin を野生型タウを発現する神経細胞株に投与しタウ重合抑制効果について検討を行った。その結果、タウの重合量、およびリン酸化が pitavastatin により著しく減少すること、さらに、これらの効果は、コレステロール代謝過程で生ずる GGPP 投与で打ち消されること、また 低分子 G 蛋白 Rho のキナーゼ(ROCK)の阻害により全く同一の結果が得られることが明らかになった。以上より、pitavastatin によるタウ重合、リン酸化抑制作用は Rho-キナーゼ ROCK (Rho-associated coiled coil protein kinase)阻害を介するものであることが示唆された(Hamano et al., Neurobiol Aging 2012)。TetOff 誘導系を導入した神経系細胞に対する ROCK 阻害薬による、タウ蛋白リン酸化に及ぼす影響につき検討する。一方脳虚血はタウ蛋白リン酸化の悪化因子として注目されている。我々はすでに頸動脈コイルを用いた慢性脳虚血マウスではタウ蛋白のリン酸化が亢進していることを示している(Fujita Y, Hamano et al., AAC 2014)。このマウスモデルに対する ROCK 阻害薬のタウ蛋白リン酸化抑制についても詳細に検討を加える。

2. 研究の目的

アルツハイマー病(AD)の主要な病理所見である神経線維変化(NFT)は、タウ蛋白のリン酸化、オリゴマー形成を介した重合促進により形成されることが知られている。さらにタウオリゴマーは NFT よりも細胞毒性が強いことが明らかである。我々は脂質異常症治療薬 pitavastatin がタウ蛋白リン酸化、重合を阻害すること、さらにこの現象は Rho-キナーゼ(ROCK)阻害効果に起因するという可能性を見出した(Hamano et al., Neurobiol Aging 33:2306, 2012)。今回、TET-OFF 誘導系を導入した神経細胞株を用いて、ROCK 阻害薬によるタウ蛋白オリゴマー形成抑制機構につき詳細に解析する。同時に変異型タウモデルマウス(P301L)に ROCK 阻害薬を投与することによるタウオリゴマー形成抑制機構についても in vivo で解明する。

3. 研究の方法

1)ROCK 阻害薬によるタウ蛋白リン酸化抑制機構の検討

Rho-キナーゼ(ROCK)阻害薬(H1152: Calbiochem, Y-27632: WAKO)によるタウ蛋白リン酸化の減少については、リン酸化タウに対する抗体として monoclonal 抗体 PHF-1, CP13 (Albert Einstein 大 Davies 教授より供与)、および AT270, AT180 (Thermo Scientific) を用いた WB 法により検討する。タウのリン酸化酵素活性については、抗 GSK3β 抗体、抗 cyclin dependent kinase (Cdk)5 抗体、抗 SAPK/JNK 抗体(Cell Signaling)を用い、検討する。さらにタウの脱リン酸化酵素については、protein phosphatase 2A(PP2A)抗体 (Santa Cruz) を用いて検討する。分担研究者の吉田はタウ蛋白リン酸化酵素活性の検討に精通している (Yoshida, Goedert J. Neurochem 120: 165, 2012; Yoshida et al., J Neurochem 90: 352, 2004)。

2) ROCK 阻害薬によるタウオリゴマー形成抑制機構の解明

画分法により NFT 形成に關与するサルコシル不溶性画分、およびトリス不溶性、サルコシル可溶性画分のタウに關し総タウ抗体(P44, Mayo Clinic Jacksonville, Yen 教授より供与)、各種リン酸化タウ抗体(PHF-1, CP13)、ならびにタウオリゴマー特異的抗体 TOC1(Tau Oligomer Complex1)(J Biol Chem 286, 23063, 2011; Michigan 大学 Kaanan 博士より供与)を用いて WB 法により検討する。

3) ROCK 阻害薬による caspase 不活性化による caspase 切断タウの減少機構の検討
caspase 不活性化については、抗 cleaved caspase3 抗体 (Cell Signalling)を用いた WB により検討する。さらに、caspase により切断されたタウについては抗 TauC3 抗体 (Santa Cruz) により検討する。我々の予備的検討では Caspase により C 末端が切断したタウの減少が示された。ROCK 阻害薬投与による細胞毒性の有無については、ATP assay(Promega)、および細胞の形態学的観察により検証する。

4)ROCK 阻害薬によるオートファジー活性に及ぼす影響の検討
我々の予備的検討では、ROCK 阻害薬によりリン酸化タウのみならず、総タウも減少することが示された。タウ分解に重要な影響を持つオートファジー (Hamano et al., Eur J Neurosci 27:119, 2008) の活性について抗 LC3 抗体 (Novus) および抗 P62 抗体(Progen)を用いて検討する。

5)変異型タウを発現するマウス(P301L)に対する ROCK 阻害薬のタウオリゴマー形成抑制機構につき WB 法、ならびに免疫組織化学法により検討し、共焦点レーザー顕微鏡(Leica)を用い検討する。

4 . 研究成果

細胞モデルを用いた検討では、ROCK 阻害薬(H1152, Y27632)投与により総タウ、およびリン酸化タウは減少していた。タウリン酸化酵素である GSK3 β と Cdk5 の不活性化がみられた。同時に caspase3 の不活性化、および caspase 切断タウの減少をともなっていた。サルコシル不溶性画分の重合したタウも減少していた。さらにタウの重要な分解経路であるオートファジー、およびプロテアソームの活性化も示唆された。最終的にタウオリゴマー特異的な TOC1 抗体陽性のタウオリゴマーの減少もドットプロット、およびウエスタンプロットにより示された。タウオリゴマーの量も減少していた。同様に変異型タウ(P301L)を過剰発現するマウスモデルに対し fasudil を投与したところ、同様にリン酸化タウ、およびオリゴマータウが減少していた。以上の結果より、ROCK 阻害薬は AD をはじめとするタウオパチーの治療に有効である可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 18 件)

1. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, Arishima H, Kikuta K, Yamashita T, Inoue Y, Ueda M, Ando Y, Wilson MR, **Hamano T**, Nakamoto Y, Naiki H: Apolipoprotein E and clusterin inhibit the early phase of amyloid- β aggregate on in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. **Acta Neuropathol Commun** 7(1):12, 2019 doi: 10.1186/s40478-019-0662-1. 査読有
2. Enomoto S, Shigemitsu H, Kitazaki Y, Ikawa M, Yamamura O, **Hamano T***, Tai K, Iwasaki H, Koizumi H, Hasegawa M, Takeda K, Nakamoto Y: Cladophialophora bantiana infection mimicking neuromyelitis optica. **J Neurol Sci**. 399:169-171, 2019. doi: 10.1016/j.jns.2018.12.013. 査読有
3. Ikawa M, Kimura H, Kitazaki Y, Sugimoto K, Matsunaga A, Hayashi K, Yamamura O, Tsujikawa T, **Hamano T**, Yoneda M, Okazawa H, Nakamoto Y: Arterial spin labeling MR imaging for the clinical detection of cerebellar hypoperfusion in patients with spinocerebellar degeneration. **J Neurol Sci** 394:58-62. 2018 doi:10.1016/j.jns.2018.09.007. 査読有
4. **Shirafuji N**, **Hamano T**, Yen SH, Kanaan NM, Yoshida H, Hayashi K, Ikawa M, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y: Homocysteine Increases Tau Phosphorylation, Truncation and Oligomerization. **Int J Mol Sci** 19(3): E891, 2018 doi:10.3390/ijms19030891. 査読有
5. **Hamano T**, Hayashi K, **Shirafuji N**, Nakamoto Y: The Implications of Autophagy in Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res** 15(14):1283-1296, 2018 doi: 10.2174/1567205015666181004143432. 査読有
6. Fujita Y, Toyomoto T, Sakoh-Goshima T, Kohno Y, Okada M, **Hamano T**, Nakamoto Y. Increased adiponectin is associated with cerebral white matter lesions in the elderly with cognitive impairment. **Metab Brain Dis**. 33(4) 1385-1388, 2018 doi: 10.1007/s11011-018-0247-x. 査読有
7. Yamaguchi T, Yamamura O, **Hamano T**, Murakita K, Nakamoto Y. Premorbid physical activity is modestly associated with gait independence after a stroke: an exploratory study. **Eur Rev Aging Phys Act**. 15, 18, 2018 doi:10.1186/s11556-018-0208-8. 査読有
8. Onishi H, Yamamura O, Ueda S, Shibata M, Enomoto S, Maeda F, Tsubouchi H, Hirobe T, Shimizu S,

- Hanzawa K, Hamano T, Nakamoto Y, Hayashi H, Terasawa H. Ultrasound cardiography examinations detect victims' long-term realized and potential consequences after major disasters: a case-control study. **Environ Health Prev Med.**23(1)37, 2018 doi: 10.1186/s12199-018-0721-4. 査読有
9. 濱野忠則, 白藤法道, 林浩嗣, 佐々木宏仁, 中本安成. Rho-ROCK 阻害薬によるタウ蛋白オリゴマー形成抑制機構の解明 **細胞** 50(6) 340-343, 2018 査読なし
 10. 濱野忠則, 白藤法道, 林浩嗣, 佐々木宏仁, 中本安成 : ROCK 阻害薬によるタウ蛋白オリゴマー形成抑制機構 **アグリバイオ** 2(8): 790-794, 2018 査読なし
 11. 濱野忠則, 上野 亜佐子「古くて新しい神経感染症 真菌性髄膜炎の克服にむけて」 真菌性髄膜炎の疫学と長期予後 . **NEUROINFECTION** 23(1): 90-97, 2018 査読なし
 12. 濱野忠則, 上野亜佐子, 伊藤達彦, 山村修, 山本雅之, 他 4 名. 第 1 回内科医が身に付ける認知症患者の対処法. **日内会誌** 107: 779-784, 2018 査読有
 13. Hamano T, Matsunaga A, Yamamura O, Nakamura M, Kawamura Y, Higuchi I, Kuriyama M, Nakamoto Y. Influenza A (H3N2)-induced rhabdomyolysis complicating anterior compartment syndrome: Serial changes in muscle MRI T2 fat suppression imaging. **eNeurologicalSci.** 7:15-17, 2017 doi: 10.1016/j.ensci.2017.03.006. 査読有
 14. Kishitani T, Matsunaga A, Ikawa M, Hayashi K, Yamamura O, Hamano T, Watanabe O, Tanaka K, Nakamoto Y, Yoneda M. Limbic encephalitis associated with anti-NH2-terminal of α -enolase antibodies: A clinical subtype of Hashimoto encephalopathy. **Medicine (Baltimore).** 96(10):e6181, 2017 doi: 10.1097/MD.0000000000006181. 査読有
 15. 三原 弘, 木戸 敏喜, 岡澤 成祐, 古川 彩香, 田中 宏昌, 溝岡 雅文, 山内 孝義, 濱野忠則, 水腰 英四郎, 梶波 康二: 腹部救急診療トレーニングコース開発の試み. **日内会誌** 106 : 2662 ~ 2668 , 2017 査読有
 16. Hamano T, Shirafuji N, Makino C, Yen SH, Kanaan NM, Ueno A, Suzuki J, Ikawa M, Matsunaga A, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y. Pioglitazone prevents tau oligomerization. **Biochem Biophys Res Commun.** 478(3):1035-42, 2016 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.016. 査読有
 17. Hayashi K, Hamano T, Kawamura Y, Kimura H, Matsunaga A, Ikawa M, Yamamura O, Mutoh T, Higuchi I, Kuriyama M, Nakamoto Y. Muscle MRI of the Upper Extremity in the Myotonic Dystrophy Type 1. **Eur Neurol.** 76(1-2):87-94, 2016. doi: 10.1159/000448328. 査読有
 18. 濱野忠則, 林 浩嗣: ビタミン欠乏による神経疾患. **日本臨床内科医会誌** 31(3): 420, 2016 査読なし

〔学会発表〕(計 9 件)

国際学会発表

1. Hamano T, Nagata M, Matsubara R, Ito T, Ikebata Y, Ibe A, Enomoto S: TRAINING COURSE OF EVALUATION AND MANAGEMENT OF DEMENTIA FOR PRIMARY CARE PHYSICIANS. **Alzheimers Dement** 14(7): P547-P548, 2018 (**Alzheimer Association International Conference 2018** in Chicago, USA, July 22-26, 2018)
2. Kitazaki Y, Hamano T, Ueno A, Asano R, Sasaki H, Enomoto S, Yamamura O: CSF TAU PROTEIN IN AUTOIMMUNE ENCEPHALITIS PATIENTS. **Alzheimer's Association International conference AAIC 2018**, Chicago, July 22-26, 2018
3. Hamano T, Hayashi K, Ueno A, Shirafuji N, Fujita Y, Nakajima H, Enomoto S, Endo Y, Yamaguchi T, Sasaki H, Ikawa M, Yamamura O, Kuriyama M, Nakamoto Y: Effectiveness of pitavastatin in patients with mild Alzheimer's disease and hyperlipidemia. **Alzheimer's Association International conference AAIC 2017**, London, July 16-20, 2017
4. Hamano, T., Hayashi, K., Nagata, M., Matsubara, R., Ikebata, Y., Ito, T., ... & Sasaki, H. (2017). Efficacy of short questionnaire for screening of early stage of dementia. Trial in Fukui prefecture, Japan. **J Neurol Sci**, 381; 328. **The XXIII World Congress of Neurology (WCN 2017)** in Kyoto, Japan, 16-21 September 2017).
5. Hamano T, Fujita Y, Nagata M, Ito T, Matsubara R, Ikebata Y, Ikawa M: Efficacy of a short questionnaire for screening of early stage of dementia: Trial in Fukui prefecture, Japan. **Alzheimer's Association International conference AAIC 2016**, Toronto, 2016
6. Fujita Y, Hamano T, Shirafuji N, Nakamoto Y: Hypoperfusion-induced Tau hyperphosphorylation extends to non-hypoperfused area in mouse brain. **Alzheimer's Association International conference AAIC 2016**, Toronto, 2016

シンポジウム

1. 濱野忠則: Special Clinical Session3(頭痛の診断と治療のポイント3)副鼻腔炎および Tolosa

Hunt 症候群による頭痛の診断と治療 Headache Master School Japan 2018 in Toyama 教育講演, 富山 2018

2. 濱野忠則、上野亜佐子：「古くて新しい神経感染症 真菌性髄膜炎の克服にむけて」 真菌性髄膜炎の疫学と長期予後 第22回日本神経感染症学会総会・学術大会 シンポジウム 北九州 2017
3. 濱野忠則：クリオキノールとアルツハイマー病．スモンに関する調査研究班 平成29年度ワークショップ 特別講演、名古屋．2017

〔図書〕(計 6件)

著書

1. 濱野忠則 神経痛 今日の診療指針第8版 医学書院, 東京, 2020年4月発行予定
2. 濱野忠則：若年性認知症を支える 認知症診断ハンドブック 山田正仁編集 中外医学社, 東京, pp183-191, 2017
3. 林浩嗣、濱野忠則：内分泌・代謝・栄養欠乏性疾患：認知症診療実践ハンドブック、中外医学社, 東京, pp334-342, 2017
4. 濱野忠則、上野亜佐子. 記憶障害や認知症をきたす他の疾患 アルツハイマー病認知症疾患臨床医のための実践ガイド 小野賢二郎監訳 朝倉書店, 東京, pp131-140, 2017
5. 濱野忠則：抗認知症薬による治療 認知症診断ハンドブック 山田正仁編集 中外医学社, 東京, pp132-147, 2017
6. 山村修、濱野忠則：治療開始後も症状が進行する場合の考え方と対応；必携 脳卒中ハンドブック、改訂第3版 診断と治療社, 東京, pp269-273, 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：白藤 法道

ローマ字氏名： Shirafuji Norimichi

所属研究機関名：福井大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：4052319

研究分担者氏名：吉田 裕孝

ローマ字氏名： Yoshida Hirotaka
所属研究機関名： 国立研究開発法人国立長寿医療研究センター
部局名： 共同利用推進室
職名： 外来研究員
研究者番号（8桁）： 70646570

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 藤田 祐之
ローマ字氏名： Fujita Youshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。