

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08323

研究課題名(和文) 神経保護シグナルとタウリン酸化制御の解析に基づく新規アルツハイマー病治療薬開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic agents for Alzheimer's disease based on analysis of neuroprotective signals and regulation of tau phosphorylation

研究代表者

高鳥 悠記 (Takada-Takatori, Yuki)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：90411090

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)：アルツハイマー病の病理学的特徴である神経原線維変化は過剰にリン酸化されたタウが主要な構成要素である。本研究においてまず、マウス脳組織とラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞を用いて、低温負荷によりタウのリン酸化が惹起される評価系を構築した。そこで、これらの評価系を用いて、低温負荷により惹起されるタウのリン酸化に対するアルツハイマー病治療薬ドネペジルの作用について検討したところ、ドネペジルがタウのリン酸化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アルツハイマー病治療薬の神経保護作用の作用点は未だにわかっておらず、そこに至る作用機序についても不明な点が多い。本研究成果の学術的意義は、これらを明らかにすることで新たな作用点を有する新規アルツハイマー病治療薬の開発に繋がる重要な基礎的情報を得ることである。本研究の社会的意義として、高齢化社会における国民の健全な老後生活に大きく貢献できると予想される。

研究成果の概要(英文)：Tau hyperphosphorylation is one hallmark of Alzheimer's disease. Here, we investigated the effects of donepezil on tau hyperphosphorylation induced by hypothermia in vivo and in vitro. The phosphorylation levels of tau were significantly increased under hypothermia treatment. Pretreatment with donepezil prevented hypothermia-induced tau phosphorylation induced by hypothermia. These results suggest that donepezil prevents hypothermia--induced tau hyperphosphorylation in vivo and in vitro.

研究分野：薬理学

キーワード：アルツハイマー型認知症 タウ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病は進行性の神経変性疾患であり、症例が報告されてから約100年経た今も、発症・進行の機序には不明な部分が多く、根本的な治療方法は確立されていない。高齢化が進む社会にとって、アルツハイマー病の発症・進行の機序の解明と治療方法の確立は医学的・社会的に重要な課題である¹。

アルツハイマー病の病理学的特徴として、認知学習機能に重要であるコリン作動性ニューロンの脱落が挙げられる。アルツハイマー病治療薬の多くは、神経伝達物質のアセチルコリンを分解するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の活性を阻害することにより、認知機能障害を緩和することを目的として開発された²が、近年の研究から、アルツハイマー病治療薬の治療効果には、AChE 阻害活性に加えて神経保護作用などの複数の異なる作用が関与する可能性が指摘されている³。現在、新たな治療薬開発に向けて、アルツハイマー病治療薬の新たな神経保護作用機序の解明が切望されている。

(2) これまでに、アルツハイマー病治療薬の神経保護作用を報告し、さらに、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) により活性化される Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt- Glycogen synthase kinase-3(GSK-3)シグナル伝達経路が保護作用に重要であることを明らかにしてきた⁴⁻⁷。しかし、Akt 以降の神経保護作用機序の詳細については、依然として不明な点が多く、アルツハイマー病治療薬の作用点は明らかにされていなかった。

(3) アルツハイマー病の脳における神経細胞死については、老人斑の主成分である Amyloid- β ペプチド(A β)に加えて、神経原線維変化の原因である微小管結合タンパク質タウの過剰なリン酸化が関与することが知られている⁸。A β とタウが同定されてから数十年の間、AD の治療法の開発は主に A β に焦点が当てられてきたが、近年、タウが注目されてきている。タウ病変は A β 病変よりも認知障害との相関が高いことから、臨床症状が明らかになれば、タウの標的化は A β クリアランスよりも効果的であると期待されている。今後の診断法の改善により、タウを予防的な標的とすることも考えられる⁹。

タウは微小管細胞骨格の安定性を制御しており、これには GSK-3 によるタウリン酸化の制御が重要であると報告されている¹⁰。実際に、タウ過剰リン酸化により誘発される細胞死を GSK-3 の機能阻害により抑制することが知られている¹¹。GSK-3 についてはさらに、遺伝子発現、細胞内輸送、代謝や Caspase などの制御を介して細胞生存の様々な側面に関与することが考えられるが、アルツハイマー病治療薬の作用とタウリン酸化の制御との関係については、不明な点が多い。また、神経原線維変化の危険因子として麻酔が示唆されており¹²、麻酔においては、投与により低体温が誘発されると報告されている¹³。近年、タウのリン酸化は低温負荷により誘発されることが報告されている¹⁴。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルツハイマー病治療薬の神経保護作用の作用点と作用機序を明らかにすることにより、アルツハイマー病治療薬の開発につながる基礎的情報を得ることである。アルツハイマー病治療薬の神経保護作用については、nAChR により活性化される PI3K-Akt-GSK-3 経路が重要であることが、主に申請者らの研究から明らかになっているが、その下流で神経保護作用がどのように発現するのか明らかになっていない。本研究では、アルツハイマー病治療薬の神経保護作用の作用点が GSK-3 下流因子候補のタウリン酸化の制御である可能性を検討し、そこに至る作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 5週齢 ICR 系雄性マウス(体重 29-36 g)に、三種混合麻酔薬 (0.3 mg/kg medetomidine, 4.0 mg/kg midazolam, 5.0 mg/kg butorphanol) を腹腔内投与し、低体温 (直腸温 28) を誘発後、経心灌流および大脳皮質の採取を行った。ドネベジル (0.01-1.0 mg/kg) の経口投与は、大脳採取の 24 時間前に行った。採取した脳組織に buffer を加えてホモジナイズ、変性処理、遠心を行い、上清を得た。上清と Sample buffer を等量混合し、サンプルを調製した。

(2) 胎生 17-19 日齢の Wistar 系ラット胎仔より大脳皮質を摘出・単離し、0.1% ポリエチレングリセリンでコーティングしたプレートに大脳皮質細胞を播種し細胞培養を行った。細胞は 37 、5% CO₂ 環境下で培養した。培養 1-7 日目は 10% ウシ胎仔血清を、8 日目以降は 10% ウマ血清を添加したイーグル MEM 培地を用いた。培養 6 日目よりアラビノシトシンを処置し、非神経細胞の増殖を抑えた。実験には培養 10 日目以降の成熟した細胞を用いた。30 、5% CO₂ 環境下で 4 時間培養することにより低温負荷処置を行った。ドネベジル (10 μ M) は低温負荷の 24 時間前に処置した。培養した細胞を lysis buffer で可溶化し、タンパク質濃度を一定にした後に変性処理を行った。

リン酸化タウおよび全タウの発現量は Western Blotting 法により解析を行った。SDS-PAGE によりタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した後にブロッキングを行い、一次抗体(AT8、AT180、

PHF-1、Total Tau)、および二次抗体(マウス由来 HRP)と反応させた。検出には ECL system、定量には Image J を用いた。データは統計処理を行った。データはすべて平均値±標準誤差で表した。統計学的な有意差は、一元配置分散分析後の Tukey's test により評価した。すべての実験において危険率 5%未満の場合に統計学的に有意な差があると判定した。

4. 研究成果

(1) *In vivo* において、低体温モデルマウスを作製するため、三種混合麻酔薬を投与し、マウスに対する作用を確認した。マウスに三種混合麻酔薬を腹腔内投与した結果、control 投与群と比較して、麻酔薬投与群では、投与 10 分後から体温の低下が見られ、投与 30 分後に直腸温が 28°C となり、低体温の誘発が確認された。

低体温処置を施したマウスの大脳皮質ホモジネートを用いてタウのリン酸化量を検討した。タウのリン酸化部位として、Ser202、Thr205、Thr231、Ser396、Ser404 はアルツハイマー病患者の剖検脳において高度にリン酸化されている。本研究ではタウリン酸化抗体として Ser202、Thr205 を認識する AT8、Thr231 を認識する AT180、および Ser396、Ser404 を認識する PHF1 を用いた。

三種混合麻酔薬の投与によって低体温を誘発したマウス大脳皮質において、リン酸化抗体(AT8、AT180、PHF1)で認識されるタウのリン酸化が惹起された。

低体温誘発の 24 時間前から 1.0 mg/kg ドネペジルを経口投与したところ、いずれのリン酸化部位を認識する抗体での検出においても、タウのリン酸化の増加が抑制された。ドネペジルの用量を 0.01 mg/kg から 1.0 mg/kg まで変化させて投与したところ、低体温により惹起されるタウのリン酸化が濃度依存的に抑制された。

(2) *In vitro* において、初代培養大脳皮質細胞に低温負荷処置を行うことによるタウのリン酸化への作用を確認した。初代培養大脳皮質細胞に 30、4 時間低温負荷処置を行うことにより、マウス脳内と同じ部位(Ser202、Thr205 を認識する AT8、Thr231 を認識する AT180、および Ser396、Ser404 を認識する PHF1)のタウのリン酸化が惹起された。

低温負荷処置の 24 時間前から 10 μM ドネペジルを処置したところ、いずれのリン酸化部位を認識する抗体(AT8、AT180、PHF1)での検出においても、ドネペジルの前処置によりタウのリン酸化の増加が抑制された。

これらの結果から、マウス脳組織(*in vivo*)およびラット胎仔由来初代培養大脳皮質細胞(*in vitro*)のいずれにおいても、低温負荷処置条件下では、タウのリン酸化が惹起されることが明らかになった。さらに、アルツハイマー病治療薬であるドネペジルは低温負荷処置によって惹起されるタウのリン酸化を抑制することが示唆された。

本研究で構築したリン酸化タウの評価系は、臨床応用されているアルツハイマー病治療薬の作用機序の詳細な解析に資するものであると考えられる。

アルツハイマー病の根本治療薬は未だ開発されていないが、アルツハイマー病の進行を抑制する疾患修飾薬として、リン酸化タウを標的とした新たな作用点を持つアルツハイマー病治療薬の開発のための研究も今後進んでいくと予想される¹⁵。アルツハイマー病治療薬のタウのリン酸化抑制機構を明らかにした本研究成果は、既存のアルツハイマー病治療薬の作用機序を明らかにするとともに、新規アルツハイマー病治療薬の開発において有用な基礎的資料を提供するものであると考えられる。

<引用文献>

1. <https://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/16/index.html>
2. Sugimoto H., *Chem. Rec.* 1, 63-73 (2001)
3. Wilkinson D.G., et al., *Drugs and Aging* 21, 453-487 (2004)
4. Takada Y., et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 772-777(2003)
5. Takada-Takatori Y., et al., *Neuropharmacology* 51, 474-486 (2006)
6. Takada-Takatori Y., et al., *J. Neurosci. Res.* 86, 3575-3583 (2008)
7. Takada-Takatori Y., et al., The 89th Annual meeting of the Japanese Pharmacological Society (2016)
8. Takashima A., et al., *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 90, 7789-7793 (1993)
9. Congdon E.E. et al., *Nat Rev Neurol.*, 14, 399-415 (2018)
10. Pei J.J. et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1010-1019 (1999)
11. Alvarez G. et al., *Bipolar Disorders* 4, 153-165 (2002)
12. Whittington R.A. et al., *Curr Alzheimer Res.*, 7, 717-25 (2010)
13. Carrettiero D.C. et al., *Temperature.*, 4, 491-498 (2015)
14. Bretteville A. et al., *Sci Rep.*, 2, 480 (2012)
15. VandeVrede L. et al., *Neurosci. Lett.*, 731 134919 (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高島 小波, 高島 悠記, 高良 香葉子, 野々口 茉奈, 庄野 七海子, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 宮坂 知宏, 久米 利明, 土田 勝晴
2. 発表標題 アルツハイマー病治療薬による過剰タウリン酸化抑制作用
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高良 香葉子, 高島 悠記, 高島 小波, 中西 涼介, 泉 安彦, 赤池 昭紀, 宮坂 知宏, 久米 利明, 土田 勝晴
2. 発表標題 低温負荷による脳内タウの過剰リン酸化に対するドネペジルの作用
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryosuke Nakanishi, Yuki Takada-Takatori, Kayoko Takara, Konami Takashima, Katsuharu Tsuchida, Yasuhiko Izumi, Akinori Akaike, Tomohiro Miyasaka, Toshiaki Kume
2. 発表標題 Donepezil decreases tau hyperphosphorylation induced by hypothermia in vivo and in vitro
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高鳥 悠記(タカトリ ユキ) | 研究者情報 同志社女子大学研究者データベース
http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2723/2723_Researcher.html

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
研究分担者	久米 利明 (Kume Toshiaki) (10303843)	富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授 (13201)	
研究分担者	宮坂 知宏 (Miyasaka Tomohiro) (90342857)	同志社大学・生命医科学部・准教授 (34310)	