

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07847

研究課題名(和文)Rifampicinのドラッグリポジショニングによる認知症の進行抑制

研究課題名(英文)Prevention of progressive dementia by drug-repositioning of rifampicin

研究代表者

梅田 知宙 (Umeda, Tomohiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号：70549790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タウ伝播はアルツハイマー病(AD)の疾患進行の根底機序である。近年この伝播にタウオリゴマーが寄与することが示された。我々は経鼻リファンピシン(RFP)投与の抗タウオリゴマー薬効を報告してきた。本研究では新しいモデルマウスにおいて、タウ伝播に対する経鼻RFPの効果調べた。野生型ヒトタウを発現し病理はないTau264マウスを用いて、片側海馬にAD患者脳から抽出したタウオリゴマー画分を注入した。RFP投与開始し6ヶ月後の病理と認知機能を評価した。その結果、タウ病理およびその他関連病理が両側性に拡大し、認知機能にも有意な低下が見られた。経鼻RFPはこれら病理の拡大を阻止し、認知機能を正常に維持した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経鼻rifampicinはtau病理伝播を抑制することで、脳内変性領域の拡大と記憶障害を阻止した。経鼻rifampicinが、病理形成前での予防的効果だけでなく、疾患発症後の進行をも抑止できる可能性が示された。Drug repositioningによる効果的かつready-to-useな認知症予防薬・治療薬となりえる。

研究成果の概要(英文)：Tau propagation is a mechanism underlying the intracerebral spreading of tau pathology in Alzheimer's disease (AD). Recent studies suggest that tau oligomers participate in this process. We have showed that intranasal rifampicin (RFPi.n.) inhibits tau oligomer accumulation in mice. In this study, we examined the effects of RFPi.n. on tau propagation in a new mouse model. A tau oligomer-rich frc. prepared from the brain of an AD patient was injected into a unilateral hippocampus of Tau264 mice that express both 3R- and 4R-WT human tau. RFPi.n. was started 1 week after the injection and performed 3 times a week for 24 weeks. Cognitive function and tau pathology were assessed by the Morris water maze test and IHC. RFPi.n. inhibited the spreading of tau oligomers and neurofibrillary tangle formation. Synapse and neuronal loss were also prevented, and cognitive function remained normal. The results suggest that RFPi.n. could be a promising remedy that halts the progression of tauopathy.

研究分野：神経変性疾患

キーワード：神経変性疾患 認知症 タウ 予防薬・治療薬 リファンピシン 神経病理伝播

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) は認知症を呈する進行性の神経変性疾患で、原因分子として amyloid (A ; 老人斑の構成成分、分泌タンパク質) と tau (神経原線維変化の構成分子、細胞質タンパク質) の2分子が同定されている。これまで AD 治療戦略として多くの A 標的薬が開発されたが、実際の患者を対象とした臨床試験では効果がみられなかった。これらの失敗から現在では、より早期の投薬が必要であると考えられ、AD に対する医療戦略は「治療」から「予防」へとシフトした。しかしそれではすでに発症した患者には従来の症候対処療法しか選択肢がない。本研究課題では、すでに発症している AD の「進行を抑制」できる薬剤の開発を行う。AD の進行機序については、近年、A の毒性凝集体「オリゴマー」がもうひとつの病因分子 tau の凝集を誘導し、そうして形成された tau 病理が次々に隣接する細胞間を伝播することで変性領域が拡大し、疾患が重篤化することが明らかとなった。AD の進行抑制には、A と tau の病理形成を同時に抑制することが必要である。申請者は以前、既存医薬品 rifampicin に、認知症における様々な原因分子種 (A , tau, α -synuclein) のオリゴマーをすべて同時に減少させる作用を見出している (Umeda et al., 2016, 2018)。今回この rifampicin が発症後の tau 病理伝播を抑制可能であることを示したい。

2. 研究の目的

認知症の大部分を占める AD、前頭側頭葉変性症、PART (primary age-related tauopathy; 加齢性認知症) といった神経変性疾患は、病理タンパク質 tau が神経細胞内に凝集・蓄積することで神経細胞が脱落し、発症する "tauopathy" である。これらの疾患は加齢とともに発症リスクが高まり、発症後は経時的に進行し重篤化するが、根本的治療法が存在しないためこの進行を抑制することはできない。近年、この疾患進行のメカニズムとして、隣接する神経細胞間を tau 凝集体が飛び移るように伝播し、脳内で tau 病理と変性部位を拡大する "tau 病理の伝播" という現象が明らかとなった。これまでの AD 治療薬の開発研究では、tau 凝集の引き金となる A が標的とされてきたが、それら候補薬は実際の患者で A を減少させつつも記憶障害の重篤化を止めることはできなかった。現在ではこの理由のひとつとして、「すでに引き金を引かれた tau 病理は伝播によって病理・変性部位の拡大を進めており、その時点で A を取り除いても進行は抑制できない」と考えられるようになった。そこで現在では、認知症への医療介入は予防的であることが重要と考えられ、抗認知症薬の開発も「治療」から「予防」へとシフトしている。しかしそれでは、すでに発症した患者には従来の症候対処療法しか選択肢がなく、「発症後の進行の抑制」は「予防」とともに依然として喫緊の課題である。

申請者はこれまでに、既存医薬品 rifampicin に A の毒性凝集体オリゴマーを低下させる薬効が存在することを見出し、予防薬として大変期待できることを報告してきた (Umeda et al., 2016)。さらにこの際、rifampicin は A 以外の tau や α -synuclein (レビー小体型認知症、parkinson 病の原因分子) といった amyloidogenic なタンパク質に対してもオリゴマー化を抑制できることを発見した。この知見は、rifampicin が、単剤で A と tau のオリゴマー凝集を同時に抑制可能である、つまり AD 患者脳内で A の毒性を防ぎつつ tau 伝播をも抑制しうる可能性を示唆している。本研究課題では、rifampicin が tau 病理伝播を抑制することで認知機能の低下を抑制可能であることを、tau 伝播細胞モデルおよびマウスモデルを用いて明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) Tau 伝播モデルマウスの作製と、rifampicin 投与による記憶障害抑制効果の検証

Tau 伝播 in vivo モデルには、申請者自身の作製したヒト野生型 tau 遺伝子導入モデル Tau264 マウスを用いる (Umeda et al., 2013)。Tau264 マウスの発現するヒト tau は変異を持たず、ヒトでの alternative splicing によるアイソフォーム発現バランスを忠実に実現しており、そのままでは神経病理を示さず、認知機能も正常である。8 か月齢 Tau264 マウスの左脳海馬に一側性に、AD 患者脳抽出液 (図 1) を注入する。このモデルでは、施術後すぐに注入部位局所にて tau 凝集体が海馬神経細胞に取り込まれ、その後 tau 病理の伝播が生じ 6 ヶ月後には右脳にまで tau 病理が到達し、認知機能障害を呈することをすでに確認済みである。

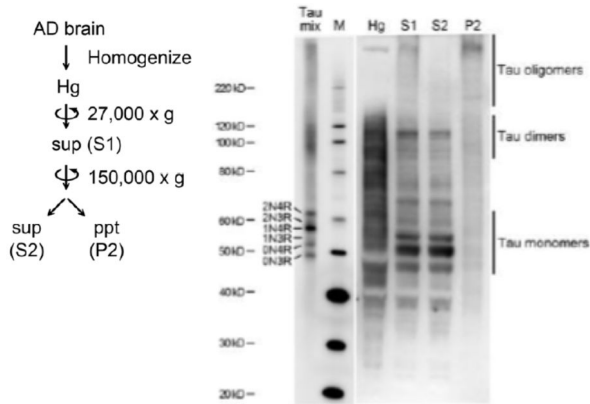


図1. AD患者脳抽出液の作製
左図で示すように分画を行い、それぞれの画分の有するタウの形態をWBで確認した(右図)。もっともtauオリゴマーを豊富に有する画分P2を注入に用いた。

(2) 経鼻 rifampicin 投与

本研究課題では、注入および局所的な凝集 tau の取り込みの後(施術より1週間後)より rifampicin の投与 (0.1 mg 投与 x3times/week)を開始し、6か月間行う。投与期間が長期にわたるため、投与方法は、副作用による肝障害を回避でき、低用量でも脳内移行率が高い鼻腔内投与にて行う (Umeda et al., 2018)。具体的な実験マウスの群分けを以下に示す。

- Tau264 マウス + AD 脳抽出液注入 + rifampicin
- Tau264 マウス + AD 脳抽出液注入 + CMC (経鼻投与用溶媒)
- Tau264 マウス + 人口脳脊髄液 (sham operation) + CMC
- Non-Tg マウス + 人口脳脊髄液 + CMC

(3) 経鼻 rifampicin による認知機能保護効果の検証

注入から6か月後、認知機能をモリス水迷路試験によって評価し、各郡で比較する。4日間の獲得試験で学習能力を評価した後、5日目にプローブ試験にて記憶強度についても検証する。

(4) 経鼻 rifampicin による神経病理拡大の抑制効果の検証

行動試験後のマウス脳を採取し、脳切片、生化学サンプルを作製し、以下の評価項目について病理解析を行い、各郡で比較する。

Tau 病理

リン酸化 tau : リン酸化 tau 抗体 AT8 を用いた IHC

Tau オリゴマー : オリゴマー特異抗体 TOMA-1 を用いた IHC, および tau 抗体での WB

神経原線維変化 : 特異的検出法である Gallyas silver 染色、およびアイソフォーム特異抗体を用いた構成/局在アイソフォーム解析

シナプス消失 : シナプス特異マーカー-synaptophysin 抗体を用いた IHC

神経変性 : 成熟神経細胞マーカー-NeuN 抗体を用いた IHC

炎症 : ミクログリアマーカー-Iba1 抗体を用いた IHC

4. 研究成果

Tau 病理の脳内領域拡大と、それに対する経鼻 rifampicin の効果について検証を行った。

図2に注入直後3日目の tau 病理を示す。注入部位局所に海馬神経に取り込まれたリン酸化 tau と tau oligomers を認めた。

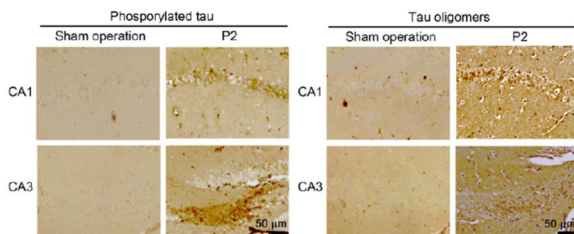


図2. P2注入3日後のtau病理
注入部位局所の海馬神経細胞に取り込まれたリン酸化tau(左)とtau oligomers(右)。

次に、施術6ヶ月後のtau病理について調べた。その結果、脳内各領域において両側にリン酸化 tau および tau oligomers の蓄積が認められ、tau oligomer の注入によって tau 病理伝播が誘導されることが示された(図3)。そしてこの tau 病理伝播は経鼻 rifampicin によって抑制された。

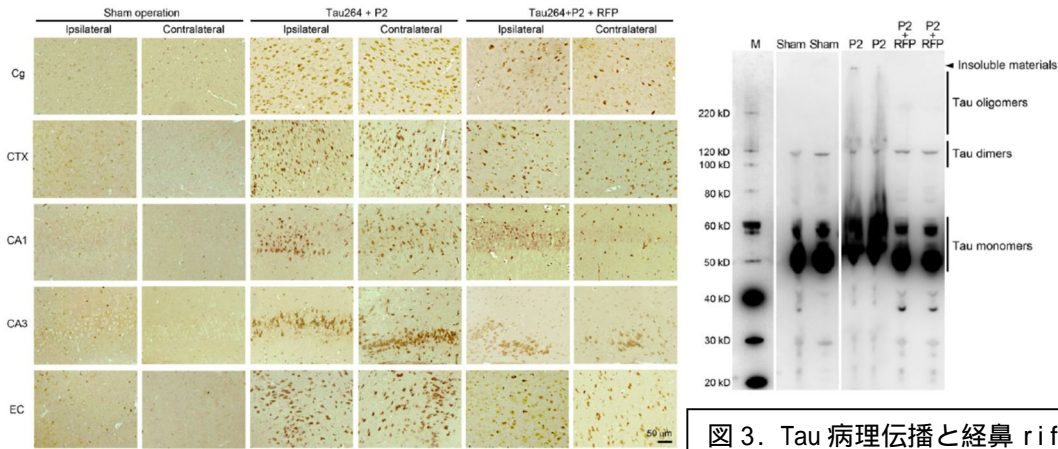


図3. Tau 病理伝播と経鼻 rifampicin
 左図)リン酸化 tau (上段)と tau oligomers (下段)の蓄積が脳内各領域において両側性に見られた。
 右図) Tau 伝播モデル(P2)に見られる tau oligomers が、経鼻 rifampicin により抑制されている (P2+RFP)。

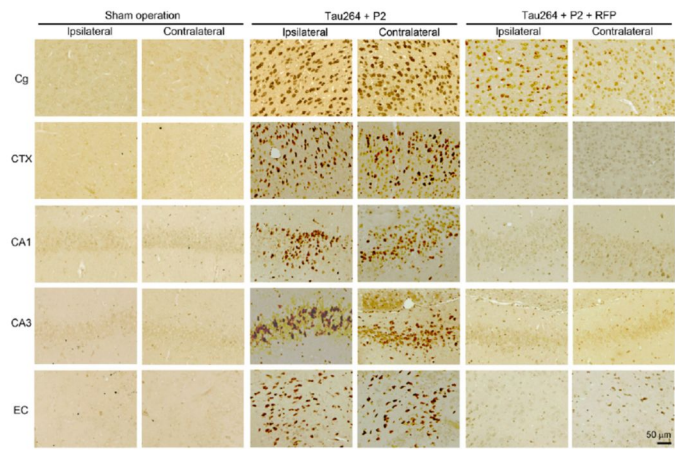


図4. NFT 形成と経鼻 rifampicin
 上図) Gallyas 銀染色による NFTs の検出。
 下図) Tau isoform 特異抗体を用いた NFT 構成 tau isoforms の解析。

古典的 tau 病理として知られる神経原線維変化 (neurofibrillary tangles; NFTs)の形成に対する P2 注入および rifampicin 経鼻投与の効果についても検証を行った。NFT 特異的検出法である Gallyas 銀染色によって NFT 形成の評価を行った (図 4)。その結果、P2 注入により、同側および反対側の嗅内皮質において NFTs が多数観察された。これら NFTs は tau isoforms の 3R-tau と 4R-tau の両方から構成されており、AD 型の tau 病理であることも確認された。このような NFT 形成は non-Tg や sham operation 群では見られず、P2 の含有する tau oligomers をシードとして誘導された tau 病理の伝播であることが示された。そしてこれら NFT 形成は、経鼻 rifampicin によって抑制された。

次に、海馬でのシナプス消失、神経変性、ミクログリア活性化についても検証を行った (図 5)。これらの変性性、炎症性の病理が、P2 注入部位同側および反対側の両領域に見られ、tau 病理と同様に脳内で拡大していることが示された。これらの病理変化に対しても、経鼻 rifampicin による抑制効果が観察された。

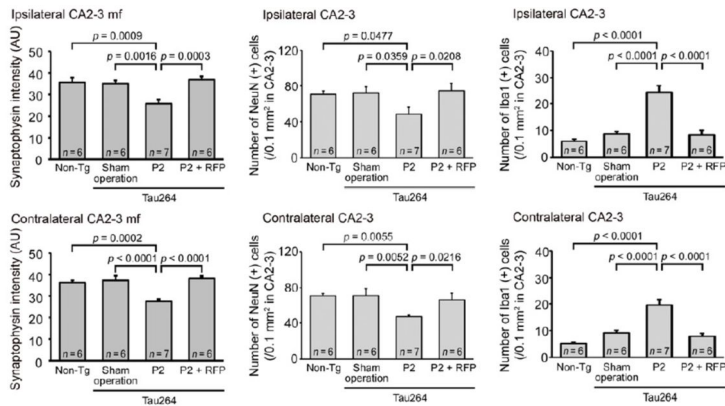


図 5. シナプス消失、神経変性、ミクログリア活性化
 左) Synaptophysin 染色によるシナプス密度の定量化グラフ
 中) NeuN 染色による神経細胞数の定量化グラフ
 右) Iba1 染色によるミクログ

最後に認知機能について評価をおこなった(図 6)。その結果、Tau 伝播モデルマウス(P2 群)で空間参照記憶に障害が見られた。Sham operation マウスでは non-Tg マウスと同程度の学習が見られることから、ここで誘導された記憶障害が、tau 病理とそれにとまう変性領域の拡大によるものであることが示された。獲得試験で見られた P2 群の学習の低下は、経鼻 rifampicin(P2+RFP 群)によって sham operation マウスと同程度にまで維持されていた(図 6A)。プローブ試験でも P2 群での記憶強度の低下が見られたが、これも P2+RFP 群では見られなかった(図 6B)。P2 注入に誘導される認知機能障害に対する経鼻 rifampicin の予防効果が示された。

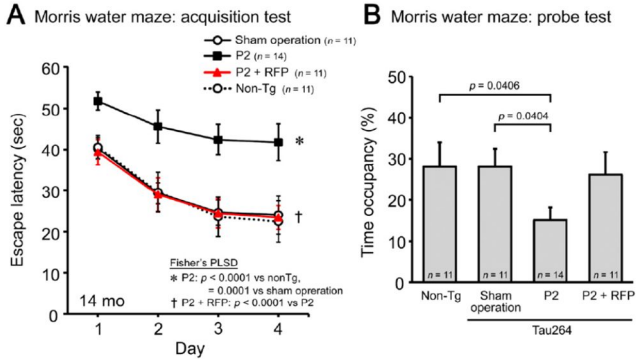


図 6. 認知機能試験
 A) 4 日間の獲得試験による学習能の評価
 B) プローブ試験による記憶強度の評価

本研究では、我々自身が作製した Tau264 マウスを用いた。このマウスは野生型ヒト tau の 3R/4R 両 isoroms を発現するが、それ単独では tau 病理を示さない。この Tau264 マウスの片側海馬に、AD 脳から抽出した tau oligomers に富む画分 P2 を注入し、tau 病理伝播モデルマウスを作製した。その結果誘導された tau 病理 NFTs は、ヒトにおける AD と同じく 3R-tau と 4R-tau の両 isoforms によって構成されていた。Tauopathy には AD 以外にもピック病、進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD)、PART (primary age-related tauopathy) といった疾患があり、それらの原因となる tau 病理を構成する tau isoform は疾患ごとに異なる。既報の tau 病理伝播モデルでは、主に 4R-tau のみを発現するモデルマウスが使用されており(Clavaguera et al., 2009; de Calignon et al., 2012; Iba et al., 2013; Ahmed et al., 2014)、これらは 4R-tau のみを tau 病理として蓄積する tauopathy、すなわち CBD、PSP のモデルに近いと言える。我々の今回のモデルは、これら既報の tau 病理伝播モデルよりもさらにヒト AD に近いモデルとなった。さらに、既報のモデルでも報告されてきた神経病理に加えて、我々のモデルでは認知機能障害まで観察された。これも、P2 注入 Tau264 マウスが、認知機能に主たる症状を示す AD により近いモデルであることに起因するのかもしれない。我々のモデルによって、tau 病理の伝播が、実際の疾患における認知機能の低下を誘導しえることが示唆された。これは AD における初期の認知機能障害が tau 病理の拡大と一致する、というこれまでの報告に一致する (Takeda, 2019)。経鼻 rifampicin は、tau 病理伝播を抑制することで、このモデルに見られる認知機能障害も予防した。このことから経鼻 rifampicin は、病理形成前での予防的効果だけでなく、疾患発症後の進行をも抑止できる可能性が示された。また、予防を目的とした投薬の場合、長期投与が前提となり、ワクチンにおける副作用の危険性や、受動免疫における金銭面での負担は、大きな問題となるが、既存医薬品である rifampicin は副作用についての知見も豊富である。この知見から我々は、鼻腔内への投与方法で肝臓での初回通過効果の回避を実現し (Umeda et al., 2018)、またレスベラトロールとの合剤化によって肝保護作用と神経保護作用の獲得にも成功し (Umeda et al., 2021)、副作用の危険性を特段に回避している。さらに rifampicin は薬価も大変安価であり、drug repositioning による効果的かつ ready-to-use な予防薬・治療薬となりえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umeda Tomohiro, Uekado Rumi, Shigemori Keiko, Eguchi Hiroshi, Tomiyama Takami	4. 巻 10
2. 論文標題 Nasal Rifampicin Halts the Progression of Tauopathy by Inhibiting Tau Oligomer Propagation in Alzheimer Brain Extract-Injected Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 297 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines10020297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梅田知宙, 上門瑠美, 重森慶子, 江口広志, 富山貴美
2. 発表標題 経鼻リファンピシンによるタウオリゴマー伝播阻害と疾患進行抑制
3. 学会等名 第41回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------