

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860069

研究課題名(和文)アルツハイマー病治療薬によるタウリン酸化抑制と新規神経保護作用機序の解析

研究課題名(英文)A novel mechanism through regulation of tau phosphorylation and neuroprotective effect by drugs for the treatment of Alzheimer's disease

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病治療薬として汎用されているドネペジルは、グルタミン酸誘発神経細胞死に対して保護作用を発現し、その神経保護作用には、ニコチン性アセチルコリン受容体により活性化されるPhosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)-Akt経路が関与している。培養大脳皮質細胞において、ドネペジルの神経保護作用機序の一部に、PI3K-Akt経路を介したGSK-3の活性抑制が関与すること、またGSK-3活性抑制の下流シグナルとしては、Bcl-2の発現上昇ではなく、 β -cateninの発現上昇や部位特異的なtauリン酸化が関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Donepezil is widely used as a therapeutic drug for Alzheimer's disease. It prevents cortical neurons against glutamate neurotoxicity through nicotinic acetylcholine receptors, followed by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt pathway. In cortical cultures, donepezil inhibited the activation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) through the PI3K-Akt pathway. Furthermore, downstream signaling of inhibition of GSK-3 activity involved the expression level of β -catenin and site-specific tau phosphorylation, rather than the expression level of Bcl-2.

研究分野：医歯薬学

キーワード：アルツハイマー病 ニューロン 神経保護作用

1. 研究開始当初の背景

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。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。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. 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、新たな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。既存のアルツハイマー病治療薬の神経保護作用については、ニコチン性アセチルコリン受容体により活性化される Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt 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、Akt 下流因子候補の Glycogen synthase kinase-3 に注目して、アルツハイマー病治療薬の神経保護作用の作用点が Tau リン酸化の制御、遺伝子発現の制御、Caspase 切断抑制、NMDA 受容体の発現制御などである可能性を検討し、そこにいたる作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

胎生 17-19 日齢ラット胎仔より大脳皮質を摘出・単離し、培養 7 日目までは 10% FBS、培養 8 日目からは 10% HS を含む Eagle's 培地により培養した。実験には培養 10-12 日目の成熟した細胞を用いた。神経細胞死の評価は Lactate dehydrogenase (LDH) release assay によ

り評価した。タンパクの発現変化およびリン酸化は Western blotting 法を用い、検出には ECL system を用い、定量は ImageJ を用いて行った。

4. 研究成果

培養大脳皮質細胞において、ドネペジル処置は GSK-3 β の 9 位のセリン残基のリン酸化を亢進し、そのリン酸化は PI3K の阻害薬をドネペジルと同時処置することにより抑制された。グルタミン酸処置により惹起される GSK-3 β の 216 位のチロシン残基のリン酸化は、ドネペジルを処置することで抑制された。GSK-3 β 阻害薬は濃度依存的にグルタミン酸誘発神経細胞死に対して保護作用を示した。Bcl-2 の発現量は、ドネペジル処置により上昇した。一方、GSK-3 β 阻害薬処置では変化しなかった。 β -catenin は、ドネペジルおよび GSK-3 β 阻害薬のいずれの処置においても発現が上昇した。以上の結果より、ドネペジルの神経保護作用機序の一部に、PI3K-Akt 経路を介した GSK-3 β の活性抑制が関与すること、また GSK-3 β 活性抑制の下流シグナルとしては、Bcl-2 の発現上昇ではなく、 β -catenin の発現上昇が関与することが示唆された。

Tau の脱リン酸化酵素の阻害剤である okadaic acid 処置により、処置時間依存的かつ濃度依存的な神経細胞死および tau リン酸化の上昇が見られた。神経細胞死が抑制された条件下でドネペジルを 24 時間前処置したところ、部位特異的に tau リン酸化の抑制傾向が見られた。以上の結果より、ドネペジルの神経保護作用機序の一部に、GSK-3 β 活性抑制の下流シグナルとして、部位特異的な tau リン酸化が関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. "Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death."

Toxicol Sci., 139(2), 466-478 (2014)

DOI: 10.1093/toxsci/kfu054.

Nazari QA, Takada-Takatori Y, Hashimoto T, Imaizumi A, Izumi Y, Akaike A, Kume T.

“Potential protective effect of highly bioavailable curcumin on an oxidative stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice brain.”
Food Funct., 5(5), 984-989 (2014)
DOI: 10.1039/c4fo00009a.

Wakita S, Izumi Y, Nakai T, Adachi K, Takada-Takatori Y, Kume T, Akaike A. “Staurosporine induces dopaminergic neurite outgrowth through AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway.”
Neuropharmacology, 77, 39-48 (2014)
DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.09.012.

Irooi T, Taguchi K, Izumi Y, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. “Protective effect of serofendic acid, administered intravenously, on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.”
Brain Res., 1532, 99-105 (2013)
DOI: 10.1016/j.brainres.2013.08.013.

Nazari QA, Kume T, Izuo N, Takada-Takatori Y, Imaizumi A, Hashimoto T, Izumi Y, Akaike A. “Neuroprotective effects of curcumin and highly bioavailable curcumin on oxidative stress induced by sodium nitroprusside in rat striatal cell culture.”
Biol Pharm Bull., 36(8), 1356-1362 (2013)
DOI: 10.1248/bpb.b13-00300

Nazari QA, Kume T, Takada-Takatori Y, Izumi Y, Akaike A. “Protective effect of luteolin on an oxidative-stress model induced by microinjection of sodium nitroprusside in mice.”
J Pharmacol Sci., 122(2), 109-117 (2013)
DOI: 10.1254/jphs.13019FP

〔学会発表〕(計6件)

1. 牧谷洗希、高鳥悠記、南奈央子、河本啓、泉安彦、赤池昭紀、久米利明
ニューロンにおけるドネペジルの glycogen synthase kinase-3 β 活性抑制作用
日本薬学会第134年会 熊本市総合体育館 (熊本県・熊本市) 2014年3月28日
2. Naoko Minami, Yuki Takada-Takatori, Yasuhiko Izumi, Akinori Akaike, Toshiaki Kume

Neuroprotective effect of tropisetron other than through $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor
第7回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 東北大学片平キャンパス さくらホール (宮城県・仙台市) 2013年11月23日

3. 高鳥悠記、武政翔大、上里彩夏、藤井健志、田口和哉、泉安彦、赤池昭紀、久米利明、青ジソ由来 DDC による培養ヒト表皮細胞の酸化ストレスへの細胞保護作用
第124回日本薬理学会近畿部会 京都ガーデンパレス (京都府・京都市) 2013年11月1日
4. 上里彩夏、高鳥悠記、武政翔大、泉安彦、赤池昭紀、久米利明、藤井健志
青ジソ由来 Nrf2-ARE 経路活性化物質のヒト表皮細胞への酸化ストレスに対する保護作用
第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 同志社女子大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市) 2013年10月12日
5. 角野有紀、堀口和秀、三澤日出巳、森脇康博、高鳥悠記、川島紘一郎、藤井健志
内在性 $\alpha 7$ ニコチン受容体アロステリックリガンド SLURP-1 の免疫器官における発現とリンパ球コリン作動系活性の調節
第63回日本薬学会近畿支部総会・大会 同志社女子大学京田辺キャンパス (京都府・京田辺市) 2013年10月12日
6. 武政翔大、上里彩夏、高鳥悠記、藤井健志、田口和哉、泉安彦、赤池昭紀、久米利明
培養ヒト表皮細胞における参加ストレスに対する DDC の保護作用
次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2013 熊本大学薬学部キャンパス (熊本県・熊本市) 2013年8月31日

〔図書〕(計1件)

高鳥悠記、赤池昭紀
「第56章 結核、Mycobacterium avium complex 感染症およびハンセン病の化学療法薬」
グッドマン・ギルマン薬理書 第12版(廣川書店) 2005-2035 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2723/2723_Researcher.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高鳥 悠記 (YUKI TAKADA-TAKATORI)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：90411090