

平成 27 年度 委託研究開発成果報告書【公開版】

1. 研究開発課題名と研究開発代表者名

事業名	脳科学研究戦略推進プログラム	
研究開発課題名	抗タウオパチー薬の創出	
機関名	学校法人同志社	
研究開発 担当者	所属 役職	同志社大学研究開発推進機構 神経疾患研究センター 客員教授
	氏名	井原 康夫

2. 研究開発成果の内容

① 2つのリード化合物をもとにした抗タウオパチー創薬

(1) モデル線虫での Y 効果判定

新たに 10 化合物の提供を受ける予定であったが、研究開発項目③、④、⑤、⑥におけるタウ凝集阻害剤の開発を最大限優先させるため、新たな Y の合成は行なわなかった。これにより、P S、P O との相談の結果、Y のさらなるスクリーニングは中止することとし、これまでの Y の開発結果を論文として報告することとした。しかし、これまでの解析から、タウの凝集とは異なるステップを標的とした抗タウオパチーリード化合物として CU663、さらに高い有効性が期待できる化合物として KT-173, KT231, KT-232 を同定した。

②タウオパチー神経変性機能障害機構の解明

(1) Y の作用機序の解明

Y による微小管安定化の機能的解析を目的とし、線虫モデルを用いた軸索輸送解析を行なった。解析可能な Unc104-RFP / Is388 (non-tau-Tg)、Unc104-RFP / Is390 (wild type-tau-Tg)、Unc104-RFP / Is226 (R406W-tau-Tg) について神経機能障害の程度を touch assay にて評価し、さらに共焦点顕微鏡を用いた in vivo 軸索輸送解析を行なった。その結果、変異タウの発現、野生型タウの発現により接触応答反応である touch sensitivity の低下が認められた。同時に対象となる線虫について、軸索輸送解析をおこなった。その結果、control である Unc104-RFP / Is388 にくらべ、Unc104-RFP / Is226 及び Unc104-RFP / Is390 における軸索輸送速度はいずれも有意に低下していた。これより、タウの発現により線虫神経細胞において機能異常とともに軸索輸送に障害がおこることが確認された。Y および CU663 の軸索輸送障害への効果について検証する予定であったが、タウの発現による軸索輸送障害の確証が得られるまでに期間の大半を費やした事、③、④、⑤、⑥におけるタウ凝集阻害剤の開発を最大限優先させことにより、Y および CU663 の軸索輸送障害への効果については中止することとした。

また、タウオパチー線虫より発現するタウを精製し、微小管との結合について解析した。その結果、タウオパチー発現線虫より精製したタウでは微小管結合能は消失しており、この微小管結合能は脱リン酸化により回復した。これより、タウオパチー線虫に発現するタウはリン酸化により微小管への作用を失っている事が分かった。これらの結果については Y の開発結果とともに論文として報告した。さらに Y および CU663 のタウ微小管結合への効果について検証する予定であったが、③、④、⑤、⑥にお

けるタウ凝集阻害剤の開発を最大限優先させことにより、P S、P O との相談の結果、Y および CU663 の軸索輸送障害への効果については中止することとした。

③バックアップ化合物の展開

平成26年度まで検討していた KT268, KT290 の誘導体について体内動態解析を行なった。しかし、これらの化合物については生体内における pH において物理的不安定に起因すると考えられる体内動態の難点が認められた。この問題について誘導体合成により回避できなかったことを踏まえ、新たなシード化合物の探索に着手した。その結果平成27年度において61検体を合成、タウ凝集阻害効果について評価した。合成展開を進めるにあたり、現行医薬品の代謝物であり且つこれまで同定した抗タウ凝集効果を発揮する部分構造を有するとともに、脳内移行性が報告されている KT363, 4-AP の2化合物をシード化合物とした。

選択したシード化合物に対しこれまでの知見に基づいた構造変換をおこない、得られた化合物の *in vitro* タウ凝集阻害効果について評価した。その結果、KT268, KT290 に匹敵するタウ凝集阻害活性を有する KT366 を見出した。さらに KT366 の安全性、安定性の向上を求め最適化研究を行った結果、極めて高いタウ凝集阻害活性を有する化合物として、KT401, KT417 を見出した。候補化合物の安全性試験として Ames 試験を行った。その結果、KT366 の誘導体である KT401, KT417 については陰性であることが確認された。これより KT366 及び KT268, KT290 誘導体で懸念された置換基による Ames 陽性の可能性と物理的要因による体内動態の悪さに対しては、drug design により改善可能であることが証明できた。KT366 誘導体は、平成28年3月に特許出願を実施（特願2016-54936）するとともに、平成26年度に中心化合物であった KT290 誘導体は、特許出願後の1年間の追加合成を終え、国際出願番号（PCT/JP2015/004985）として完結した。

タウ凝集阻害効果に優れ、安全性の期待できる候補化合物 KT401, KT417 について、マウスをもちいた単回投与安全性試験および体内動態試験を行なった。その結果、ともに100 mg/kg 経口投与で毒性は認められなかった。さらに、体内動態を調べた結果、KT401, KT417 ともに脳移行性が確認された。

以上より、薬理効果、安全性、体内動態の優れたバックアップ化合物として KT401, KT417 を提示した。また、L-DOPS の徐放剤開発については⑥に示すように中止とした。

④ L-DOPS のマウスモデルを用いた有効性の確認

平成26年度において Vehicle, L-DOPS 10 mg/kg, 100 mg/kg, methylene blue 10 mg/kg をそれぞれ3ヶ月間連続経口投与された P301L タウ Tg マウスより脳を摘出した。これら凍結保存した大脳皮質を用い、L-DOPS のタウ凝集阻害作用について生化学的解析を行なった。投与後採取された脳からサルコシル不溶性画分を調製し、抗タウ抗体を用いたウエスタンブロット法によるサルコシル不溶性タウの定量を行なった。その結果 vehicle 投与群に対し、L-DOPS 10 mg/kg 投与群、L-DOPS 100 mg/kg 投与群、および methylene blue 10 mg/kg 投与群で有意なサルコシル不溶性タウの減少は認められなかった。また、可溶性変異タウの発現量についても各群間で有意差は認められなかった。用いた P301L タウ Tg マウス脳におけるサルコシル不溶性タウの形成量は発現する変異型タウのうち0.01%程度であった。以上の結果から、P301L タウ Tg マウスにおいて L-DOPS および Methylene blue の *in vivo* におけるタウ凝集阻害効果は確認できなかった。

⑤L-DOPS の P301S-tau Tg マウスモデルを用いた有効性の確認

L-DOPS の in vivo 薬理作用解析を目的とし、Thy1 promoter P301S マウスを用いた L-DOPS の長期投与試験を行った。Thy1 promoter P301S マウスに、コントロール (vehicle)、L-DOPS 3用量 (0.4 mg/kg, 2 mg/kg, 10 mg/kg) および比較対象としてメチレンブルーの還元体である LMTX (10 mg/kg) をゾンデにより経口投与した。投与期間は 2.5 ヶ月齢から 5.5 ヶ月齢の 3 ヶ月間とし、投与期間中に行動解析として Claspingscoring, rotarod test を行なった。その結果 Claspingscoring、rotarod test のいずれにおいても各群間で差は認められなかった。投与後のマウスについて、脳を摘出し、タウの凝集に関する生化学的、組織学的解析を行なった。その結果、AT8 陽性のタウは全可溶性画分で投与群間に差は認められなかった。また、サルコシル不溶性画分における AT8 陽性タウについても同様に投与群間で有意な差は認められなかった。さらに、大脳皮質における AT8 陽性タウ病変形成細胞について定量化した結果、Vehicle 投与群、L-DOPS 0.4 mg/kg 投与群、L-DOPS 2 mg/kg 投与群、L-DOPS 10 mg/kg 投与群および LMTX 10 mg/kg 投与群において AT8 染色性における有意な差は認められなかった。以上より、Thy1 promoter P301S マウスに形成されるタウ病変、タウの凝集、および神経機能障害に対して L-DOPS および LMTX の有効性は認められなかった。

並行して、Thy1 promoter P301S マウスを用いてコントロール、L-DOPS 2用量 (0.5 mg/g, 1.5 mg/g in food) および比較対象として Isoproterenol (4.5 mg/g chow)の混餌長期投与を行なった。投与期間は 2.5 ヶ月齢から 5.5 ヶ月齢の 3 ヶ月間とした。投与期間中に Claspingscoring test および rotarod test を行い、投与後において経口投与群と同様に脳を摘出し、生化学的手法、免疫組織学的手法を用いてタウ病変の形成に対する L-DOPS の効果について評価した。Claspingscoring score について評価した結果、投与群間に有意な差は認められなかった。Rotarod test を行なった結果、4.5 ヶ月齢で L-DOPS 1.5 mg/g food および Isoproterenol 4.5 mg/g food で統計学的有意差は認められなかったものの、平均潜時の延長傾向が認められた。さらに 5 ヶ月齢における rotarod 解析の結果、やはり L-DOPS 1.5 mg/g food および Isoproterenol 4.5 mg/g food で平均潜時の延長傾向が認められ、コントロールと Isoproterenol 4.5 mg/g 投与群のあいだで統計学的有意差が認められた。生化学解析の結果、脳全可溶性画分、およびサルコシル不溶性画分における AT8 陽性タウ、HT7 陽性タウについて投与群間に差は認められなかった。免疫組織学的解析の結果、大脳皮質における AT8 陽性タウ病変形成細胞について定量化した結果、AT8 陽性細胞の形成に投与群間に有意差は認められなかった。同様に脳幹における AT8 陽性病変の形成について定量化したが、投与群間に有意な差は認められなかった。

さらに得られた組織について、AT8 抗体、抗チューブリン抗体を用いて染色し、超解像顕微鏡をもちいたタウ病変形成および L-DOPS のタウ凝集抑制効果について評価した。海馬における AT8 陽性細胞数について定量化した結果、投与群間に有意な差は認められなかった。さらに海馬 CA1 領域に生じるタウ凝集体形成錐体細胞と正常錐体細胞における樹状突起内の微小管の構造について明確な差は認められなかった。

⑥L-DOPS 徐放製剤化の検討

L-DOPS は持続製剤化の検討を行なう予定であり、被験物質である L-DOPS 原沫の大量合成の検討を行なった結果、外注先の試薬合成企業から必要量の L-DOPS の合成が不可能であるとの報告を受けた。これにより委託研究開発実施期間内に終了する見込みが無くなったため、11 月をもって L-DOPS 徐放製剤化の検討を中止とした。

⑦プロジェクトの総合的推進

平成27年度中に学校法人同志社同志社大学、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターによる17回のグループミーティングを開催しており、その都度進捗報告と今後の方針、共同実験および実験内容に関する討議・打合せを行った。また、脳プロ課題F脳老化分科会、脳プロ成果報告会に参加し、業務に関する進捗報告、他の脳老化グループとの情報交換、意見交換を行った。分科会または個別相談においてPS、POとの協議を行い、業務の進捗に関する助言を頂いた。