

アルツハイマー病に対する Syk 阻害薬の有効性

研究代表者：濱野忠則（内科学（2）部門・准教授）

共同研究者：山口智久（第二内科・医員）、定 清直□（ゲノム科学・微生物学・教授）

概要	高度にリン酸化し重合したタウからなる神経原線維変化はアルツハイマー病の主要な病理所見である。Spleen tyrosine kinase (Syk)は非受容体タイプのチロシンキナーゼである。TetOff 誘導系により野生型タウ(4R0N)を発現する神経系細胞を用い、Syk 特異的阻害薬 BAY61-3606 がタウのリン酸化・重合に及ぼす影響につき検討した。BAY61-3606 により総タウ・リン酸化タウが減少した。主要なタウのリン酸化酵素 GSK3βの活性低下も認められた。タウ分解経路オートファジーの活性化も示された。サルコシル不溶性画分内の重合タウの減少が示された。明らかな細胞死はなかった。以上より、Syk 特異的阻害薬 BAY61-3606 はタウのリン酸化酵素の不活性化、オートファジー活性化により重合タウを減少させることが示された。
関連キーワード	Syk、タウ蛋白、アルツハイマー病、GSK3β

研究の背景および目的

アルツハイマー病(AD)の特徴的病理所見である神経原線維変化(NFT)は高度にリン酸化したタウ蛋白から形成される。タウ蛋白は微小管に結合し、安定化させる生理的作用を有するが、GSK3βにより高度にリン酸化されると、微小管から離れ各々が重合体を形成する。NFT 形成の過程で生ずるタウオリゴマーがもっとも毒性が強い(図1)。Spleen Tyrosine Kinase (Syk)は非受容体型チロシンキナーゼで、マスト細胞のヒスタミン放出やマクロファージのファゴサイトーシス、B 細胞の分化など様々な生理活性を有する。また Syk 阻害薬はアレルギー性鼻炎や関節リウマチ治療への有効性が示唆され、さらに免疫性血小板減少症では第3相試験で有効性が証明され、米国では2018年既存の治

療に効果がない成人患者に対する治療薬としてFDAに承認された。現在はIgA腎症、自己免疫性溶血性貧血に対する臨床治験が行われている。Sykはタウ蛋白のリン酸化酵素 GSK3βを活性化し、タウのリン酸化を促進している可能性が報告され同て以降(Paris et al. JBC 2014) AD研究の分野でも注目を集めている。我々はTetOff誘導系を導入し、野生型タウ(4R0N)を発現する神経系細胞を用いて、Sykの特異的阻害薬であるBAY61-3606がタウのリン酸化に及ぼす影響についても検討する。さらにタウ重合体形成に及ぼす影響を評価する。Syk阻害薬投与後のGSK3β活性についても検討する。またタウ蛋白分解経路であるオートファジー活性に及ぼす影響についても検討を加える。

研究の内容および成果

我々はTet Off誘導系を導入し、野生型タウ蛋白(4R0N)を発現する神経系細胞(M1C cell)を用い、様々な薬物がタウの重合、リン酸化、分解経路に及ぼす影響につき検討してきた。今回 Syk と AD の関連性、特にタウのリン酸化に及ぼす影響を検討するため、M1C 細胞に Syk 特異的阻害薬 BAY61-3606 がタウ蛋白リン酸化に及ぼす影響について検討した。

従来 Syk は脾臓組織などの造血系組織に多く存在するとされていたため、まず我々の用いた神経系細胞 M1C に Syk が存在するかどうかの検討をおこなった。Western blot 法により M1C cell には 72 kDa の Syk が存在することが証明された(図1)。

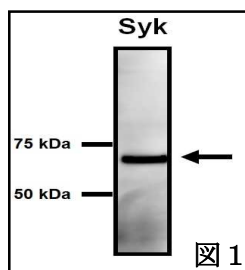
次に Syk 阻害薬 BAY61-3606 により細胞内のタウの量に変化が生ずるかを検討した。Tet-Off

induction により野生型タウ(4R0N)を計5日間発現させたのち、最終の24時間で1μM、または10μMのBAY61-3606を投与した。細胞をharvestし、lysateを作成し、抗タウ抗体を用いたWestern blot法を実施した。その結果、総タウ、およびリン酸化タウ(図2)がSyk阻害薬BAY61-3606の容量依存性に減少することが示された。

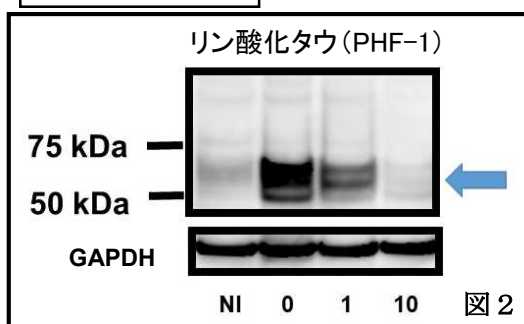
次に主要なタウのリン酸化酵素であるGSK3β活性にBAY61-3606が及ぼす影響について検討した。その結果、Syk阻害薬の投与によりリン酸化したGSK3β(不活性型)が増加していたが、総GSK3β量には変化が見られなかった(図3)。以上よりSyk阻害薬がGSK3βを抑制することが示された。さらにタウの主要な分解経路であるオートファジー活性について検討した。その結果し、Syk阻害薬の

投与により LC3II/LC3I 比が増加していた(図4)。この結果より Syk 阻害薬がオートファジーを活性化することが示唆された。

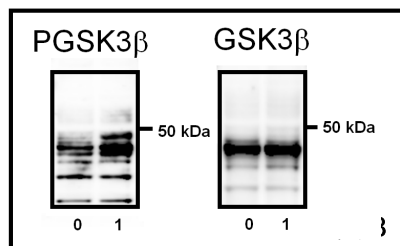
さらに、画分法では神経原線維変化の形成に重要なサルコシル不溶性画分でのタウが Syk 阻害薬により著しく減少していた。



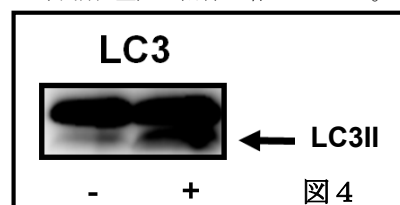
神経芽細胞種細胞 M1C に 70kDa の Syk が存在することが WB 法により確認された。



NI:non induced(タウ発現前)
0: Syk inhibitor(-); 1: 1 μ M Syk Inhibitor;
10: 10 μ M Syk inhibitor
Syk 阻害薬投与により PHF-1 で認識されるリン酸化タウ(矢印)が容量依存性に減少した。



Syk 阻害薬によりリン酸化した GSK3β (不活性型)の割合が増加していた。



Syk 阻害薬により LC3II/I の比が増加していた。すなわちオートファジーの活性化示唆された。

なお Syk 阻害薬投与により明らかな細胞死は認めなかった。

意義 以上の結果より Syk がタウ蛋白リン酸化や分解経路に関与している可能性が高いことが示唆された。以上のごとく Syk 阻害薬はタウ蛋白のリン酸化の抑制、およびオートファジーの活性化によりリン酸化タウ、およびタウ重合体を減少させることを介してアルツハイマー病の病態を修飾させる可能性が示された。今後のさらなる検討が必要であるが、TR 研究として応用される可能性が示唆された。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

「論文」

1. **Hamano T**, Shirafuji N, Yen S-H, et al. Rho-kinase ROCK Inhibitors Reduce Oligomeric Tau Protein. *Neurobiol Aging* 2020; 89: 41-54.
2. Hama Y, **Hamano T**, Shirafuji N, et al. Influences of Folate Supplementation on Homocysteine and Cognition in Patients with Folate Deficiency and Cognitive Impairment. *Nutrients* in revised submission.
3. **Hamano T**, Hayashi K, Shirafuji N, Nakamoto Y. The Implications of Autophagy in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res* 2018; 15(14):1283-1296.
4. Endo Y, Hasegawa K, Nomura R, Arishima H, Kikuta KI, 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 aggregation in an in vitro model of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol Commun*. 2019 Jan 28;7(1):12.
5. Kajinami K, Tsukamoto K, Koba S, Inoue I, Yamakawa M, Suzuki S, **Hamano T**, Saito H, Saito Y,

et al; Statin Intolerance Clinical Guide Working Group; The Japan Society of Hepatology, Japanese Society of Neurology, Japan Atherosclerosis Society, The Japanese Society for the Study of Xenobiotics. Statin Intolerance Clinical Guide 2018. *J Atheroscler Thromb*. 2019 Oct 「学会発表」

1. **Yamaguchi T**, **Hamano T**, **Sada K**, et al. Syk inhibitor reduces oligomeric tau associated with GSK3 β inactivation and autophagy activation Syk inhibitor reduces oligomeric tau. **AAIC (Alzheimer's Association International Conference) 2020 July 2020** In Amsterdam, Netherland

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

- 1) 科学研究費補助金 代表 濱野忠則 基盤研究(C) 2019 - 2021 バイオメタルが誘導するタウオリゴマー形成促進機構の解明(採択・継続)
- 2) 科学研究費補助金 代表 山口智久 若手研究 B アルツハイマー病に対する Syk 阻害薬の有効性 2020 年 申請予定