

—— 研究助成報告 ——

てんかんがアルツハイマー病関連変病原性タンパク質の 脳内蓄積に与える影響の解明と治療法への応用

武 田 朱 公

要旨：近年、アルツハイマー型認知症ではてんかんの合併頻度が高いことが示されており、両疾患の病態連関が注目されている。また、抗てんかん薬が認知症に対して保護的に作用する可能性が臨床研究から示唆されているが、その機序は大部分が未解明である。本研究では、抗てんかん薬がアルツハイマー病の主要な神経病理であるタウ凝集体の形成に与える影響を明らかにすることを目的とし、タウ凝集を評価するアッセイ系を用いて複数の抗てんかん薬の効果を検証した。細胞内タウ凝集体形成を定量的に評価可能なTau-biosensor細胞を用いたアッセイと、チオフラビンT蛍光色素を用いたcell freeのタウ凝集アッセイを利用し、タウ凝集に対する影響を評価した。この結果、抗てんかん薬の中にはタウ凝集を抑制する薬剤と促進する薬剤が存在することが示された。このことは、てんかんを合併する認知症高齢者におけるてんかん薬物治療の最適化を考える上で重要な示唆を与えると考えられる。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2022；33：75-78

Key Words：認知症，アルツハイマー病，抗てんかん薬，タウ，凝集体

【序論】

高齢化に伴う認知症の急増が深刻な社会問題となっている¹⁾。アルツハイマー病（Alzheimer's disease, AD）は認知症の原因疾患で最も多い神経変性疾患であり、認知症の半数以上を占めるとされる²⁾。ADを含む認知症の最大の危険因子は加齢とされており、高齢者では5年毎に有病率が2倍になることが知られている²⁾。認知症の根本的治療法は現時点で確立されておらず、有効な治療法の開発が喫緊の課題となっている³⁾。

近年の疫学研究から、認知症患者ではてんかんの発症リスクが認知機能健常者と比較して数倍高いことが報告されている^{4, 5)}。認知症の中でもADは特にてんかんのリスクが高いことから、両疾患の病態連関が注目されている。ADの罹患はてんかんの独立した危険因子であることが報告されており、ADでは10年間で約10%

の患者にてんかんが発症するとされている⁶⁾。複数の横断研究において、AD患者の10～60%にてんかんが合併していると報告されており⁷⁾、認知症の他の原因疾患と比較してADではてんかんの合併頻度が有意に高い⁸⁾。また、てんかん発作はAD患者の認知機能障害の進行速度を速めることも報告されている⁹⁾。

ADとてんかんにおける病態連関の具体的なメカニズムは大部分が未解明である。AD脳内ではアミロイド β とタウ蛋白の凝集体の蓄積がみられ、AD病理診断の根拠になるとともに、バイオマーカーや疾患修飾薬開発の重要なターゲットとなっている^{3, 10)}。特に、タウ蛋白の神経細胞内凝集体である神経原線維変化（Neurofibrillary tangles, NFTs）の脳内蓄積量はAD患者の認知機能障害の重症度と相関することが知られており、病的タウと神経機能障害や神経細胞死の直接的な関連が示唆されている¹¹⁻¹⁵⁾。タウ凝集体の脳内蓄積はADのみならず、前頭側頭葉変

性症、進行性核上性麻痺、大脳皮質基底核変性症などタウオパチーと総称される認知症疾患でもみられることから¹⁴⁾、病的タウの認知症病態における重要性が示されている。

高齢者にみられるてんかん発作は、一般的な抗てんかん薬を適正使用することで一定の治療効果が得られる。てんかん発作は高齢認知症患者の認知機能予後を悪化させることから⁵⁾、適切な診断と治療を行うことが重要とされる。注目すべきことに、一部の抗てんかん薬は認知機能障害に対して保護的に作用することが報告されている¹⁶⁾。しかしながら、抗てんかん薬が認知症患者の認知機能障害を修飾するメカニズムや、特に脳内神経病理に対してどのような影響を及ぼすかは解明されていない。抗てんかん薬がAD病態に与える影響が明らかになれば、てんかんを合併する高齢認知症患者に対する治療の最適化に繋がるのみならず、ADの新規治療法開発のターゲットとなる可能性も期待される。

本研究では、抗てんかん薬がADタウ病理に与える影響を複数のin vitroアッセイ系を用いて評価した。細胞内でのタウ凝集を評価するTau-biosensor細胞¹⁷⁾を用いたスクリーニングと、チオフラビンT蛍光色素を用いたcell freeのタウ凝集アッセイを利用してその効果を検証した。

【方法】

Tau-biosensor細胞を用いた細胞内タウ凝集アッセイ

Tau-biosensor細胞 (Tau RD P301S FRET Biosensor, #CRL-3275, ATCC) は、家族性 Frontotemporal dementiaに関連するP301S変異タウにCFP或いはYFP蛍光蛋白を結合した Fusion蛋白をHEK293T細胞に過剰発現させた細胞株であり、細胞内タウ凝集体形成の評価に用いられる^{13, 17, 18)}。培地中にSeed活性を有するタウ (Seedタウ) を添加して培養し、Seedタウが細胞内に取り込まれて凝集体を形成すると、細胞内に発現している変異タウ-CFP及び変異タウ-YFPと共に凝集することで両者が近接しFRET (Fluorescence Resonance Energy

Transfer) を生じる。このシグナルを検出することで細胞内タウ凝集体の量を定量的に測定することが出来る。

培地に添加するSeedタウとしては、ADマウス (Tau-tg PS19) 脳組織由来の病的タウを既報に従って抽出し実験に用いた^{13, 18, 19)}。PDLコーティングされた384wellプレート (PhenoPlate-384, #6057500, PerkinElmer) に細胞を8,000細胞 / well (in 30 μ l) 播種した。16時間後にOptimem (Opti-MEM, #31985-070, gibco), リポフェクタミン (Lipofectamine 2000, #11668-027, invitrogen) とマウス脳PBS可溶性画分の混合溶液と各終濃度になるように調製した抗てんかん薬の溶液を等容量で混合し、細胞に30 μ l/well 添加した。

チオフラビンT蛍光試薬を用いたcell free凝集アッセイ

チオフラビンT (Thioflavine T, #202-01002, FUJIFILM) 1 mM in dH₂O溶液を0.22 μ mのフィルター (MILLEX®-GV 0.22 μ m Filter Unit, #SLGVR04NL, Merck) でろ過し、PBSにて希釈し、333.3 μ MのチオフラビンT/PBS溶液を調製した。断片型のリコンビナントタウ (Active Human Recombinant Tau Protein monomer (K18), #SPR-328C, funakoshi) をPBSで希釈し、20 μ Mのtau/PBS溶液を調製した。0.5 mLマイクロレシコチューブ (Microresico Tube, #92016, Richell) にチオフラビン/ヘパリン混合溶液と目的濃度にPBSで調製した抗てんかん薬溶液と20 μ Mのtau溶液を同量加えて混合し、384ウェルプレートにアプライした。ネガティブコントロールとして、タウ凝集阻害薬 (KT-430, #119-01141, FUJIFILM) を使用した。37°Cでインキュベートし、一定時間後にプレートリーダーで450 nmの励起、485 nmの発光で測定した。

【結果】

Tau-biosensor細胞によるスクリーニング評価の結果、抗てんかん薬の中にはタウ凝集を抑制する薬剤と促進する薬剤が存在することが示された。この結果は、チオフラビンT蛍光色素

を用いたcell freeのタウ凝集アッセイにおいても確認された（論文発表前のためデータ詳細は示さず）。

【考察】

本研究の結果から、ADをはじめとする認知症疾患に関連するタウ蛋白の凝集体形成に対して、各種抗てんかん薬が異なる影響を与える可能性が示された。このことは、てんかんを合併する高齢認知症患者におけるてんかん薬物治療の最適化を考える上で重要な示唆を与えられ考えられる。また、タウ病理を標的とした認知症治療法開発の新たなターゲットとなることが期待される。

【文献】

- Livingston, G., et al. Dementia prevention, intervention, and care : 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet (London, England)* **396**, 413-446 (2020).
- Cao, Q., et al. The Prevalence of Dementia : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* **73**, 1157-1166 (2020).
- Cummings, J., Lee, G., Zhong, K., Fonseca, J. & Taghva, K. Alzheimer's disease drug development pipeline : 2021. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)* **7**, e12179 (2021).
- Sen, A., Jette, N., Husain, M. & Sander, J.W. Epilepsy in older people. *Lancet (London, England)* **395**, 735-748 (2020).
- Olafsson, E., et al. Incidence of unprovoked seizures and epilepsy in Iceland and assessment of the epilepsy syndrome classification : a prospective study. *The Lancet. Neurology* **4**, 627-634 (2005).
- Cheng, C.H., et al. Incidence and risk of seizures in Alzheimer's disease : A nationwide population-based cohort study. *Epilepsy research* **115**, 63-66 (2015).
- Friedman, D., Honig, L.S. & Scarmeas, N. Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease. *CNS neuroscience & therapeutics* **18**, 285-294 (2012).
- Vossel, K.A., Tartaglia, M.C., Nygaard, H.B., Zeman, A.Z. & Miller, B.L. Epileptic activity in Alzheimer's disease : causes and clinical relevance. *The Lancet. Neurology* **16**, 311-322 (2017).
- Volicer, L., Smith, S. & Volicer, B.J. Effect of seizures on progression of dementia of the Alzheimer type. *Dementia (Basel, Switzerland)* **6**, 258-263 (1995).
- Busche, M.A. & Hyman, B.T. Synergy between amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nature neuroscience* **23**, 1183-1193 (2020).
- Gómez-Isla, T., et al. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* **41**, 17-24 (1997).
- Serrano-Pozo, A., et al. Examination of the clinicopathologic continuum of Alzheimer disease in the autopsy cohort of the National Alzheimer Coordinating Center. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **72**, 1182-1192 (2013).
- Takeda, S., et al. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer's disease brain. *Nature communications* **6**, 8490 (2015).
- Takeda, S. Tau Propagation as a Diagnostic and Therapeutic Target for Dementia : Potentials and Unanswered Questions. *Frontiers in neuroscience* **13**, 1274 (2019).
- Takeda, S. Progression of Alzheimer's disease, tau propagation, and its modifiable risk factors. *Neuroscience research* **141**, 36-42 (2019).
- Bakker, A., et al. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron* **74**, 467-474 (2012).
- Holmes, B.B., et al. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E4376-4385 (2014).

- 18) Takeda, S., et al. Seed-competent high-molecular-weight tau species accumulates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease mouse model and human patients. *Annals of neurology* **80**, 355-367 (2016).
- 19) Nobuhara, C.K., et al. Tau Antibody Targeting Pathological Species Blocks Neuronal Uptake and Interneuron Propagation of Tau in Vitro. *The American journal of pathology* **187**, 1399-1412 (2017).