

令和元年6月6日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08274

研究課題名(和文) 21トリソミーから考える新規アルツハイマー病治療薬の開発

研究課題名(英文) Search for new targets as potential anti-Alzheimer's disease agents from chromosome 21

研究代表者

浅井 将 (ASAI, Masashi)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教

研究者番号：90383223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の新規治療薬の開発のために、早期からアルツハイマー病を発症するダウン症者に着目し、ダウン症者で過剰になっている21番染色体に存在するキナーゼであるDYRK1Aとアミロイド分解酵素の関係を解析した。その結果、ダウン症者由来の細胞では健常者由来のそれとアミロイド分解酵素の発現や活性が有意に低下しており、DYRK1Aが介在する転写因子であるNFATとカルシニューリンの経路の長期抑制でもアミロイド分解酵素の活性が有意に低下することがわかった。DYRK1A阻害剤はアルツハイマー病の新規治療薬になり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2020年には65歳以上の認知症の有病者は60万人に達すると予想され、その半数以上はアルツハイマー病と見積もられている。依然としてアルツハイマー病はアンメットメディカルニーズの高い代表疾患であり、現在臨床使用されている薬剤は症状改善薬で、病態修飾薬は存在しない。また、ダウン症者の平均寿命は60歳になろうとしており、早期からアルツハイマー病を発症するため、アルツハイマー病の根本的治療薬の開発は喫緊の課題となっている。本研究成果によって示唆された21番染色体に存在するキナーゼとアミロイド分解酵素の相互作用は、アルツハイマー病に対する副作用の少ない新しい薬剤開発の標的となり得る。

研究成果の概要(英文)：To develop a cure for Alzheimer's disease, I focused people with Down syndrome that have an early onset of Alzheimer's disease. An extra copy of chromosome 21 causes Down syndrome. Therefore, I investigated the relationship between dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region and neprilysin identified as a major A β -degrading enzyme. I found that the activity of neprilysin in fibroblasts derived from people with Down syndrome was significantly lower than that in healthy controls. The protein expression levels of neprilysin were also decreased. The long-term pharmacological inhibition of calcineurin-nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling pathway, in which are excessively suppressed in people in Down syndrome, caused a significant decrease in the activity of neprilysin. Taken together, these results suggest that DYRK1A is a potential drug target for Alzheimer's disease treatment.

研究分野：生化学・薬理学

キーワード：アルツハイマー病 ダウン症 21番染色体 アミロイド ペプチド DYRK1A ネプリライシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本産婦人科医会の全国調査の分析で、ここ15年で21番染色体がトリソミーであるダウン症 (Down syndrome, DS) 児の出生が倍増したことが明らかとなった。この傾向は晩婚化や女性の社会進出等による出産年齢の上昇が原因であることから、今後も増え続けることが予想される。DS者は、知的障害やアルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD)、先天性心疾患、消化器系疾患、近視・遠視、難聴、白血病等の合併症を呈し、多くは40代という早期からADを発症する。医学の進歩によってDS患者の平均寿命が延長し、60歳を迎えるDS患者もいる反面、ADを発症するDS者の増加が懸念されている。そのため、DS者に対するAD治療薬の開発は社会的な喫緊の課題となっている。

(2) ADの一次原因物質であるアミロイドペプチド (amyloid-peptide, A β) は、ADに特徴的な病理像の一つである老人斑の主成分であり、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) からセクレターゼによって産生される。APPをコードする遺伝子は21番染色体に存在する。ADの根本的治療には脳内A β を低下させることが必要であり、セクレターゼの阻害剤は第一に考えられる戦略である。しかしながら、セクレターゼ阻害剤の臨床試験は副作用の出現等で相次いで中止となっている。一方、A β 分解酵素であるネプリライシン (neprilysin, NEP) を標的とする治療薬は、NEPが加齢やADの進行に伴って発現や分解活性が低下するため、その活性増強は原因に即した予防・治療法になり得る。

(3) DS者は21番染色体が3本になっているため、理論上、健常者と比較してAPPが1.5倍発現し、その結果としてA β が1.5倍産生される。このことこそが、DS者が早期からADを発症する原因として考えられてきた。一方、APPのセクレターゼ切断部位に変異を有する家族性ADの一家系では、変異によってセクレターゼとAPPの親和性が増大し、A β の総量が6倍以上に増加する。しかしながら、ADの平均発症年齢は55歳である。このことは、①ADの発症年齢は理論上のA β の産生量と相関しないこと、②21番染色体にADの発症に関与する増悪因子が存在すること、を示唆する。増悪因子の候補として、ADの病態に関わるAPPやタウのリン酸化を触媒する二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ1A (dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A, DYRK1A) が21番染色体に存在している。

2. 研究の目的

APPが過剰発現していることからDS者におけるA β 産生系の解析は古くから行われてきたが、A β 分解系については不明な点が多い。また、AD増悪因子候補としてのDYRK1AとA β 分解系、特にNEPとの関連は全く明らかになっていない。そこで本研究では、DYRK1AとNEPの関係を明らかにし、DS者のAD進行におけるDYRK1Aの作用機序の解明およびDYRK1A阻害による新規AD治療薬の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 健常者由来皮膚線維芽細胞 TIG-119、TIG-120 および DS 由来皮膚線維芽細胞 Detroit 532、Detroit 539 は医薬基盤研究所から入手した。TIG-119 および TIG-120 はイーグル最小必須培地 (minimum essential medium, MEM) に 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) および 100 U/mL ペニシリンと 100 μ g/mL ストレプトマイシン、2 mM L-glutamine を含む培地で培養した。Detroit 532 および Detroit 539 は MEM に 10% FBS および 100 U/mL ペニシリンと 100 μ g/mL ストレプトマイシン、2 mM L-glutamine、非必須アミノ酸溶液、1 mM ビルビン酸ナトリウム、0.1% ラクトアルブミン加水分解物を含む培地で培養した (ref.)。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) に 10% FBS および 100 U/mL ペニシリンと 100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む培地で培養した (ref.)。転写因子である活性化 T 細胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) が応答する配列をルシフェラーゼ遺伝子の上流に含むプラスミド pGL4.30、または APP の哺乳類細胞発現用プラスミドを遺伝子導入試薬を用いて SH-SY5Y 細胞に導入し、hygromycin B を含む培地で選別した (pGL4.30-SH-SY5Y 細胞、または APP-SH-SY5Y 細胞) (ref.)。

(2) NFAT-カルシニューリン経路を刺激するために 1 μ M イオノマイシンと 10 ng/mL 12-O-テトラデカノイルホルボル 13-アセタート (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, TPA) を添加し、NFAT-カルシニューリン経路を抑制するために 1 μ M シクロスポリン A を添加した。その後、適当な時間に培養した細胞を回収した。細胞を氷冷したリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離した。剥離した細胞をチューブに回収し、4 \times 10⁴ / 4,000 \times g/10 分間遠心後、上清除去した。細胞を Glo Lysis Buffer で可溶化し、タンパク質濃度の定量とルシフェラーゼの発光測定をそれぞれ BCA Protein Assay Kit と ONE-Glo Luciferase Assay System を用いて行った (ref.)。

(3) リアルタイム PCR、ウエスタンブロットングまたは NEP 依存的中性エンドペプチダーゼ活性を定量するために培養した細胞は培養上清と細胞に分けて回収し、使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。培養上清は全量をチューブに回収し、4 \times 10⁴ / 4,000 \times g/10 分間遠心後、上清 80% を新しいイ

チューブに移して保存した。細胞は氷冷したリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、セルスクレーパーを用いて細胞を剥離した。剥離した細胞をチューブに回収し、4 /4,000 × g/10 分間遠心後、上清除去して保存した (ref.)。

(4) リアルタイム PCR を行うために、-80 で保存していた細胞から全 RNA をハイピュア RNA アイソレーションキットを用いて抽出し、微量分光光度計で RNA 濃度を決定した。逆転写酵素を用いて、37 で15分、85 で5秒の条件で逆転写反応を行い、cDNA を得た。得られた cDNA を鋳型と標的とする遺伝子のプライマーを用いて、リアルタイム PCR を行った (ref.)。

(5) ウェスタンブロッティングを行うために、-80 で保存していた細胞を 1%または 0.5% Triton X-100 を含む溶液で可溶化し、(2)と同様にタンパク質濃度を定量した。可溶化溶液で各サンプルの濃度を調整し、使用時まで-30 で保存した。ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動でタンパク質を分離し、メタノールで活性化後親水化したポリフッ化ビニリデン膜 に分離したタンパク質を転写した。転写した膜を 0.5% カゼインを含む溶液でブロッキング処理を行った後、適切な濃度に希釈した一次抗体と4 で一晩反応させた。一次抗体との反応後、Tween 20 を含む溶液で洗浄し、適切な濃度に希釈した二次抗体と室温で一時間反応させた。二次抗体との反応後、Tween20 を含む溶液で洗浄後、化学発光試薬を用いて転写膜を処理し、デントメーターでバンドを検出した。

(6) 可溶性膜画分に含まれる NEP 依存的中性エンドペプチダーゼ活性は、間接的共役酵素アッセイ法を用いて蛍光定量的に測定した。タンパク質 1~3 μg を蛍光性人工基質 Succinyl-L-Alanyl-L-Alanyl-L-Phenylalanine 4-methyl-coumaryl-7-amide (Suc-AAF-MCA) と反応させ、産生した Phe-MCA からアミノペプチダーゼによるフェニルアラニン残基の切り出しを行って遊離する 7-amino-4-methylcoumarin の蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて、励起波長 390 nm、蛍光波長 460 nm にて測定した。NEP 依存的中性エンドペプチダーゼ活性は、NEP 特異的阻害剤であるチオルファンによる活性の低下に基づいて決定した (ref.)。

(7) すべての実験データの数値は平均値 ± 標準偏差で表した。平均値の比較は分散を比較し、分散が等しいと仮定できる場合はスチューデントの t 検定を行い、分散が等しいと仮定できない場合はウェルチの t 検定を行って各群間の平均値を比較した。また多重比較の場合は Dunnett 法による多重検定で統計解析を行った。それぞれ p < 0.05 で有意とした。

4. 研究成果

(1) 健常者および DS 者由来線維芽細胞における 21 番染色体に存在する *APP* 遺伝子、*DYRK1A* 遺伝子、*RCAN1* 遺伝子および 21 番染色体に存在しない *MME* 遺伝子について、mRNA 量をリアルタイム PCR 法で解析した (図 1)。その結果、健常者由来の線維芽細胞 TIG-119 および TIG-120 と比較して DS 者由来線維芽細胞 Detroit 532 および Detroit 539 では、21 番染色体に存在する *APP* 遺伝子、*DYRK1A* 遺伝子、*RCAN1* 遺伝子の発現が有意に増加していた。一方、NEP をコードする *MME* 遺伝子は DS 者由来線維芽細胞では有意に低下していた。

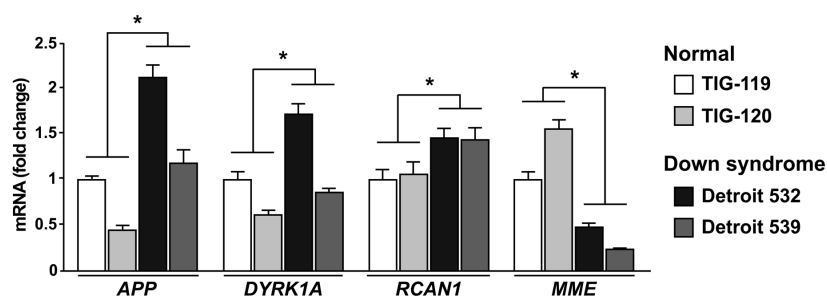


図 1 健常者および DS 者由来線維芽細胞における各遺伝子の発現レベル

(2) 健常者および DS 者由来線維芽細胞における NEP 活性を間接的共役酵素アッセイ法を用いて定量した (図 2)。その結果、健常者由来の線維芽細胞 TIG-119 および TIG-120 と比較して DS 者由来線維芽細胞 Detroit 532 および Detroit 539 では、NEP 活性が有意に低下していた。

(3) pGL4.30-SH-SY5Y 細胞を 1 μM イオノマイシンと 10 ng/mL TPA で 48 時間刺激し、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間のレポーター活性を測定した。その結果、6 時間の刺激で NFAT-カルシニューリン経路が最も活性化することがわかった。この 1 μM イオノマイシンと 10 ng/mL TPA による NFAT-カルシニューリン経路の活性化は、カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A や FK506 の処理によって抑制された。

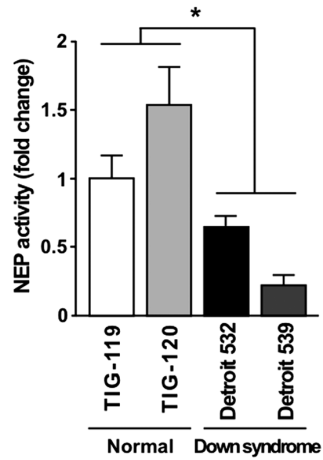


図2 健常者およびDS者由来線維芽細胞におけるNEP活性

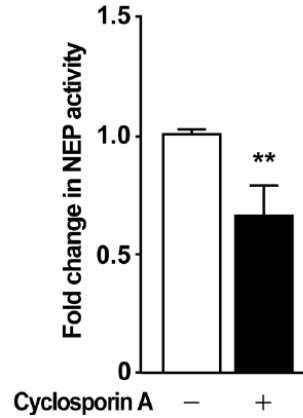


図3 NFAT-カルシニューリン経路の薬理的抑制によるNEP活性

(4) SH-SY5Y細胞を1 μ Mイオノマイシンと10 ng/mL TPAで6時間刺激すると、MME遺伝子のmRNAレベルが有意に低下することがわかった。しかしながら、NEP活性には影響を及ぼさなかった。

(5) SH-SY5Y細胞またはAPPを過剰発現するAPP-SH-SY5Y細胞を1 μ Mシクロスポリンを用いて72時間NFAT-カルシニューリン経路を抑制すると、NEP活性が有意に低下し(図3)、培養上清中のA β 量が有意に増加した(図4)。

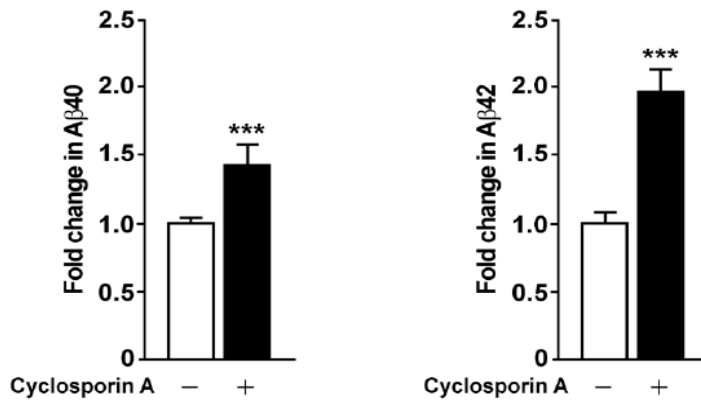


図4 NFAT-カルシニューリン経路の薬理的抑制による培養上清中のA β レベル

<引用文献>

Kawakubo T, Mori R, Shirotani K, Iwata N, Asai M, Neprilysin is suppressed by dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A (DYRK1A) in Down-syndrome-derived fibroblasts, Biol Pharm Bull, Vol. 40, No. 3, 2016, 327 - 333

Asai M, Kinjo A, Kimura S, Mori R, Kawakubo T, Shirotani K, Yagishita S, Maruyama K, Iwata N, Perturbed calcineurin-NFAT signaling is associated with the development of Alzheimer's disease, Biol Pharm Bull, Vol. 39, No. 10, 2016, 1646 - 1652

Kakiya N, Saito T, Nilsson P, Matsuba Y, Tsubuki S, Takei N, Nawa H, Saido TC, Cell surface expression of the major amyloid- β peptide (A β)-degrading enzyme, neprilysin, depends on phosphorylation by mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK) and dephosphorylation by protein phosphatase 1a, J Biol Chem, Vol. 287, No. 35, 2012, 29362 - 29372

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

浅井 将、内海 文彰、21番染色体に存在するアルツハイマー病の関連遺伝子、細胞、査読無、Vol. 50, No. 6, 2018, 350 - 354

<http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/books/%E6%9C%88%E5%88%8A%E3%80%8C%E7%B4%B0%E8%83%>

9E%E3%80%8D%e3%80%802018%E5%B9%B4-5%E6%9C%88%E8%87%A8%E6%99%82%E5%A2%97%E5%88%8A
%E5%8F%B7/

Shirotani K, Matsuo K, Ohtsuki S, Masuda T, Asai M, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Kondo T, Inoue H, Iwata N, A simplified and sensitive method to identify Alzheimer ' s disease biomarker candidates using patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs), J Biochem, 査読有, Vol. 162, No. 6, 2017, 391 - 394

DOI: 10.1093/jb/mvx058

浅井 将, 21 トリソミーから新規アルツハイマー病治療薬を開発する, BIO Clinica, 査読無, Vol. 32, No. 8, 2017, 788 - 793

浅井 将, 川久保 昂, 森 亮太郎, 岩田 修永, ダウン症患者における早期アルツハイマー病発症メカニズムの解明, 薬学雑誌, 査読有, Vol. 137, No. 7, 2017, 801 - 805

DOI: 10.1248/yakushi.16-00236-2

Shirotani K, Asai M, Iwata N, Paradigm shift from diagnosing patients based on common symptoms to categorizing patients into subtypes with different pathogenic mechanisms to guide treatment for Alzheimer ' s disease, J Biochem, 査読有, Vol. 161, No. 6, 2017, 463 - 470

DOI: 10.1093/jb/mvx015

Kawakubo T, Mori R, Shirotani K, Iwata N, Asai M, Neprilysin is suppressed by dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinase 1A (DYRK1A) in Down-syndrome-derived fibroblasts, Biol Pharm Bull, 査読有, Vol. 40, No. 3, 2016, 327 - 333

DOI: 10.1248/bpb.b16-00825

Asai M, Kinjo A, Kimura S, Mori R, Kawakubo T, Shirotani K, Yagishita S, Maruyama K, Iwata N, Perturbed calcineurin-NFAT signaling is associated with the development of Alzheimer ' s disease, Biol Pharm Bull, 査読有, Vol. 39, No. 10, 2016, 1646 - 1652

DOI: 10.1248/bpb.b16-00350

[学会発表](計51件)

浅井 将, 森 亮太郎, 鈴木 結衣, 内海 文彰, ダウン症者における早期アルツハイマー病の発症機構の解析, 第62回日本薬学会関東支部大会, 2018

Asai M, Kinjo A, Kimura S, Mori R, Kawakubo T, Yagishita S, Maruyama K, Iwata N, Malfunction of calcineurin-NFAT signaling pathway is associated to the development of Alzheimer ' s disease in adults with Down syndrome, WCP2018 KYOTO 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018

浅井 将, 高島 志風, 金城 亜衣美, 柳下 聡介, 丸山 敬, 岩田 修永, ダウン症者で見られるカルシニューリン-NFAT シグナルの調節異常とアルツハイマー病関連遺伝子の関連解析, 第138回日本薬理学会関東支部会, 2018

浅井 将, 21番染色体のトリソミーであるダウン症から考えるアルツハイマー病の新しい治療標的について, 第14回生命資源研究・支援センターシンポジウム, 2017

浅井 将, 高島 志風, 川久保 昂, 沖田 啓, 世良田 星, 城谷 圭朗, 岩田 修永, DYRK1Aによるネプリライシンの細胞内領域のリン酸化の解析, 第22回日本病態プロテオーム学会学術集会, 2017

浅井 将, 高島 志風, 岩田 修永, 21トリソミーからアルツハイマー病を考える(An extra copy of chromosome 21 explains the pathogenic mechanism of Alzheimer ' s disease), 第59回日本小児神経学会学術集会, 2017

浅井 将, 金城 亜衣美, 木村 祥子, 森 亮太郎, 川久保 昂, 高島 志風, 城谷 圭朗, 柳下 聡介, 丸山 敬, 岩田 修永, ダウン症患者におけるネプリライシンおよびタウの発現変化, 第90回日本薬理学会年会, 2017

浅井 将, 金城 亜衣美, 木村 祥子, 森 亮太郎, 川久保 昂, 高島 志風, 城谷 圭朗, 岩田 修永, カルシニューリン-NFAT シグナルの調節異常がアルツハイマー病関連遺伝子に与える影響, 第33回日本薬学会九州支部大会, 2016

浅井 将、金城 亜衣美、木村 祥子、森 亮太郎、川久保 昂、高島 志風、城谷 圭朗、柳下 聡介、丸山 敬、岩田 修永、ダウン症患者で見られる転写調節異常とアルツハイマー病の病態、第 35 回日本認知症学会学術集会、2016

〔図書〕(計 3 件)

Uchiumi F、Sato A、Asai M、Tanuma S、iConcept Press Ltd.、An NAD⁺ dependent/sensitive transcription system: Toward a novel anti-cancer therapy. in “Diagnosis, Prognosis and Treatment of Complex Diseases”、in press

Uchiumi F、Asai M、IntechOpen Ltd.、Gene Expression Controlling System and Its Application to Medical Sciences. in “Gene Expression and Control”、Introductory Chapter、in press

浅井 将、山本 一男、株式会社エヌ・ティー・エス、ダウン症者における早期アルツハイマー病発症メカニズム、「アルツハイマー病 発症メカニズムと新規診断法・創薬・治療開発」、第 1 編、第 1 章、第 3 節、2018、22 - 28

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岩田 修永

ローマ字氏名：(IWATA, Nobuhisa)

所属研究機関名：長崎大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 70246213

(2)研究協力者

研究協力者氏名：森 亮太郎

ローマ字氏名：(MORI, Ryotaro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。