

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07070

研究課題名(和文) ダウン症が引き起こすアミロイド分解酵素の発現および活性の低下機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of reduced expression and activity of an amyloid-degrading enzyme in Down syndrome

研究代表者

浅井 将 (Asai, Masashi)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90383223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の根治薬を創製するために、APPやタウの双方に関与するDYRK1Aに着目し、DYRK1Aを阻害する化合物をin silicoで探索することを目的とした。報告されているDYRK1Aを阻害する化合物の構造を基に、統合計算化学システムMOEによりDYRK1Aと化合物の相互作用を比較した。汎用されている化合物harmineを基に、研究室で有している化合物について検討した。その結果、harmineよりも高い親和性を有する化合物を見出した。さらに、高い親和性を有する化合物の置換基を付加・交換することでより強力な親和性を有する化合物を作製することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、in silicoでのDYRK1Aの阻害剤開発を行い、実験で汎用されている化合物であるharmineよりもDYRK1Aに親和性が高い化合物を見出した。本化合物およびその誘導体のDYRK1Aとの予測される相互作用は非常に強力なものであり、アルツハイマー病の有用な治療薬になる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：To development novel drugs for Alzheimer's disease, we focused on DYRK1A, which is involved in both APP and tau, and aimed to find compounds that inhibit DYRK1A in silico. Based on the reported structures of compounds that inhibit DYRK1A, the interaction of the compounds with DYRK1A was compared using the integrated computational chemistry system MOE. Based on the general-purpose compound harmine, the compounds possessed in the laboratory were examined. As a result, compounds with higher affinity than harmine were found. Furthermore, compounds with stronger affinity were successfully prepared by adding or exchanging substituents of compounds with high affinity.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 ダウン症 21番染色体 DYRK1A 阻害剤 in silico

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 平成 28 年版高齢社会白書によると、2020 年には 65 歳以上の認知症の有病者は 600 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 (Alzheimer's disease, AD) であると見積もられている。現在 AD に対して臨床使用されている薬剤は、症状改善薬であり、根治のための病態修飾薬は存在しないことから、依然として AD はアンメット・メディカル・ニーズの高い代表疾患である。近年、AD の一次病因物質である β アミロイド (amyloid- β peptide, A β) の産生を担う酵素 (β および γ セクレターゼ) に対する阻害剤の臨床試験が行われたが、副作用等の問題から相次いで開発中止となっている。一方、神経毒性を有する可溶性 A β の凝集体に選択的に結合する抗体 BAN2401 の臨床試験では、脳内 A β 量の有意な減少と症状の進行抑制が確認されていることから、AD の根本的治療薬の開発として A β を標的とすることは間違っていないと考えられる。そこで応募者は、AD の根本的治療薬の開発のためには A β 産生系を標的としない新しい治療戦略による薬剤開発が必要であると考えて A β 分解系に着目した。

(2) 脳内の A β は、II 型膜タンパク質であるネプリライシン (neprilysin, NEP) と呼ばれる中性エンドペプチダーゼによって主に分解される。応募者らは、NEP の過剰発現を試みた AD モデルマウスにおける実験的遺伝子治療を行い、神経細胞のみに NEP を発現させて脳内 A β の減少および認知機能の改善に成功している。つまり、NEP の発現や活性の増強は、AD の治療薬開発のブレークスルーとなることが示唆される。しかしながら、作用機構が明らかになっている NEP の発現や活性を増強する化合物は極めて少なく、ソマトスタチンのみが報告されている。ソマトスタチンは、神経ペプチドであることから経口摂取には不向きであり、異なる切り口による戦略が求められている。

(3) 近年の AD 治療薬の臨床結果を踏まえ、応募者らは早期から AD を発症するダウン症 (Down syndrome, DS) に着目した。DS 者および健常者の線維芽細胞を 2 例ずつ用いて NEP 活性を測定した結果、DS 者由来細胞では健常者由来細胞と比較して有意に NEP 活性が低下していた。この要因として、DS 者でトリソミーとなっている 21 番染色体上に存在する二重特異性チロシン - リン酸化調節キナーゼ DYRK1A (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) に焦点を当て、DYRK1A の siRNA による発現抑制や阻害剤による活性阻害を行ったところ、NEP の活性が回復することがわかった。

2. 研究の目的

DYRK1A がセリン/スレオニン キナーゼであることから、リン酸化を介した NEP の活性低下であることが示唆されるが詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究課題では、これらの結果をさらに発展させるために、DYRK1A による NEP の活性低下機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。また、DYRK1A の発現が増加している AD 脳でも NEP のリン酸化が増加しているか、AD モデルマウスおよび DS モデルマウスを用いた *in vivo* での解析をすると共に、ヒトの神経細胞でも同様に観察されるか、ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSC) から分化誘導を行った神経細胞で解析することを目的とする。

また、DYRK1A の阻害剤を開発するスクリーニング系を確立し、新規 DYRK1A 阻害剤の開発を進める。

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 ピ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°C/4,000×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ティングまたは 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°Cで保存した。培養上清は全量をチューブに回収し、4°C/4,000×g/10分間遠心後、上清 80%を新しい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°C/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°C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°Cで15分、85°C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) ウエスタンブロットティングを行うために、-80°C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°C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°C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、デンシトメーターでバンドを検出した。

(6) 可溶化膜画分に含まれる 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。

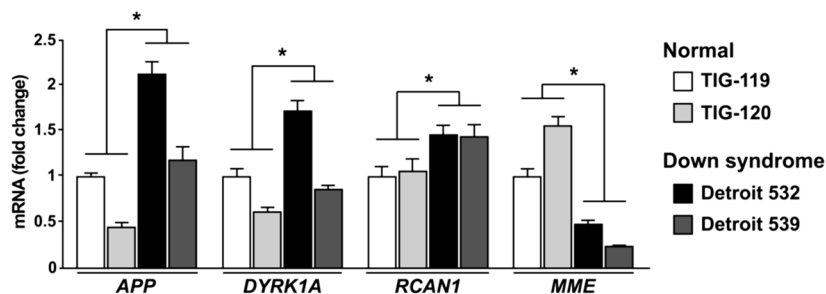


図 1 健常者および DS 者由来線維芽細胞における各遺伝子の発現レベル

(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。

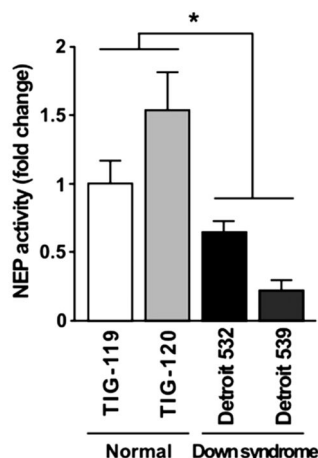


図2 健常者およびDS 者由来線維芽細胞における NEP 活性

(3) 報告されている DYRK1A を阻害する化合物の構造を基に、統合計算化学システム MOE (molecular operating environment) により DYRK1A と化合物の相互作用を比較した。その結果、研究で汎用されている化合物 harmine を基に、研究室で有している化合物について検討した。その結果、harmine よりも高い親和性を有する化合物を見出した。さらに、高い親和性を有する化合物の置換基を付加・交換することで、より強力な親和性を有する化合物を作製することに成功した。

<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 ($A\beta$)-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5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikegawa M, Nakajima A, Yu J, Asai M, Uesawa Y, Sone H	4. 巻 813
2. 論文標題 Molecular profiling of ginsenoside metabolites to identify estrogen receptor activity.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 146108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2021.146108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchiumi F, Katsuda C, Akui M, Kusaka M, Tanaka M, Asai M, Tanuma SI	4. 巻 44
2. 論文標題 Effect of the natural compound trans-resveratrol on human MCM4 gene transcription	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Rep	6. 最初と最後の頁 283-292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2020.7598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada H, Goto Y, Arakawa J, Murayama E, Ogawa Y, Konno M, Oyama T, Asai M, Sato A, Tanuma SI, Uchiumi F	4. 巻 166
2. 論文標題 Characterization of the Human E2F4 Promoter Region and Its Response to 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 363-373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamada H, Yamamura M, Ohi H, Kobayashi Y, Niwa K, Oyama T, Mano Y, Asai M, Tanuma SI, Uchiumi F	4. 巻 55
2. 論文標題 Characterization of the Human Zinc Finger nfx-1-type Containing 1 Encoding ZNFX1 Gene and Its Response to 12-O-tetradecanoyl-13-acetate in HL-60 Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 896-904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchiumi F, Sato A, Asai M, Tanuma S	4. 巻 7
2. 論文標題 An NAD+ dependent/sensitive transcription system: Toward a novel anti-cancer therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 AIMS Mol Sci	6. 最初と最後の頁 12-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/molsci.2020002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計21件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 兼次雅子, 荻野暢子, 浅井 将, 内海文彰
2. 発表標題 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) によるSH-SY5Y細胞内BACE1の減少
3. 学会等名 第95日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富永ななみ, 水落彩夏, 日下部竜聖, 中北敏賀, 亀卦川真美, 喻 静, 曾根秀子, 浅井 将
2. 発表標題 皮膚エラスターゼの発現および活性制御機構の解析
3. 学会等名 第66日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兼次雅子, 荻野暢子, 浅井 将, 内海文彰
2. 発表標題 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) によるBACE1の減少
3. 学会等名 第66日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永ななみ, 水落彩夏, 日下部竜聖, 小西清美, 浅井 将
2. 発表標題 ビタミン類による皮膚エラスターゼの発現および活性制御機構の解析
3. 学会等名 第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 将
2. 発表標題 ダウン症とアルツハイマー病、これまでとこれから
3. 学会等名 第4回日本ダウン症学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小西清美, 富永ななみ, 藤井真悟, 浅井 将
2. 発表標題 メラニン生合成に関わる膜タンパク質へのプロテアーゼの関与
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永ななみ, 小西清美, 日下部竜聖, 浅井 将
2. 発表標題 皮膚エラスターゼの発現および活性制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大村実来、亀卦川真美、苅込裕太、浅井 将、速水耕介、曾根秀子
2. 発表標題 ニューロステロイド代謝を介した当帰の抗うつ作用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本元恒越、大村実来、伊藤智彦、Qin Xiang-Yang、住野彰英、浅井 将、速水、耕介、曾根秀子
2. 発表標題 医薬品及び食品成分の安全性評価に適した神経マイクロオルガノイドの作成に関する基盤的研究
3. 学会等名 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアムscChemRISC 2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大村実来、本元恒越、亀卦川真美、伊藤智彦、浅井 将、速水耕介、曾根秀子
2. 発表標題 神経マイクロオルガノイドを用いたin vitroうつ様モデルの作成と治療効果の検討
3. 学会等名 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアムscChemRISC 2022年度年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 将、酒井裕子、村上 綾、日下部竜聖、富永ななみ、山本一男
2. 発表標題 21番染色体に存在する細胞内輸送複合体構成因子に着目したアルツハイマー病治療への応用
3. 学会等名 第44回日本小児遺伝学会学術集会・第3回日本ダウン症学会学術集会・第3回日本ダウン症会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本元恒越、並木悠美、Qin Xiang-Yang、浅井 将、速水耕介、曾根秀子
2. 発表標題 Characterization of a developmental toxicant, valproic acid by using the alternative model for chemical toxicity assessment
3. 学会等名 幹細胞を用いた化学物質リスク情報共有化コンソーシアムscChemRISC 2021年度年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼次雅子、長村直弥、荻野暢子、浅井 将、内海文彰
2. 発表標題 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) によるSH-SY5Y細胞内BACE1の減少
3. 学会等名 日本薬学会第142年会(名古屋)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅井 将
2. 発表標題 ダウン症と新型コロナウイルスの相関解析
3. 学会等名 第5回成人期ダウン症研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩佐健介、丸山 敬、浅井 将、清水邦義、吉川圭介
2. 発表標題 アミロイド タンパク質と記憶学習に対する森林資源の影響
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井 将、濱田裕司、長村直弥、桐木頼子、内海文彰
2. 発表標題 TPAに誘導されたHL -60 細胞分化に伴ったE2F4遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅井 将、長村直弥、桐木頼子、田沼靖一、内海文彰、山本一男
2. 発表標題 21番染色体に存在する新規アルツハイマー病治療標的因子の解析
3. 学会等名 第2回日本ダウン症会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部琴絵、岩佐健介、浅井 将、丸山 敬、清水邦義、吉川圭介
2. 発表標題 記憶障害およびアミロイド タンパク質に対する森林由来天然資源の効果
3. 学会等名 第29回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浅井 将、金城亜衣美、木村祥子、長村直弥、桐木頼子、村上 綾、田沼靖一、内海文彰
2. 発表標題 ダウン症者における転写調節不全が引き起こすアルツハイマー病関連分子の発現変動の解析
3. 学会等名 第29回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桐木頼子、浅井 将、内海文彰
2. 発表標題 ヒトZNF1遺伝子プロモーターのTPA応答エレメントの解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長村直弥、浅井 将、内海文彰
2. 発表標題 TPAに誘導されたHL-60細胞分化に伴ったE2F4遺伝子発現の解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関