

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790260

研究課題名(和文)APPのリン酸化制御 副作用の少ない新しいアルツハイマー病治療薬を目指して

研究課題名(英文)Regulation of APP phosphorylation

研究代表者

浅井 将 (ASAI, Masashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・助教

研究者番号：90383223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病の一次原因物質であるアミロイド ペプチド産生を制御するために前駆体タンパク質のリン酸化を制御する分子の同定を試みた。ダウン症でトリソミーとなっている21番染色体に存在するDYRK1AおよびRCNA1に着目した結果、前者の過剰発現は有意にリン酸化が亢進したが、後者の過剰発現では変化がなかった。タウのリン酸化に対しては両者の過剰発現で亢進が見られた。さらにアミロイド ペプチドの分解酵素であるネプリライシンの活性低下を誘導した。DYRK1Aの阻害剤で処理すると、培養上清中のアミロイド ペプチド量が低下した。DYRK1Aはアルツハイマー病治療の新しい標的分子になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To treat Alzheimer's disease, it is required to reduce the amount of amyloid-peptide in the brain. γ -Secretase prefer phosphorylated C-terminal fragments of precursor protein of amyloid-peptide (APP) as a substrate. To identify the molecules related with APP phosphorylation, DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) and RCAN1 (regulator of calcineurin 1) on chromosome 21 were focused. Overexpression of DYRK1A led to APP and tau phosphorylation, while overexpression of RCAN1 led to tau phosphorylation, but not APP. Moreover, overexpression of either or both led to decrease in the peptidase activity of neprilysin and increase in of the phosphorylation of neprilysin. Treatment of a DYRK1A inhibitor reduced A β levels in the medium. These results suggest that DYRK1A and RCAN1 are potential targets of drug development to treatment of Alzheimer's disease.

研究分野：生化学

キーワード：アルツハイマー病 ダウン症 APP リン酸化 DYRK1A RCNA1 ネプリライシン

1. 研究開始当初の背景

(1) アルツハイマー病患者の脳内には老人斑および神経原線維変化といった特徴的な構造物が観察される。それぞれの主成分は前者がアミロイド ペプチド (amyloid- ペプチド)、後者が過剰リン酸化されたタウである。

(2) アルツハイマー病の根本的治療には脳内の A を取り除くことが必要である。A はアミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein, APP) から および セクレターゼによって産生される。産生された A は主にネプリライシン (nepilysin, NEP) によって分解される。脳内 A 量は産生と分解によって一定に保たれている。

(3) および セクレターゼに対する阻害剤が開発されたが、その多くは臨床試験まで進んだものの、副作用などの問題で開発中止となっている。 および セクレターゼは APP 以外の分子を生理的な基質とするので、阻害開発には基質特異性が求められている。また、長期服用が予想されるアルツハイマー病治療薬として副作用の少ない薬剤開発が望まれている。

(4) セクレターゼは APP の C 末端断片 (C-terminal fragment, CTF) を切断する際に細胞内領域の 668 番目の Thr がリン酸化された CTF を優先的に切断する (Ref.)。APP の細胞内領域の Thr668 のリン酸化の制御はセクレターゼに直接作用せずに A 産生を減少させるアルツハイマー病の新しい治療戦略になることが示唆されている。

2. 研究の目的

(1) APP の細胞内領域 Thr668 のリン酸化を担うキナーゼを同定し、 セクレターゼの APP 以外の分子の切断に影響を及ぼさないリン酸化阻害剤を開発する。特にダウン症患者は早期からアルツハイマー病様病理を示すことから、ダウン症患者でトリソミーになっている 21 番染色体上に存在し、タンパク質のリン酸化や脱リン酸化に関与し得る DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A) や RCAN1 (regulator of calcineurin 1) に注目する。

(2) 同定したキナーゼや DYRK1A、RCAN1 がアルツハイマー病の発症に関係する分子と相互作用があるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ベクター p0TB7 に挿入された RCAN1 のクローン (IRAL015A23) を理研バイオリソースセンターから入手した。IRAL015A23 を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応を行って RCAN1 cDNA を増幅し、哺乳類細胞発現用ベクター

pcDNA3.1 に組み込んだ。DYRK1A の哺乳類細胞発現用プラスミドは京都大学大学院生命科学部研究科の宮田愛彦先生に分与していただいた (Ref.)。NEP の哺乳類細胞発現用プラスミドは長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の岩田修永先生に分与していただいた。

(2) スウェーデン型変異 APP を安定形質的に発現するヒト神経膠腫細胞 H4 細胞 (APP^{sw}-H4 細胞) および野生型 APP を安定形質的に発現する H4 細胞 (APP-H4 細胞) は埼玉医科大学医学部の丸山敬先生に分与していただいた (Ref.)。タウを安定形質的に発現するマウス神経芽細胞腫 Neuro2A 細胞 (Tau-Neuro2A 細胞) は新潟大学脳研究所の池内健先生に分与していただいた (Ref.)。ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に NEP 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導入し、G418 を含む培地で選別した (NEP-SH-SY5Y 細胞)。同様に、APP^{sw}-H4 細胞に DYRK1A または RCAN1 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導入し、G418 を含む培地で選別した (DYRK1A-APP^{sw}-H4 細胞または RCAN1-APP^{sw}-H4 細胞)。これらの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% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) および 100 U/mL ペニシリンと 100 μg/mL ストレプトマイシンを含む培地で培養した。健康由来皮膚線維芽細胞 Hs68、TIG-119、TIG-120 およびダウン症患者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。Hs68 は DMEM に 10% FBS および 100 U/mL ペニシリンと 100 μg/mL ストレプトマイシンを含む培地で培養した。TIG-119 および TIG-120 はイーグル最小必須培地 (minimum essential medium, MEM) に 10% FBS および 100 U/mL ペニシリンと 100 μg/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 μg/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。

(3) 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 で保存した。培養上清は全量をチューブに回収し、4 /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。細胞は冰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。-80 で保存した細胞は 1% または 0.5% Triton X-100 を含む溶液で可溶化し、タンパク質濃度を定量して可溶化溶液で調整した。

(4) 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、電子とメーターでバンドを検出した。

(5) 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 (Ref.)。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-Ala-Ala-Phe-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 Thiorphan による活性の低下に基づいて決定した。

(6) すべての実験データの数値は平均値 \pm 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学生 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) APPsw-H4 細胞に DYRK1A または RCAN1 の発現プラスミドを一過性に導入し、ウエスタンブロット法で全長型 APP または CTF および細胞内領域の Thr668 がリン酸化した全長型 APP または CTF を検出し、リン酸化の割合を全体量との比として算出した。その結果、DYRK1A を一過性に過剰発現させると、APP の細胞内領域の Thr668 のリン酸化が有意に亢進した。一方、RCAN1 の一過性の過剰発現では APP の Thr668 のリン酸化は亢進しなかった。

(2) Tau-Neuro2A 細胞に DYRK1A または RCAN1 の発現プラスミドを一過性に導入し、ウエスタンブロット法でタウおよびリン酸化タウ (Thr212 および Ser396) を検出し、リン酸化の割合を全体量との比として算出した。その結果、DYRK1A または RCAN1 を一過性に過剰

発現させると、タウの Thr212 および Ser396 のリン酸化が有意に亢進した。

(3) DYRK1A-APPsw-H4 細胞 または RCAN1-APPsw-H4 細胞で培養上清中に分泌される A 量を定量的ウエスタンブロット法で定量した。その結果、APPsw-H4 細胞と比較して DYRK1A または RCAN1 を安定形質的に発現させると、有意に A 量が増加した (図 1)。

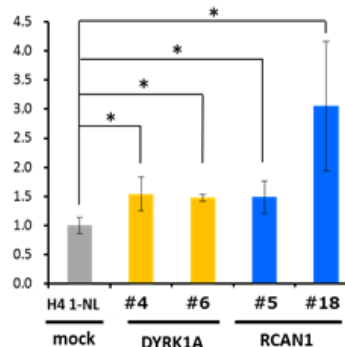


図 1. DYRK1A または RCAN1 の発現細胞における A の分泌量

(4) APP-H4 細胞に DYRK1A または RCAN1 の発現プラスミドを一過性に導入し、NEP 依存的中性エンドペプチダーゼ活性を間接的共役酵素アッセイ法で測定した。その結果、DYRK1A または RCAN1 を一過性に過剰発現させると NEP の活性が有意に低下した。

(5) NEP-SH-SY5Y 細胞に DYRK1A または RCAN1 の発現プラスミドを一過性に導入し、NEP 依存的中性エンドペプチダーゼ活性を間接的共役酵素アッセイ法で測定した。その結果、DYRK1A または RCAN1 を一過性に過剰発現させると NEP の活性が有意に低下した。

(6) DYRK1A-APPsw-H4 細胞 または RCAN1-APPsw-H4 細胞に RCAN1 または DYRK1A の発現プラスミドをそれぞれ一過性に導入し、NEP 依存的中性エンドペプチダーゼ活性を間接的共役酵素アッセイ法で測定した。その結果、DYRK1A または RCAN1 が単独で過剰発現している細胞と比較して共発現によって NEP の活性が有意に低下した。

(7) NEP-SH-SY5Y 細胞に DYRK1A、RCAN1 または DYRK1A と RCAN1 の発現プラスミドを一過性に導入し、ウエスタンブロット法で NEP の細胞内領域のリン酸化を検出し、リン酸化の割合を全体量との比として算出した (Ref.)。その結果、DYRK1A または RCAN1 を一過性に過剰発現させると、NEP の細胞内領域の Ser6、Thr15、Thr25 のリン酸化が有意に亢進した。一方、Ser4 および Thr11 に対しては変化が見られなかった。

(8) ダウン症患者由来線維芽細胞 2 例 (Detroit 532、Detroit 539) と健常者由来線維芽細胞 3 例 (Hs68、TIG-119、TIG-120) における NEP 依存的な中性エンドペプチダーゼ活性を間接的共役酵素アッセイ法で測定した。その結果、ダウン症患者由来線維芽細胞では NEP の活性が有意に低下していた (図 2)。

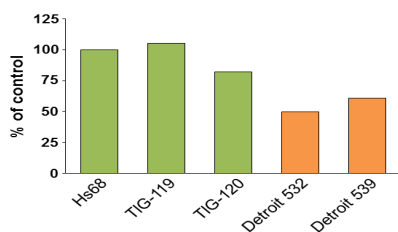


図 2. 健常者由来線維芽細胞 (Hs68、TIG-119、TIG-120) とダウン症患者由来線維芽細胞 (Detroit 532、Detroit 539) におけるネプリリン活性の比較

(9) APP^{sw-H4} 細胞を DYRK1A 阻害剤で処理した結果、培養上清中に分泌された A β 量が有意に減少した。

< 引用文献 >

Asai M, Yagishita S, Iwata N, Saido TC, Ishiura S, Maruyama K, An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments *via* cathepsin B in a human neuroglioma model, *FASEB Journal*, Vol.25, No.10, 2011, pp.3720-3730

Miyata Y, Nishida E, DYRK1A binds to an evolutionarily conserved WD40-repeat protein WDR68 and induces its nuclear translocation, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol.1813, No.10, 2011, pp.1728-1739

Asai M, Iwata N, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K, Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- β peptide for Alzheimer's disease, *Journal of Neuroscience Research*, Vol.88, No.16, 2010, pp.3588-3597

Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M, Ikeuchi T, Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid- β at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3 signaling pathway, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.287, No.42, 2012, pp.35222-35233

Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufienbiel M, Muramatsu S, Saido TC, Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice, *Scientific Reports*, No.3, 2013, 1472

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, *Journal of Biological Chemistry*, Vol.287, No.35, 2012, pp.29362-29372

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

浅井将、神経変性疾患における新しい注目遺伝子 *C9orf72*, *日本薬理学雑誌*、査読有、Vol.145, No.1, 2015, p.44, DOI:10.1254/fpj.145.44

Jiang H, Wu Cheng X, Shi GP, Hu L, Inoue A, Yamamura Y, Wu H, Takeshita K, Li X, Huang Z, Song H, Asai M, Hao CN, Unno K, Koike T, Oshida Y, Okumura K, Murohara T, Kuzuya M, Cathepsin K-mediated notch1 activation contributes to neovascularization in response to hypoxia, *Nature Communications*, 査読有, No.5, 2014, 3838, DOI:10.1038/ncomms4838

浅井将、城谷圭朗、近藤孝之、井上治久、岩田修永、孤発性および家族性アルツハイマー病患者由来 iPS 細胞を用いたアルツハイマー病の病態解析, *日本薬理学雑誌*、査読有、Vol.143, No.1, 2014, pp.23-26, <http://doi.org/10.1254/fpj.143.23>

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL,

Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H, Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A and differential drug responsiveness, Cell Stem Cell, 査読有, Vol.12, No.4, 2013, pp.487-496, DOI:10.1016/j.stem.2013.01.009

Iwata N, Sekiguchi M, Hattori Y, Takahashi A, Asai M, Ji B, Higuchi M, Staufenbiel M, Muramatsu S, Saïdo TC, Global brain delivery of neprilysin gene by intravascular administration of AAV vector in mice, Scientific Reports, 査読有, No.3, 2013, 1472, DOI:10.1038/srep01472.

岩田修永、城谷圭朗、浅井将、アルツハイマー病の新展開 ~とくに薬物療法について~、難病と在宅ケア、査読有、Vol.18、No.11、2013、pp.49-52、

岩田修永、浅井将、N ピログルタミル化したアミロイドの病的メカニズムとピログルタミル化酵素阻害薬による治療の可能性、臨床神経学、査読有、Vol.52、No.11、2012、pp.1162-1164、<http://doi.org/10.5692/clinicalneuro.1.52.1162>

〔学会発表〕(計41件)

池原健太、樋口恵理、平山未央、大槻純男、浅井将、城谷圭朗、岩田修永、新規アルツハイマー病リスク因子による発症メカニズムの解析、第31回日本薬学会九州支部大会、2014年12月6日、第一薬科大学(福岡県・福岡市)

浅井将、能登雄太、久松翼、森田知樹、城谷圭朗、丸山敬、大河内正康、武田雅俊、岩田修永、第III相臨床試験薬 Semagacestat (LY450139)による認知機能悪化の原因解析、第33回日本認知症学会学術集会、2014年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

小出恵理子、森田知樹、渡辺かおり、近藤孝之、浅井将、城谷圭朗、井上治久、岩田修永、アルツハイマー病患者 iPSC 細胞由来神経細胞におけるオートファジーの機能破綻、第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2014年8月8日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

関恒慶、小林千浩、八幡直樹、浅井将、岩田修永、井上治久、戸田達史、神経系

細胞分化過程の遺伝子解析によるアルツハイマー病病態制御遺伝子の検索、第55回日本神経学会学術大会、2014年5月23日、福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター(福岡県・福岡市)

浅井将、城谷圭朗、岩田修永、疾患 iPSC 細胞を用いたアルツハイマー病オリゴマー仮説の検証、日本薬学会第134年会、2014年3月29日、ホテル日航熊本・熊本大学黒髪キャンパス・熊本市総合体育館など(熊本県・熊本市)

Asai M、Drug development for an Alzheimer's disease subtype with intracellular accumulation of oligomeric forms of amyloid-peptide, The 1st International Symposium "Dejima Challenge for Therapeutic Innovation", 2014年3月14日、長崎大学(長崎県・長崎市)

川久保昂、金城亜衣美、池原健太、浅井将、城谷圭朗、岩田修永、DYRK1A と RCAN1 はアルツハイマー病のアミロイドおよびタウ病理を悪化させるデュアルモジュレーターである、第30回日本薬学会九州支部大会、2013年12月8日、長崎国際大学(長崎県・佐世保市)

中野梨絵、浅井将、近藤孝之、月田香代子、渡辺かおり、門谷千恵、村上一馬、入江一浩、Klein WL、森啓、丸山敬、朝田隆、城谷圭朗、井上治久、岩田修永、アルツハイマー病患者 iPSC 細胞由来神経系細胞における A_β オリゴマーの細胞毒性、第32回日本認知症学会学術集会、2013年11月8日、キッセイ文化ホール・松本市総合体育館(長野県・松本市)

浅井将、中野梨絵、荒木希、渡辺かおり、八幡直樹、関恒慶、小林千浩、戸田達史、城谷圭朗、井上治久、岩田修永、神経分化過程における A_β 40 と A_β 42 の産生比の変化とその責任遺伝子の解析、第86回日本生化学会大会、2013年9月13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Asai M, Kondo T, Shirota K, Tsukita K, Watanabe K, Maruyama K, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Inoue H, Iwata N, Modeling Alzheimer's disease using iPSC cells reveals stress phenotypes associated with intracellular A_β-amyloid oligomer and differential drug responsiveness, Alzheimer's Association

International Conference® 2013、2013
年7月14日、Boston (USA)

Asai M, Yahata N, Iwata N, Inoue H,
Anti-A drug validation using human
iPS cell-derived neurons for the
treatment of Alzheimer's disease, The
11th International Conference On
Alzheimer's & Parkinson's Diseases,
2013年3月7日、Florence (Italy)

柳下聡介、浅井将、岩田修永、西道隆臣、
石浦章一、丸山敬、カテプシン B を介し
たアミロイド前駆体タンパク質の代謝経
路、第127回日本薬理学会関東部会、2012
年10月20日、東京国際フォーラム(東
京都・千代田区)

〔図書〕(計1件)

高橋茜、城谷圭朗、浅井将、岩田修永、
西道隆臣、株式会社技術情報協会、遺伝
子治療・診断の最先端技術と新しい医薬
品・診断薬の開発(第7章15節アルツ
ハイマー病の遺伝子治療)、2014、366-372

〔ウェブサイト〕(計1件)

岩田修永、城谷圭朗、浅井将、脳科学辞
典(ネプリライシン)
[http://bsd.neuroinf.jp/wiki/ネプリラ
イシン](http://bsd.neuroinf.jp/wiki/ネプリライシン)
DOI:10.14931/bsd.3557

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：新規アルツハイマー病治療薬
発明者：岩田修永、城谷圭朗、浅井将、田中
隆
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014-226236
出願年月日：2014年11月6日
国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：アルツハイマー病の治療薬および/ま
たは予防薬のスクリーニング方法
発明者：井上治久、高橋良輔、近藤孝之、岩
田修永、浅井将
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2013/054199
出願年月日：2013年2月20日
取得年月日：2013年9月26日
国内外の別：国際

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/biot
ech/index-j.html](http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/biot
ech/index-j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 将 (ASAI, Masashi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・
助教
研究者番号： 90383223

(2) 研究分担者

なし