

線維芽細胞のアミロイド分解酵素活性から予測する アルツハイマー病の発症年齢と活性増強剤の開発

東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科

助教 浅井 将

(共同研究者)

株式会社ペプチド研究所 研究員 吉矢 拓

はじめに

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。しかしながら、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り、現在、臨床使用されている薬剤には根本的治療薬は存在しない⁽¹⁾。ADの根本的治療には脳内の一次病因物質である β アミロイド (amyloid- β peptide, A β) を減少させる必要があり、A β の産生阻害や分解促進、凝集抑制、沈着A β の除去等が標的となっている。近年、A β 産生を担う酵素に対する阻害剤の臨床試験が行われてきたが、副作用等の問題から相次いで開発中止となっている^(2,3)。

脳内におけるA β は産生と分解で平衡を保っており⁽⁴⁾、後者のA β 分解系ではネプリライシン (neprilysin, NEP) と呼ばれる膜結合型の中性エンドペプチダーゼが主に機能する⁽⁴⁾。NEPは、加齢やADの病態進行に伴って発現が低下することが知られている⁽⁵⁾。AD患者脳ではA β が豊富に存在することから、NEPの活性増強は重篤な副作用を引き起こさず、原因に即した治療法となり得る。

我々は、早期からADを発症するダウン症 (Down syndrome, DS) 者の線維芽細胞を用いた解析から、DS者ではNEP活性が低下していることを明らかにした⁽⁶⁾。DS者では21番染色体が3本になっていることから、DS者におけるNEP活性の低下の要因も21トリソミーが寄与していると考えられた。

結 果

DS者由来線維芽細胞で見られたNEP活性の低下の要因を明らかにするために、線維芽細胞におけるNEPの発現レベルをリアルタイムPCRおよびウエスタンブロットで解析した(図1)。その結果、DS者由来線維芽細胞では対照細胞と比較して有意にNEPの発現がmRNAレベルおよびタンパク質レベルで低下していた。

次に、ヒト胎児腎由来HEK293細胞からゲノムDNAを抽出し、転写開始部位の上流

916 bp また下流 661 bp をクローニングしてルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入されるよう pGL4.10 [luc2] ベクターに組込んだ。当該領域について転写因子の制御領域のモチーフ探索サイトである JASPAR で解析した (図 2)。その結果、転写因子 Homeobox protein BarH-like 1 (BARX1) が 8 ヶ所の部位で結合することが示唆された。

図 1

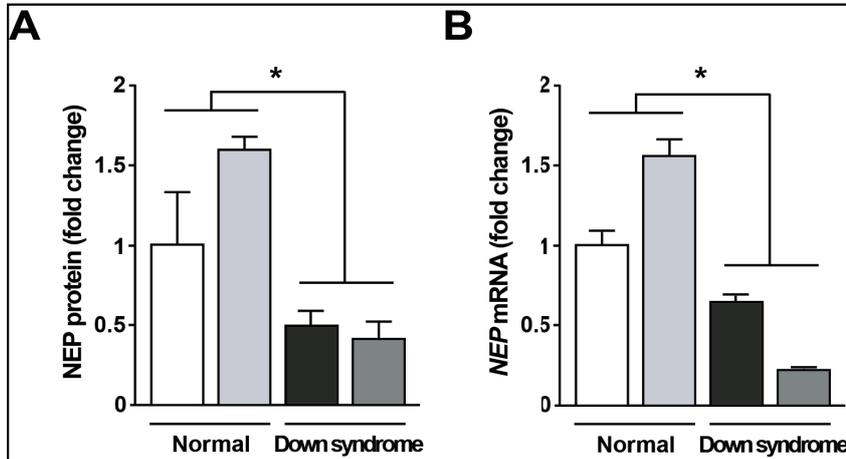


図 2



さらに21番染色体のDS責任領域に存在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)の阻害剤であるharmine処理によってNEP活性が回復することから⁽⁶⁾、DYRK1Aを阻害する化合物は有用なAD治療薬となり得ると考えられる。そこでDYRK1Aの阻害活性を有する化合物を探索した結果、いくつかの誘導体で阻害活性が見出された。

考 察

DS者では40代という早期からADを発症することが知られている。その原因は、21番染色体に存在するAβの前駆体をコードするAPP遺伝子の過剰発現と考えられてきた。さらに、APPの過剰発現に加え、21番染色体のDS責任領域に存在するキナーゼDYRK1Aの過剰発現もADの発症や病態の進行に大きく関与することが明らかになりつつある。

DS者由来線維芽細胞ではNEPの活性が有意に低下することが知られていたが⁽⁶⁾、その要因の一つはDYRK1AによるNEPのリン酸化である⁽⁶⁾。さらに本研究により、NEPの発現レベルの低下でNEP活性の低下が引き起こされることが明らかとなった(図1)。NEPの発現レベルの低下は、推定プロモーター領域のデータベース解析から転写因子としてBARX1が示された(図2)。興味深いことに、BARX1の発現は、DYRK1Aのトランスジェニックマウスで有意に低下していることが示されており⁽⁷⁾、DYRK1Aの過剰発現は酵素学的にNEPの活性を低下させると共に、発現レベルでも関与する可能性が示唆された。また、DS者でトリソミーとなっている21番染色体には、DS児の白血病発症に関与する可能性が指摘されているRUNX1をはじめ、BACH1、GABPA、ERG、ETS2、SIM2等の転写因子をコードする遺伝子が存在するから、これらの転写因子による発現制御も否定できない。

DYRK1Aは、AD脳に特徴的な病理蓄積物である老人斑や神経原線維変化の主成分であるそれぞれAPP⁽⁸⁾やタウ^(9,10)のリン酸化に関与する。つまり、DYRK1Aの過剰発現はADの病態に対して、極めて増悪的に作用する。そのことから、DYRK1Aの阻害剤はADの有用な治療薬になり得る。DYRK1Aの阻害活性を有する化合物として、没食子酸エピガロカテキン(epigallocatechin gallate, EGCG)やharmine、quinalizarin、lamellarin、meridianin等が知られる⁽¹¹⁾。これらの天然由来化合物または誘導体によるさらなる研究が望まれる。

本邦では2025年に認知症患者が700万人に達することが予想されている。認知症の半数以上はADであることから、AD治療薬のブレイクスルーが望まれる。特に、DS者においては十分な収入が得られる職業に就くことはしばしば困難であり、その両親は高齢化から必ずしも生涯支援することはできないかもしれない。近年、DS児の出生が倍増し、DS者の寿命は飛躍的に延長していることから、DS者のAD対策は、孤発性のAD患者と同様に社会全体で取り組むべき喫緊の課題である。21番染色体に着目したAD研究により、DS者およびAD患者双方に有用な創薬のブレイクスルーに期待したい。

要 約

DS者由来線維芽細胞におけるNEP活性の低下は、NEPの翻訳後修飾および発現の調節不全によって起き、これにはDS者でトリソミーになっている21番染色体に存在するDYRK1Aが深く関与していることが示唆された。DYRK1AはAPPやタウのリン酸化にも関与することから、未だ根本的治療薬が存在しないADの創薬標的として可能性を秘めており、さらなる開発が望まれる。

文 献

1. Cummings J, Lee G, Ritter A, Zhong K: Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018, *Alzheimers Dement*, 4:195 – 214, (2018)
2. Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH; Tarenflurbil Phase 3 Study Group: Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial, *JAMA*, 302:2557 – 2564, (2009)
3. Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS; Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R; Semagacestat Study Group: A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease, *N Engl J Med*, 369:341 – 350, (2013)
4. Saido TC: Metabolism of amyloid β peptide and pathogenesis of Alzheimer's disease, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 89:321 – 339, (2013)
5. Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL: Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain, *Brain Res*, 919:115 – 121, (2001)
6. 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*, 40:327 – 333, (2017)
7. Nguyen TL, Duchon A, Manousopoulou A, Loaëc N, Villiers B, Pani G, Karatas M, Mechling AE, Harsan LA, Limanton E, Bazureau JP, Carreaux F, Garbis SD, Meijer L, Herault Y: Correction of cognitive deficits in mouse models of Down syndrome by a pharmacological inhibitor of DYRK1A, *Dis Model Mech*, 11. pii: dmm035634, (2018)
8. Ryoo SR, Cho HJ, Lee HW, Jeong HK, Radnaabazar C, Kim YS, Kim MJ, Son MY, Seo H, Chung SH, Song WJ: Dual-specificity tyrosine (Y) -phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease, *J Neurochem*, 104:1333 – 1344, (2008)
9. Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Nuripa A, Kida T, Kazui H, Hashimoto R, Tanaka T, Kudo T, Yamagata H, Tabara Y, Miki T, Akatsu H, Kosaka K, Funakoshi E, Nishitomi K, Sakaguchi G, Kato A, Hattori H, Uema T, Takeda M: The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome

- critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease, *Human Mol Genet*, 16:15 – 23, (2007)
10. Ryoo SR, Jeong HK, Radnaabazar C, Yoo JJ, Cho HJ, Lee HW, Kim IS, Cheon YH, Ahn YS, Chung SH, Song WJ: DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease, *J Biol Chem*, 282:34850 – 34857, (2007)
 11. Asai M, Yoshiya T, Tanuma S, Uchiumi F: DYRK1A as a potential pharmacological target for the treatment of Alzheimer's disease, Bentham Science Publishers, (in press)