

## 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

浅井 将,\* 川久保 昂, 森 亮太郎, 岩田修永

**Elucidating Pathogenic Mechanisms of Early-onset  
Alzheimer's Disease in Down Syndrome Patients**Masashi Asai,\* Takashi Kawakubo, Ryotaro Mori, and Nobuhisa Iwata  
*Department of Genome-based Drug Discovery, Graduate School of Biomedical Sciences,  
Nagasaki University; 1-4 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan.*

(Received September 8, 2016)

Down syndrome (DS) patients demonstrate the neuropathology of Alzheimer's disease (AD) characterized by the formation of senile plaques and neurofibrillary tangles by age 40–50 years. It has been considered for a number of years that 1.5-fold expression of the gene for the amyloid precursor protein (APP) located on chromosome 21 leading to overproduction of amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) results in the early onset of AD in adults with DS. However, the mean age of onset of familial AD with the Swedish mutation on APP which has high affinity for  $\beta$ -secretase associated with a dramatic increase in  $A\beta$  production is about 55 years. This paradox indicates that there is a poor correlation between average ages of AD onset and the theoretical amount of  $A\beta$  production and that there are factors exacerbating AD on chromosome 21. We therefore focused on dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), since overexpressing transgenic mice show AD-like brain pathology. The overexpression of *DYRK1A* caused suppression of the activity of neprilysin (NEP), which is a major  $A\beta$ -degrading enzyme in the brain, and phosphorylation at the NEP cytoplasmic domain. NEP activity was markedly reduced in fibroblasts derived from DS patients compared with that in fibroblasts derived from healthy controls. This impaired activity of NEP was rescued by DYRK1A inhibition. These results show that *DYRK1A* overexpression causes suppression of NEP activity through its phosphorylation in DS patients. Our results suggest that DYRK1A inhibitors could be effective against AD not only in adults with DS but also in sporadic AD patients.

**Key words**—Alzheimer's disease; amyloid- $\beta$  peptide; Down syndrome; dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A; neprilysin

## はじめに

日本産婦人科医会の全国調査の分析で、ここ15年でダウン症 (Down syndrome; DS) 児の出生が倍増したことが明らかとなった。1995年では1万人あたり6.3人なのに対し、2011年では13.6人であった。このような傾向は日本のみならず、米国でも同様である。2009年、Shinらは米国10の地域において1979年から2003年までにDS児の出生が31.1%増加していたことを報告した。<sup>1)</sup> DS児の出生は母親の年齢と大きく相関し、母親の年齢が20歳の場合DS児の出生リスクは1/1667、30歳では

1/952、40歳では1/106になると言われている。そのため、近年のDS児の出生の増加は晩婚化や女性の社会進出等による出産年齢の上昇が主な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患者は、低身長や特異的顔貌、肥満、筋力低下、頸椎不安定性、皮膚斑状模様等の身体的特徴に加え、先天性心疾患、整形外科的疾患 (頸椎の不安定性等)、白血病、内分泌障害 (甲状腺機能低下症等)、消化器疾患、耳鼻科的疾患、眼科的疾患、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) 様の認知症等の合併症を併発する。かつてDS患者は、先天性の心疾患や消化器疾患等の影響で成人を迎えることは難しいとされていた。しかしながら、医学の進歩によって1920年代には10歳にも満たなかったDS患者の平均寿命は2000年には約50歳となり、現在では60歳まで存命のDS患者もおられる。<sup>2)</sup>

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒852-8521 長崎市文教町1-14)

\*e-mail: asai@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第136年会シンポジウムS54で発表した内容を中心に記述したものである。

残念なことに、DS 患者における平均寿命の延長は手放しで喜べることではない。DS 患者は健常者と比較して早期から AD 様の病理を呈するため、加齢が最大の危険因子である AD の発症リスクを高めることにほかならないからである。それでは、なぜ DS 患者は健常者と比較して早期から AD 様病理を呈するのか。本稿では、われわれが得た最近の結果を踏まえて DS と AD の関連性を概説する。

### 1. AD の発症年齢と A $\beta$ 産生量の関係

AD 患者の脳内には、アミロイド  $\beta$  ペプチド (amyloid- $\beta$  peptide; A $\beta$ )、過剰リン酸化タウそれぞれを主成分とする老人斑、神経原線維変化といった異常構造物が観察される。<sup>3)</sup> 老人斑はそのほかの神経変性疾患の中でも AD に対して特異性の高い病理であり、老人斑が神経原線維変化に先立って出現することから、老人斑の主成分である A $\beta$  の沈着が AD 発症の発端となると考えられている。AD の発症は数十年という歳月がかかって、「A $\beta$  の沈着」→「過剰リン酸化タウの蓄積」→「神経機能障害・神経変性」→「認知症の発症」という経過を辿り、この発症仮説は「アミロイド仮説」と呼ばれている。<sup>4)</sup>

A $\beta$  は、アミロイド前駆体タンパク質 (amyloid precursor protein; APP) から  $\beta$  及び  $\gamma$  セクレターゼの二段階切断によって産生されるアミノ酸 38-43 残基からなるペプチドである。<sup>5)</sup> 産生された A $\beta$  はネプリライシン (neprilysin; NEP) と呼ばれる酵素によって速やかに分解され、基底状態では産生と分解の間で均衡を保たれている。<sup>6)</sup> しかしながら、この均衡がなんらかの要因で産生側に傾くと A $\beta$  が沈着することとなり、AD 発症の引き金になると考えられている。A $\beta$  の前駆体である APP をコードする遺伝子は 21 番染色体に存在する。DS 患者は 21 番染色体が 3 本になっていることから、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 $\beta$  が 1.5 倍産生される。つまり、このことこそが DS 患者が早期から AD 様の病理を呈する原因として考えられてきた。

AD は、大多数を占める 65 歳以降に発症する孤発性 AD と少数の遺伝性の家族性 AD に大別される。家族性 AD の中で最も有名な家系の 1 つにスウェーデン型変異を有する家系が存在する。この家系では、APP の  $\beta$  セクレターゼ切断部位のリジン

及びメチオニンがそれぞれアスパラギン及びロイシンに変異した APP を発現する。この変異によって  $\beta$  セクレターゼと APP の親和性が増大し、結果として A $\beta$  の総量が 3-8 倍に増加する。<sup>7)</sup>

このスウェーデン型変異を有する家族性 AD と DS 患者における AD 発症年齢を比較すると大きな疑問が生じてくる。前者における AD の平均発症年齢は 55 歳であり、後者における AD 様症状の発症は 40-50 代である。前者の A $\beta$  の産生量は健常者と比較して 3-8 倍であり、後者の A $\beta$  の理論産生量は 1.5 倍であることから、(1) AD の発症年齢は A $\beta$  の産生量と相関しないこと、また (2) 21 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。

### 2. DS 責任領域に存在するセリン/スレオニンキナーゼをコードする DYRK1A

推定遺伝子を合わせると、21 番染色体には 225 個の遺伝子が存在する。この中には APP 遺伝子を含め、複数の遺伝子が AD との関連性が報告されている。中でもわれわれは、AD の発症に関与する増悪因子として DS の責任領域に存在するリン酸化酵素であ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) に着目した。

DYRK1A はアミノ酸残基 763 個からなるセリン/スレオニンキナーゼであり、様々な基質のリン酸化を触媒する。脳の発達や機能に不可欠な酵素であり、トランスジェニックマウスは認知機能異常を呈することが報告されている。<sup>8)</sup> 神経原線維変化の主成分であるタウ<sup>9)</sup> や APP<sup>10)</sup> のリン酸化に関与し、AD の病態を加速させるように作用する。核移行配列を有するため、核と細胞質の双方に局在する。核では転写因子である活性化 T 細胞核内因子 (nuclear factor of activated T-cells; NFAT) をリン酸化して負に制御しており、<sup>11)</sup> 細胞質では前述のタウや APP のほかに  $\alpha$  シヌクレインや Notch のリン酸化にも係わる。<sup>12)</sup>

DS 患者における AD 研究は、21 番染色体に APP をコードする遺伝子が存在し、APP の過剰発現が引き起こされることから A $\beta$  の産生系に注力されてきた。一方、A $\beta$  の分解系についての研究は進んでおらず、未解明な点が多い。そこでわれわれは、A $\beta$  の主要分解酵素であるネプリライシン NEP と

DYRK1A についての研究を行った。

### 3. DYRK1A のリン酸化による NEP 活性の低下

DS 患者では DYRK1A が過剰発現していることから、まずわれわれは神経系の株化細胞に DYRK1A を過剰発現させ、この細胞における NEP 活性を間接的共役酵素測定法によって測定した。この方法<sup>13)</sup>は、特異的な蛍光性人工基質である succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-phenylalanine 4-methylcoumaryl-7-amide と細胞のライセートを反応させ、産生された L-phenylalanine 4-methylcoumaryl-7-amide をロイシニアミノペプチダーゼで切断することによって二段階の酵素反応を行って 7-アミノ-4-メチルクマリン (7-amino-4-methylcoumarin; AMC) を遊離させる。遊離した AMC を励起波長 390 nm、蛍光波長 460 nm にて測定し、NEP 特異的阻害剤である thiorphan による活性低下量を差し引いて算出する。その結果、対照となる空ベクターを導入した群と比較して、DYRK1A cDNA 導入群では NEP 活性が有意に低下していた。

NEP は II 型膜タンパク質であり、N 末端側の短い細胞質領域と活性中心が存在する C 末端側の細胞外領域からなる。細胞質領域には 5 個のセリン又はスレオニンが存在し、リン酸化によって NEP の局在や活性が変化することが示されている。<sup>14)</sup>次に、DYRK1A によって NEP の細胞内領域内に存在するセリン又はスレオニンがリン酸化されるか特異的リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法によって定量した。その結果、対照となる空ベクターを導入した群と比較して、DYRK1A cDNA 導入群では 6 番目のセリン及び 15 番目、25 番目のスレオニンのリン酸化が亢進していた。残りの 4 番目のセリン及び 11 番目のスレオニンでは明らかな変化を示さなかった。

DYRK1A の過剰発現によって NEP の細胞内領域の一部のアミノ酸残基のリン酸化が亢進し、NEP の活性が低下したことから、DYRK1A はリン酸化を介して NEP を負に制御することが示唆された。そこで、実際に DS 患者でも同様のことが起こっているのか、DS 患者由来の線維芽細胞を用いて検討した。健常者由来線維芽細胞を 2 例、DS 患者由来線維芽細胞を 2 例それぞれ培養し、これらの細胞における NEP 活性を間接的共役酵素測定法によって測定した。その結果、健常者由来線維芽細胞

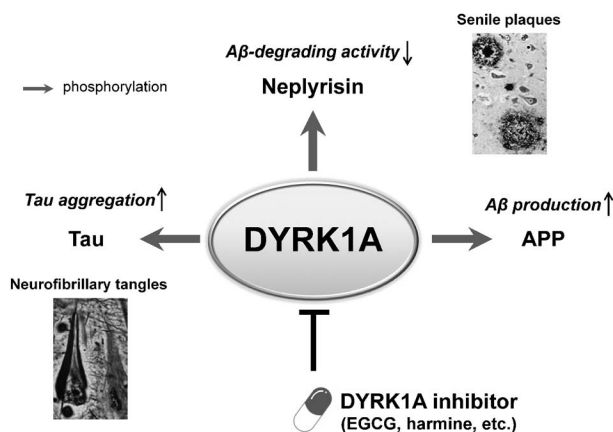


Fig. 1. DYRK1A Functions as a Triple Modulator to Develop Alzheimer's Disease

DYRK1A phosphorylates tau, amyloid precursor protein (APP), and neprilysin to exacerbate Alzheimer's disease. People with Down syndrome are vulnerable to Alzheimer's disease because of not only amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) overproduction through APP overexpression but also reduced neprilysin activity (=  $A\beta$ -degrading activity). DYRK1A inhibitors are a potent candidate for Alzheimer's disease therapy in both Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease patients.

と比較して、DS 患者由来線維芽細胞では NEP 活性が有意に低下していた。

さらに DYRK1A 阻害を介して NEP の活性回復・増強効果が見込まれるか、DYRK1A に対する遺伝学的又は薬理的阻害を行って検討した。DS 患者由来線維芽細胞に DYRK1A に特異的な低分子 2 本鎖 RNA (small interfering RNA; siRNA) を導入し、対照 siRNA 導入群と比較した結果、有意に NEP 活性が増強した。また、DS 患者由来線維芽細胞を DYRK1A に対して阻害作用を有する harmine で処理し、溶媒処理群と比較しても有意に NEP 活性が増強することがわかった。

これらの結果から、過剰発現した DYRK1A は NEP の細胞内領域をリン酸化することによって活性を減弱させ、その効果は DYRK1A の阻害によって回復し得ることが明らかとなった。21 トリソミーとなっている DS 患者では、APP の過剰発現を起因とする  $A\beta$  の過剰産生に加え、DYRK1A の過剰発現によって  $A\beta$  の分解系にもブレーキを掛けた状態になっている。そのため、 $A\beta$  の産生と分解の間の均衡が極端に崩れ、脳内における  $A\beta$  の沈着が加速度的に進行することによって、理論上 1.5 倍に増えた  $A\beta$  量から推定される発症年齢よりも早期から AD 様の病理を呈するのかもしれない。

## おわりに

NEP 活性の低下は、加齢や AD の病態の進行に伴って起こることが知られており、<sup>6)</sup> 孤発性 AD では NEP による A $\beta$  の分解活性の低下が AD の一因になっていることが示唆されている。一方、DYRK1A は AD 脳での発現亢進が報告されている。<sup>15)</sup> これらのことは、DS 患者のみならず、孤発性 AD 患者に対しても DYRK1A 阻害を介した NEP 活性増強は原因に即した治療戦略であり、重篤な副作用が少ないことが予想される。

近年、緑茶中に含まれる没食子酸エピガロカテキン (epigallocatechin gallate; EGCG) の服用で DS 患者の認知機能が向上するという臨床結果が報告された。<sup>16)</sup> EGCG は DYRK1A の阻害作用を有していることから、<sup>17)</sup> de la Torre らは服用した EGCG による DYRK1A 阻害効果を考察している。一方、EGCG には NEP の活性増強作用も既に示されている。<sup>18)</sup> いずれも詳細な作用機序が明らかにされておらず、更なる解析が必要であることは言うまでもないが、DYRK1A 阻害による NEP の活性増強は異なる角度からの傍証によって確立された戦略となりつつある。DYRK1A 阻害剤は AD 治療薬の開発のブレイクスルーとなり得るかもしれない (Fig. 1)。

様々な合併症を併発する DS 患者の多くは精神遅滞がみられるため、十分な収入が得られる職業に就けず、家庭を持つこともしばしば困難である。一方で、その両親は高齢化からかならずしも DS 患者を生涯支援することはできない。今後も増加が予想される DS 患者の AD 対策は、DS 患者やその家族ばかりでなく、医療費や介護問題等社会全体で取り組むべき焦眉の問題であり、われわれの研究がその一助となれば幸いである。

**謝辞** 本研究を行うにあたり、貴重な試料をご提供して頂きました宮田愛彦助教 (京都大学大学院生命科学研究所)、西道隆臣シニアチームリーダー (理化学研究所脳科学総合研究センター)、丸山 敬教授 (埼玉医科大学医学部)、池内 健教授 (新潟大学脳研究所) に深謝致します。

**利益相反** 開示すべき利益相反はない。

## REFERENCES

- 1) Shin M., Besser L. M., Kucik J. E., Lu C., Siffel C., Correa A., Congenital Anomaly Multistate Prevalence and Survival Collaborative, *Pediatrics*, **24**, 1565–1571 (2009).
- 2) Bittles A. H., Glasson E. J., *Dev. Med. Child Neurol.*, **46**, 282–286 (2004).
- 3) Mattson M. P., *Nature*, **430**, 631–639 (2004).
- 4) Hardy J. A., Higgins G. A., *Science*, **256**, 184–185 (1992).
- 5) Gandy S., *J. Clin. Invest.*, **115**, 1121–1129 (2005).
- 6) Iwata N., Higuchi M., Saido T. C., *Pharmacol. Ther.*, **108**, 129–148 (2005).
- 7) Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A. Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I., Selkoe D. J., *Nature*, **360**, 672–674 (1992).
- 8) Park J., Chung K. C., *Exp. Neurobiol.*, **22**, 244–248 (2013).
- 9) Frost D., Meechooet B., Wang T., Gately S., Giorgetti M., Shcherbakova I., Dunckley T., *PLoS One*, **6**, e19264 (2011).
- 10) Ryoo S. R., Cho H. J., Lee H. W., Jeong H. K., Radnaabazar C., Kim Y. S., Kim M. J., Son M. Y., Seo H., Chung S. H., Song W. J., *J. Neurochem.*, **104**, 1333–1344 (2008).
- 11) Mancini M., Toker A., *Nat. Rev. Cancer*, **9**, 810–820 (2009).
- 12) Park J., Song W. J., Chung K. C., *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3235–3240 (2009).
- 13) Asai M., Kinjo A., Kimura S., Mori R., Kawakubo T., Shirotani K., Yagishita S., Maruyama K., Iwata N., *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1646–1652 (2016).
- 14) Kakiya N., Saito T., Nilsson P., Matsuba Y., Tsubuki S., Takei N., Nawa H., Saido T. C., *J. Biol. Chem.*, **287**, 29362–29372 (2012).
- 15) Kimura R., Kamino K., Yamamoto M., Nuri-pa 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., *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 15–23 (2007).
- 16) de la Torre R., de Sola S., Hernandez G., Farré M., Pujol J., Rodriguez J., Espadaler J.

M., Langohr K., Cuenca-Royo A., Principe A., Xicota L., Janel N., Catuara-Solarz S., Sanchez-Benavides G., Bléhaut H., Dueñas-Espín I., Del Hoyo L., Benejam B., Blanco-Hinojo L., Videla S., Fitó M., Delabar J. M., Dierssen M., TESDAD study group, *Lancet*

*Neurol.*, **15**, 801–810 (2016).

- 17) Bain J., McLauchlan H., Elliott M., Cohen P., *Biochem. J.*, **371**, 199–204 (2003).
- 18) Melzig M. F., Janka M., *Phytomedicine*, **10**, 494–498 (2003).