

る微小管と結合して細胞骨格を安定化している。ところが一端神経原線維変化を引き起こすとタウタンパクは微小管に結合せずタウタンパク同士が結合して繊維状の構造物となり、これを神経原線維変化と呼ぶ。正常老化においても神経原線維変化は出現しており、早い人では20代からみられる。75歳ぐらいになるとほぼ全員に神経原線維変化が生じる。神経原線維変化が生じている場所では同時に神経細胞の脱落も起きている。この神経原線維変化が海馬、や大脳皮質に出現するようになるとアルツハイマー病と同じ痴呆症を示すようになります。アルツハイマー病では神経原線維変化のほかに老人斑が生じているのが病理学的特徴です。老人斑が大脳皮質に生じるようになるとアルツハイマー病では神経原線維変化が嗅内野から海馬、大脳皮質へ拡大することが知られている。家族性アルツハイマー病の原因遺伝子のクローニングからもb-アミロイドがアルツハイマー病の原因ではないかと考えられています。ところが、老人斑を生じるAPPマウスでは神経原線維変化が生じていない。つまり、アルツハイマー病が起こるためには老人斑の形成とともに何らかの変化が必要であるということになる。一方、変異タウを発現したマウス脳では加齢に伴ってb-アミロイドの蓄積なしに神経原線維変化が生じる。このマウスではb-アミロイドが神経原線維変化形成を加速することがわかっている。つまりアルツハイマー病発症には脳老化とb-アミロイドが必要条件であるということになる。この研究では重金属とアルツハイマー病発症の関係をb-アミロイドと重金属、または神経原線維変化形成とアルミニウムの影響を試験管内、細胞モデル、動物モデルを用いて調べた。

B. 研究方法

ヒトb-アミロイドペプチド1-40および1-42はペプチド研究所から購入した。これらの合成ペプチドはTFA塩として高速液体クロマトグラフィーにより精製されたものをすべての実験で使用した。

B-アミロイドストック溶液は1 mg/mlになるようにHFIPにペプチドを溶解しシリコンチューブで-20°Cに保存した。

ThTアッセイ：β-アグリゲーションを定量化するためThTの蛍光測定を行った。ストック液のb-アミロイドは凍結乾燥によりHFIPを除去しそこに20mM Tris-Clを加え溶解した。そこに、10 μMになるようにThTを加え96穴ブラックプレート内でインキュベートし、アグリゲーションをexcitation 444nmおよびemission 485nmにて20分間隔で測定した。

OD214によるb-アミロイドアグリゲーションアッセイ：b-アミロイドのトータルアグリゲーションを測定するためインキュベーション後10万G10分超遠心機によりアグリゲーションを沈殿させ最初のアミロイド濃度、および、上清に来るb-アミロイド濃度をOD214で測定し濃度差によって何パーセントのb-アミロイドがアグリゲーションして沈殿になったかを調べた。

CD spectroscopy：b-アミロイドのアグリゲーションの構造を決めるためb-アミロイド溶液を石英キュベットに入れ、CD spectrometerで測定した。

コンゴレッド染色：b-アミロイドの十号により生じたb-アミロイド線維についてベータシート構造を認識する染色剤コンゴレッドで線維を染色し複屈折性を観察した。

電子顕微鏡観察：会合したb-アミロイド

を含む溶液は支持膜に固定されリン酸タングステンによって染色し電子顕微鏡下で観察された。

細胞：毒性試験に用いる細胞としてヒト腎臓由来株化細胞 HEK293 およびラット海馬初代培養細胞を用いた。HEK293 は 10% 牛胎児血清を含む DMEM 中で培養を行った。ラット初代培養細胞は Neurobasal に B27 を添加して培養を行った。

MTT アッセイ： β -会合したアミロイドの毒性は HeK293 細胞またはラット初代培養細胞にアミロイド添加後測定時点で MTT 溶液を培養液に加えさらに 2 時間インキュベーションする。その後細胞は 50% dimethylformamide, 20% SDS 溶液によって溶解し、溶解液を 570nm の吸光度を測定する。吸光度の低下が細胞毒性を示すことになる。

試験管内タウ凝集実験；ヒト 4 リピート、リコンビナントタウは高速液体クロマトグラフにより単離精製されたものを実験に用いた。タウ蛋白はヘパリンまたは AlCl₃ と 37°C でインキュベーションしチオフラビン蛍光で β 凝集を測定し、さらに原子感力顕微鏡にて凝集体の形態を観察した。

細胞培養

N2A 細胞の P 3 0 1 L ヒト型タウを安定的に発現する細胞株は 10%

牛胎児血清を含む DMEM で 5% CO₂ 下で培養を行った。

動物モデル

V337M 変異を持つヒト 4 リピートタウを PDGF プロモーターによって脳で特異的に発現するマウス及び野生型 B 6 マウスを用いて実験を行った。Al マルトースは皮下注入によってマウスに投与された。

アルミニウム定量

脳サンプルは加熱分解し、偏光ゼーマン原

子吸光にて定量した。

C. 研究結果

アミロイド 40 のインキュベーションでは ThT 蛍光は 300 分から上昇するシグモイドカーブを示し、アミロイド 42 ラグタイムなしで ThT が上昇した。20 μ M アルミニウム、鉄、亜鉛、銅を β アミロイドと共にインキュベーションしたところ鉄、アルミニウムの添加によって ThT の増加は立ち上がりが遅くなり最大値も無添加の β アミロイドと比べると減少していた。亜鉛、銅添加では β アグリゲーションによる ThT の増大は完全に抑制された。この傾向はアミロイド 42 を用いても同様であった。即ち、金属イオンの存在は β アミロイドの β 会合に抑制的に作用することが明らかになった。 β 会合抑制の金属濃度は約 0.1 μ M 以上で有意に減少することが示された。一方、Ashley Bush らは亜鉛が β アミロイドの凝集を促進することを報告している。そこで、彼らと同様の方法で β アミロイドの凝集を超速心沈殿法によって分離し OD214 によって測定した。その結果金属がない場合 β アミロイドは 30 分のインキュベーションで約 35% が凝集して沈殿へ回収されていた。亜鉛添加の場合約 90% の β アミロイドが銅も 70% が凝集していることが示された。これらは Bush らの報告と一致するものであった。ThT の結果と合わせて考えると金属の存在は β アミロイドの凝集を促進するがその凝集は β 会合を伴わないと解釈することが出来た。この結果を更に確認するためそれぞれの凝集の CD スペクトルによってその構造を調べた。金属非存在下では β シートを示すのだが、金属存在下では β アミロイドはランダムコイルから β ターン構造へと短時間でシフトした。すなわち

金属の存在は β アミロイドの β 会合を阻止しアモルファスな会合を促進することが示されたのである。これらは更にコンゴレッドを用いた偏光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察によって示された。偏光顕微鏡下では金属非存在かで β アミロイドの凝集体は複屈折性を示したが金属存在下では複屈折性を示さなかった。電子顕微鏡下では金属非存在下の凝集体はベータアミロイド繊維の集合体として捉えられた。しかし、金属存在下では特定の構造を示さないアモルファス凝集体であった。それぞれの凝集体による細胞毒性を HEK293 及びラット海馬初代培養細胞を用いて検討した。金属なしでの β アミロイド凝集体はこれまでの報告どおり MTT の低下を示した。金属存在下で凝集させたアミロイドは金属イオン濃度に依存して β アミロイドの細胞毒性を減弱した。

タウ重合におけるアルミニウムの影響

タウ蛋白をポリアニオンなどとともにインキュベーションするとタウは β シート構造を持つ凝集線維を形成するこれはアルツハイマー病等で見られる PHF と同様のものである。この条件下で 0.2 mM から 20 mM までの濃度範囲で Al をインキュベーション溶液に加えチオフラビンの蛍光測定を行った。0.2 mM アルミニウム添加ではチオフラビン蛍光の立ち上がりまた最大値は 400 時間後に計測されコントロール（何も入れなかった場合）の半分であった。1mM 以上のアルミニウムの添加はチオフラビン蛍光増大を完全に阻害した。原子間顕微鏡観察では明らかなタウ線維の減少が観察された。次にアルミニウムそのものがポリアニオンのようにタウの繊維化を促進するかどうかをヘパリンなしでタウを 0.2 mM から 20 mM までの濃度範囲の Al インキュベ

ートしチオフラビン蛍光を測定したが全く増大を示さなかったが原子間力顕微鏡ではタウの構造物を観察することが出来た。これらの構造物は一定の形態を示さずむしろアモルファス凝集体を形成すると考えられた。すなわち、アルミニウムはタウの β 結合による繊維化を阻害しアモルファス凝集を増大させることが示された。

細胞モデルにおけるアルミニウムの効果

細胞を 0-200 μ M のアルミニウムマルトールで処理し SDS 不溶性タウの形成能を調べた。タウを発現する細胞では 50 μ M アルミニウムで不溶性タウの出現が観察された。CHIP を同時に発現する細胞ではアルミニウム濃度の増大とともに SDS 不溶性タウの量が減少した。これは、アルミニウムによってアモルファスタウ凝集体が SDS 不溶性タウとして生じるが、CHIP、プロテアソーム分解系で容易に分解されるためアルミ濃度の増大とともに生じるアモルファス凝集が分解されるため SDS 不溶性タウが減少すると解釈される。

個体でのアルミニウムの効果

まず、脳内アルミニウム濃度増大を調べるため 3 日間 10, 25, 50 mM アルミニウムマルトール腹腔内に 200 μ l 連続投与した。マウスでは通常 5 μ M のアルミニウムが存在していることが判った。それぞれの濃度のアルミニウム 3 日連続投与後直線的に増大し、それぞれ 9.6, 11, 16 μ M となった。50mM 投与群は肝臓に障害が見られた。脳では神経原線維変化の増大は見られなかった。25mM を選択し 2 週間のアルミニウム連続投与を行った。ここでは最終的に約 20 μ M のアルミニウム脳内濃度となった。しかし、肝臓にやはり異常が見られ脳では何ら異常所見は得られなかった。

D. 考察

疫学的検討から金属イオンはアルツハイマー病の危険因子である可能性が指摘されている。われわれはアルツハイマー病の発症を脳老化と β アミロイドの増大という2つの因子によって引き起こされると考え、今回、 β アミロイドの凝集に対する金属イオンの効果を調べた。これまで報告された結果では金属イオンの存在はアミロイド凝集を促進するというものであった。実際にトータルな凝集程度は金属によって促進されたのであるが、その凝集は β 会合を持たない凝集体であることが示された。おそらく、金属イオンと β アミロイドのヒスチジン残基が結合しそれらが凝集するため β シート構造のような一定の構造を持たない凝集体になるものと予想される。これらが、細胞毒性を持たないという結果はこれまでの β アミロイドの細胞毒性に関する結果を支持するものである。 β アミロイドの毒性は β シート構造を持つ線維状の構造物によって引き起こされることは初期の β アミロイドが毒性を持つか否かの論争から明らかになった事である。近年さらにプロトフィブリルと呼ばれる少なくとも β シート構造を持つ初期のアミロイド凝集体が神経毒性を示すという議論をわれわれの結果は否定しない。すなわち、金属イオン存在下で出来るアミロイド凝集体はベータシート構造をとらないために細胞毒性を示しえないのである。少なくともこれらの結果から金属イオンの存在はアミロイド凝集に対しては逆に β 会合を抑制し細部毒性を減弱することが示された。

アルミニウムの効果を個体、細胞、分子のレベルでタウ重合に関して検討をおこなった。脳内アルミニウムはアルミニウム摂取により蓄積を示すが、脳内の濃度がタウ凝

集を細胞で示す濃度 $50\mu\text{M}$ になる前に内臓の障害が顕著に表れる。これは脳よりも他の臓器にアルミニウムの蓄積が起りやすいことを示している。細胞及び試験管内タウ凝集の実験からはアルミニウムによるタウ凝集はNFTで見られるタウ線維とは異なりアモルファスであり細胞内分解系によって速やかに分解されることが示唆された。

E. 結論

金属イオンの存在はアミロイド凝集に対しては β 会合を抑制し細部毒性を減弱することが示された。アルミニウム摂取は脳よりも他の臓器に異常をもたらす。更にアルミニウムによるタウ凝集はPHFと異なることからアルミニウムのアルツハイマー病発症への寄与は非常に少ないと結論できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takashima A: The role of GSK-3 β in the formation of neurofibrillary tangles. *Psychogeriatrics* 4: 17-22(2004)
Shigetsugu H, Matsumoto M, Kamura T, Murayama M, Chui D-H, Planel E, Takahashi R, Nakayama K-I, and Takashima A: U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J.Neurochem* 91: 299-307 (2004)
Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui

- D-H, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A: Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation: mechanism and implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 2401-2411(2004)
- Hashimoto Y, Tsukamoto E, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Aiso S, Takashima A, Nishimoto I: Amino- and carboxyl-terminal mutants of presenilin 1 cause neuronal cell death through distinct toxic mechanisms: Study of 27 different presenilin 1 mutants. *J Neurosci Res* 75 (3): 417-428 (2004)
- Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 21;100(2):721-6(2003)
- Kwok JBJ, Halliday GM, Brook WS, Dolios G., Laudon H., Murayama, O., Hallupp M., Badenhop RF, Vick J., Eang R., Naslund J., Takashima A., Gandy SE., Schofield PR: Presenilin-1 mutation (Leu271Val) results in altered exonic splicing and Alzheimer's disease with non-cored plaques and neuritic dystrophy. *J. Biol Chem*, 278(9): 6748-6754(2003).
- Yuji Yoshiike, De-Hua Chui, Takumi Akagi, Nobuo Tanaka, and Akihiko Takashima. Specific compositions of amyloid- β peptides as the determinant of toxic β -aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*:vol.278,No.26 (2003) 23648-23655
- Kenjiro Ono, Yuji Yoshiike, Akihiko Takashima, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Masahito Yamada Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols *in vitro*: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *The Journal of Neurochemistry*:87(2003)172-181
- Philippe Marambaud, Paul H. Wen, Anindita Dutt, Junichi Shioi, Akihiko Takashima, Robert Siman, and Nikolaos K. Robakis A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutants. *Cell*:114 (2003)635-645
- Planel E, Sun, X, Takashima A., Role of GSK-3 β in Alzheimer's disease pathology", *Drug Dev. Res.* 56, 491-510 (2002)
- Sato, S, Tatebayashi, Y., Akagi, T., Chui, D-H, Murayama, M., Miyasaka, T., Planel, E., Tanemura, K., Sun, X, Hashikawa, T., Yoshioka, K., Ishiguro, K., Takashima, A. Aberrant tau phosphorylation by GSK-3 β and JNK-3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. *J. Biol Chem* 277, 42060-42065 (2002)
- Tatebayashi, Y. Miyasaka, T, Chui, D-H, Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., Planel, E., Sato, S., Hashikawa, T., Takashima, A., Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 13896-13901 (2002)
- Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y,

Takashima A, Yamada M, Naiki H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *J Neurochem.* May;81(3):434-40 (2002)

Xia X, Wang P, Sun X, Soriano S, Shum WK, Yamaguchi H, Trumbauer ME, Takashima A, Koo EH, Zheng H. The aspartate-257 of presenilin 1 is indispensable for mouse development and production of {beta}-amyloid peptides through {beta}-catenin independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 8760-8765 (2002)

Tanemura, K., Akagi T., Murayama, M., Hashikawa, T., Tominaga T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J. Neurosci.* 22, 133-141 (2002)

X. Sun, S. Sato, O. Murayama, M. Murayama, J.-M. Park, H. Yamaguchi, and Takashima A. Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci. lett.* 15, 61-64 (2002)

Sun, X, Cole, GM, Chu, T., Xia, W., Galasko, D., Yamaguchi, H., Frautschy SA., Takashiima A., Intracellular AB is increased by okadaic acid exposure in the transfected neuronal and non-neuronal cell lines. *Neurobiol. of Aging*23, 195-203 (2002)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。

研究課題名：アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究

(分担研究課題名：アルミニウムが誘導するプレセニリン2スプライシング変種と

孤発性アルツハイマー病発症に関する研究)

分担研究者 遠山正彌 大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学

研究要旨

家族性アルツハイマー病（以下FAD）の原因遺伝子としてプレセニリン1（以下PS1）・プレセニリン2（以下PS2）・アミロイド前駆体蛋白質（以下APP）が知られている。このうち、PS1変異体は最も高いFAD患者での発現を認める。我々は、このPS1変異体の機能解析を行うことでFADの発症機構に小胞体ストレス（以下ERストレス）が関与することを報告してきた。一方で、孤発性アルツハイマー病（以下SAD）とFADが非常に類似した病理像を呈し、臨床症状においても多くの類似点を示すことから、SAD発症においてもERストレスが関与しているのではないかと仮説を立てた。その後の検討の結果、PS2のスプライシング変種（以下PS2V）が見いだされ、このPS2VはPS1変異体と同様にERストレス脆弱性を誘導すること、神経系の細胞にのみ特異的に発現すること、低酸素のような酸化ストレスにより誘導されること、SAD患者脳サンプルを用いた蛋白レベルの検出で全例に認められることが明らかとなった。そこで、疫学的にSAD発症との関連性を示唆されているアルミニウム(以下Al)によりPS2Vが誘導されるか否かを検討した結果、神経系細胞を低濃度アルミニウム(Al)含有培地で長期間培養すると、エクソン5を欠損するプレセニリンスプライシング変種(PS2V)の誘導が促進されることが明らかとなった。そこで、Alにより誘導されるPS2VとSAD発症の関連性について多角的に検討した。

key word: アルミニウム、PS2V、ERストレス、神経細胞死、

A. 研究目的

現在我が国は、急速に高齢化社会へと向かっている。それに伴い、アルツハイマー病（以下AD）を中心とした痴呆性疾患は社会的問題として注目されている。痴呆性疾患は罹患している患者のみならず、その周囲で生活する多くの人へ多大な負担を強いることとなる。そこで我々は、未だ解明されないADの発症機序を解明することを目的に実験を進めてきた。

ADの一部は遺伝子変異のあるFADであるが、大多数は家族歴の無いSADである。いずれも脳内に沈着するアミロイドβ蛋白（以下Aβ）からなる老人斑とタウ蛋白質の異常なリン酸化によっておこる神経原線維変化(NFT)、神経細胞の顕著な脱落を特徴的な病理所見とする進行性の神経変性疾患である。まず我々はFADの原因遺伝子の変異体(PS1変異体)がどのよ

うにFAD発症に寄与するのかを検討した。その結果、PS1変異体がERストレス脆弱性を誘導すること報告した。一方、SADにおいては原因遺伝子の変異が認められないにも関わらず、FADと同様の病理所見を呈する。そこで、PS1変異体と同様にERストレス脆弱性を引き起こす機構があるのではないかと仮説を立て検討した結果、PS2のエクソン5を欠損したスプライシング変種PS2Vが見いだされた。さらに、PS2Vは低酸素刺激によって発現すること、ERストレス脆弱性を惹起させ神経細胞死を誘導することを示した。さらなる検討の結果、PS2Vの発現機序も解明した。即ち、低酸素刺激により神経細胞ではN-mycがまず発現誘導され、このN-mycがHMGA1aを発現誘導し、次いでHMGA1aがPS2Vを発現誘導する事を明らかとした。

一方で、“腎不全透析患者において痴呆が発生する(透析痴呆)”、“透析痴呆は透析に使用した水道水や薬剤中のAlが原因であり、脳内にAlが蓄積することである”、“飲料水中のAl濃度とAD患者発生に相関関係がある”といった、AlとAD発症の関連性を示す報告、つまり、AlがADの危険因子(リスクファクター)であるとする報告が多数なされてきた。

そこで我々は、PS2V発現とAlに関連があるのか否かを検討した。結果、神経系の細胞に毒性を示さない低濃度Alを長期間負荷したところ、低酸素刺激でのPS2V発現誘導が促進される事を見いだした。そこで本研究ではAlにより誘導促進されるPS2Vが低酸素刺激による発現と同様の機序で発現誘導されるか、またADの病態病理にどのように関与するかを明らかにする事を試みた。

B. 研究方法

①: AlによるPS2V発現機序の検討

低濃度Al(Alはマルトールとの混合液として用いたAl-malt)を一過性または持続的に負荷した神経芽細胞種(SK-N-SH細胞)を用いて、PS2V発現の上流にあると考えられるN-mycやHMGA1aがPS2Vに先行して発現するか否かを確認する目的でウェスタンブロッティング法(WB法)を用いて検討した。

②: 低濃度Alの細胞死への影響の検討

低濃度Al長期負荷群で認められた低酸素負荷時のPS2V発現促進が、ERストレスによる細胞死に関与するかどうかを検討した。ERストレスとしてtunicamycin(以下Tm:Tmは小胞体での蛋白質糖鎖修飾を阻害することで小胞体ストレスを誘発)を0.5 μ g/mlの濃度で使用し、PS2Vを発現させる目的で低酸素負荷を使用した。また、細胞死(アポトーシス)の測定方法としてはHoechstとpropidium iodideを用いた二重染色を行い、核のフラグメンテーションを起こしている細胞数の割合をカウントすることで確認した。

③: PS2V・Alによるタウ・A β 蛋白質コンフォメーション変化への影響の検討

PS2V発現細胞を用いて細胞内タウ蛋白質の構造変化をWB法にて検討した。一方A β 構造変化については、ヘキサフルオロイソプロパノールを用いて単量体化したA β 1-40蛋白質を用いた。凝集体変化を吸収波

長・チオフラビンTを用いた蛍光波長の変化をみることで解析した。さらに、免疫染色法を用いて、これらの病理像とPS2Vが関与するかどうか検討した。

④: PS2V及びAl負荷によるcaspase 4発現変化にたいする検討

ADで見られるERストレスを介した神経細胞死(アポトーシス)はcaspase4を介した経路で進むことを我々は報告してきた。そこで、PS2V発現細胞、及びAl負荷細胞においてcaspase4が誘導されるのか否かを検討した。方法としては、各細胞群に低酸素負荷・Tm負荷を組み合わせて用い、その場合のcaspase 4発現量変化をWB法を用いて検討した。

⑤人脳サンプルを用いたAD主要病理像出現とPS2V発現の関連性の検討

AD患者脳及び疾患コントロールとなる脳サンプルを用いて、海馬領域を中心とした免疫染色を行った。この際に、ADの特徴的な病理像であるA β 凝集体(老人斑)、リン酸化タウ凝集体との発現部位でのリンクを共染色で確認した。また、PS2Vの海馬内での発現量をヘマトキシリン・PS2Vの共染色で確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた実験であるので、特に倫理面への配慮は必要としていない。今回用いた脳サンプルは、病理学及び法医学から頂いたものであり、実験に用いる旨を同意をいたしたものである。

C. 研究結果

①: AlによるPS2V発現機序の検討

PS2Vの産生は、神経系の細胞に低酸素等の酸化ストレスが加わることで誘導されるHMGA1a蛋白質がPS2-pre-mRNAのEX5末端に結合することで起こる。一方で、HMGA1aの発現に先立ちN-mycの誘導が起きることも報告されている。今研究班において、Al長期負荷SK-N-SH細胞では、低酸素刺激下でのPS2V発現が促進した。さらに、コントロール細胞とAl長期負荷細胞を比較した場合、低酸素負荷でのHMGA1a発現促進が確認された。また、この発現に先立ちN-myc、HMGA1aが誘導され、Al刺激におけるPS2V機序は低酸素負荷によるPS2V発現機序と同様である事が明らかとなった。

②: 低濃度Alの細胞死への影響の検討

低濃度Al長期負荷群では、低酸素時に起こるPS2V発

現が促進しており、さらに小胞体ストレスによる細胞死は促進していた。

③: PS2V・A β によるタウ・A β 蛋白質コンフォメーション変化への影響の検討

PS2V 発現細胞ではタウの単量体を示すバンドが減少し、凝集を示す多量体以上のバンドの増加を認めた。また、ER ストレスを負荷することで多量体を示すバンドのさらなる増加を認めた。一方で、A β は A β 凝集については A β 、PS2V とともに促進的に働いた。また、 β -sheet 変化については A β は軽度抑制を PS2V はかなりの抑制傾向を示した。免疫染色においては PS2V 発現細胞内にタウ抗体陽性な凝集体蓄積を示すガリアス染色陽性細胞が認められた。また、PS2V 発現細胞周囲に老人斑形成を認めた。

④A β の一過性負荷では caspase4 への影響は認めなかったが、低濃度 A β (2.5 μ M) 長期負荷群ではツニカイマイシン負荷をしていない 0 時間の段階から caspase4 活性上昇を認めた。このことは、長期に渡る A β 負荷が caspase4 活性に影響を与えることを意味している。また、PS2V 発現細胞と mock 細胞を比較した場合に PS2V 発現細胞で caspase4 活性の上昇を認めた。このことから、孤発性 AD では PS2V により小胞体機能異常が引き起こされ、caspase4 活性が早期から上昇し、その結果として神経細胞死が引き起こされることを明かにした。

⑤人脳サンプルを用いた AD 主要病理像出現と PS2V 発現の関連性の検討

PS2V の発現であるが、もっともコントロール群と差が付いたのは DG 部での発現であった。また、PS2V の発現を海馬内 (DG を除く) でみた場合に、細胞死が進むといわれている領域ほど顕著な差を認めた。このことは、AD でみられる神経細胞死・神経細胞の脱落に深く PS2V が関与していることを示している。

タウの凝集体 (NFT) を確認する目的でガリアス染色を行った。PS2V 発現細胞内にガリアス染色陽性の凝集体 (NFT) を認めた。このことは、また、PS2V 陽性細胞で NFT を認めないものはあったが、死細胞をのぞいてガリアス陽性で PS2V 陰性のものは認めなかった。このことは、PS2V が何らかのトリガーとなり NFT 形成を引き起こしていることを示唆している。

老人斑と PS2V の発現については、PS2V により神経細胞死が認められた領域を追いかける形で認めら

れた。PS2V・リン酸化タウ・A β (オリゴマー) が神経細胞死を誘導した後に形成されている可能性を示す。

D. 考察

A β は低酸素負荷と同様の機序で PS2V の発現を誘導すること、PS2V が小胞体センサー機能を障害し小胞体ストレスに対し神経細胞を脆弱化する事、それにより神経細胞に小胞体ストレスが負荷されると神経細胞死が惹起される事を明らかとした。また、その神経細胞死の経路には caspase4 が関与していることを明かにした。さらに A β は AD の病理の特徴である老人斑形成と NFT 形成にも重要な関与を果たしている事が明らかとされた。老人斑形成については、A β ・PS2V とともに凝集体形成には促進的であった。PS2V は A β の分泌を促進する事が確認されていることから、A β は β -sheet 形成には抑制的ではあるものの、老人斑形成に関与している可能性は否定できない。また PS2V がタウの凝集体形成に促進的に働くこと、ガリアス陽性タングルが PS2V 陽性細胞内に認められること。免疫染色で PS2V のあとを追いかけると行った結果は、A β 及び PS2V が NFT 形成にも重要役割を果たしている可能性を示している。

E. 結論

A β は N-myc・HMGA1a といった A β 分子を誘導することで PS2V 発現に促進的に働く。さらに、この PS2V は小胞体ストレス脆弱性を誘導することで細胞死を促進した。A β は AD の病理形成にも重要な役割を果たしている事が明らかとなった。即ち、A β は NFT・老人斑形成においても促進的に働く可能性を示唆した。このことから、A β は PS2V を介して AD を惹起しその病態形成に深い関与を果たしている可能性が示された。

F. 論文および学会発表

1.論文発表

Possible involvement of the expression and phosphorylation of N-Myc in the Novel induction of HMGA1a by hypoxia in the human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Let. in press*

Novel function of PS2V: change in conformation of tau proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 May 28;318(2):435-8.

Role of ARF4L in recycling between endosomes and the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol.* 2004 Feb;24(1):137-47.

Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2. *J Neurochem.* 2004 Mar;88(6):1345-51.

Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 2003 Jun;10(6):698-708.

The cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon 5 of the presenilin-2 gene differ obviously from Hirano bodies observed in the brain from sporadic cases of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 2002 Aug 9;328(2):198-200.

Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death.

J Cell Biol. 2004 May 10;165(3):347-56

Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12.

Neurosci Lett. 2004 Mar 4;357(2):127-30.

2.学会発表

第45回日本神経化学大会・第24回日本分子生物学会大会・第2回CRESTシンポジウム・第5回癌治療増感シンポジウム・CREST終了報告会・蛋白の一生・第8回国際アルツハイマー病学会 など

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Mitsuko Yamamoto, Daisuke Kanayama, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, Masatoshi Takeda	C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene affects plasma homocysteine level and is genetic factor for late-onset Alzheimer's disease	Psychogeriatrics	4	4-10	2004
Yasuda Y, Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yatera M, Okochi M, Yamamori H, Matsumoto N, Kida T, Fukumori A, Okumura M, Tohyama M, Takeda M	FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress.	Biochem Biophys Res Commun	16;296(2)	313-8	2002
Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tani H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C	Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1.	EMBO J	15;21(20)	5408-16	2002
Matsuzaki S, Manabe T, Katayama T, Nishikawa A, Yanagita T, Yasuda Y, Meshitsuka S, Tohyama M.	Metals accelerate production of PS2V in sporadic AD brains.	J Neurochemistry	88	1345-1351	2004
Okochi M, Fukumori A, Satoh Y, Aidaraliev, N, Tani H, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Takeda M.	Alzheimer's-secretase mechanism produces Amyloid- β -protein like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments	Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders	Karger Press	31-41	2004
Inoue M, Suyama A, Kato T, Urashima K, Nakashima K, Meshitsuka S.	Development of computerized kana pick-out test for the neuropsychological examination.	Computer Methods and Programs in Biomedicine	70	271-276	2003
Aremu DA, Olawuyi JF, Meshitsuka S, Sridhar MK, Oluwande PA.	Heavy metal analysis of groundwater from Warri, Nigeria.	International J. Environmental Health Research	12	261-267	2002
Meshitsuka S, Aremu DA, Nose T.	A risk of Alzheimer's disease and aluminum in drinking water	Psychogeriatrics	2	263-268	2002
Hashimoto R, Straub RE, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR.	Expression Analysis of Neuregulin-1 in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia	Mol Psychiatry	9(3)	299-307	2004
Yuji Yoshiike, De-Hua Chui, Takumi Akagi, Nobuo Tanaka, and Akihiko Takashima	Specific compositions of amyloid- β peptides as the determinant of toxic β -aggregation	The Journal of Biological Chemistry	278;26	23648-23655	2003

Kenjiro Ono, Yuji Yoshiike, Akihiko Takashima, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Masahito Yamada	Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols <i>in vitro</i> : implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease	The Journal of Neurochemistry	87	172-181	2003
Takeshi Yanagita, Takayuki Manabe, Hiroaki Okuda, Shinsuke Matsuzaki, Yoshio Bando, Taiichi Katayama, Masaya Tohyama	Possible involvement of the expression and phosphorylation of N-Myc in the Novel induction of HMGA1a by hypoxia in the human neuroblastoma cell line.	Neurosci. Lett	374	47-52	2005
Shinsuke Matsuzaki, Takayuki Manabe, Taiichi Katayama, Atsuko Nishikawa, Takeshi Yanagita, Hiroaki Okuda, Yuichi Yasuda, Shingo Miyata, Shunsuke Meshitsuka, Masaya Tohyama	Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2	J Neurochem	88(6)	1345-51	2004
Junichi Hitomi, Taiichi Katayama, Yutaka Eguchi, Takashi Kudo, Manabu Taniguchi, Yoshihisa Koyama, Satoru Yamagishi, Yoshio Bando, Kazunori Imaizumi, Yoshihide Tsujimoto, Masaya Tohyama	Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death.	J Cell Biol.	10:165(3)	347-56	2004
Junichi Hitomi, Taiichi Katayama, Manabu Taniguchi, Akiko Honda, Kazunori Imaizumi, Masaya Tohyama	Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12.	Neurosci Lett	4:357(2):	127-30	2004
Takayuki Manabe, Taiichi Katayama, Sato Naoya, Takashi Kudo, Shunsuke Meshitsuka, Kazunori Imaizumi, Masaya Tohyama	The cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon 5 of the presenilin-2 gene differ obviously from Hiranobodies observed in the brain from sporadic cases of Alzheimer's disease patients	Neurosci Lett	328	198-200	2002

ORIGINAL ARTICLE

C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene affects plasma homocysteine level and is a genetic factor of late-onset Alzheimer's disease

Tomoyuki KIDA, Kouzin KAMINO, Mitsuko YAMAMOTO, Daisuke KANAYAMA, Toshihisa TANAKA, Takashi KUDO and Masatoshi TAKEDA

Division of Psychiatry and Behavioral Proteomics, Department of Post Genomics and Diseases, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Correspondence: Dr Kouzin Kamino MD, PhD, 2-2, D3, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan. Email: kkamino@psy.med.osaka-u.ac.jp

Received 25 November 2003; accepted 14 January 2004.

Abstract

Background: Elevated plasma homocysteine levels are known as a risk for atherosclerotic vascular disease and venous thrombosis and have been shown as a risk for late-onset Alzheimer's disease (LOAD).

Method: To examine the effect of genetic factors predisposing to elevated plasma homocysteine levels on the occurrence of LOAD, we determined the genotype of a C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and a variable number tandem repeat (VNTR) spanning exon 13–intron 13 boundary of cystathionine β -synthase (CBS) gene in patients with LOAD and community-based control subjects.

Results: Logistic regression indicated that the MTHFR-T allele was a risk for LOAD ($P < 0.05$), independently from apolipoprotein E- $\epsilon 4$ (APOE- $\epsilon 4$) allele. Kaplan–Meier tests showed that in APOE- $\epsilon 4$ non-carriers, individuals with the MTHFR-TT genotype have occurrences of LOAD earlier than those with the MTHFR-CC genotype ($P < 0.05$). Multiple regression analysis indicates that MTHFR-T allele increases plasma homocysteine levels ($P = 0.0002$), while the number of X chromosomes decreases ($P = 0.01$). Plasma homocysteine level was not correlated with age, plasma albumin reflecting nutritional condition, and the dose of APOE- $\epsilon 4$ allele. The CBS-20 VNTR allele showed the same trend to increase plasma homocysteine level as the MTHFR-T allele, but a risk effect for LOAD was not evident.

Conclusion: A genetic propensity for elevated plasma homocysteine levels, explained by the MTHFR-T allele encoding defective enzymatic function, is involved in the development of LOAD, particularly in APOE- $\epsilon 4$ non-carriers, and that homocysteine metabolism could be a preventive target to LOAD in the elderly.

Key words: Alzheimer's disease, apolipoprotein, cystathionine β -synthase, genetic, homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, risk.

INTRODUCTION

The major cause of dementia in the elderly is late-onset Alzheimer's disease (LOAD) both among Caucasians and, after 1990s, the Japanese elderly.¹ This trend could be caused by preventive intervention and advanced treatment of cerebrovascular stroke (such as antihypertensive treatment), dietary salt restriction and protein supplement, improved indoor air-conditioning,² and global warming. A cohort study in Caucasians showed that elevated plasma

homocysteine level is a risk factor for cognitive decline in the elderly, notably for LOAD.^{3,4} However, elevated plasma homocysteine level is a risk factor not only for atherosclerotic vascular disease and venous thrombosis but also cerebrovascular disease.^{5–9} Plasma homocysteine level is modified by dietary environment; for example, loading of methionine induced elevated plasma homocysteine level under low vitamin B12 supplement.¹⁰ Although, it was noted that both fasting and postmethionine-load

hyperhomocysteinemia is inherited in many of the instances.¹¹ C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene is one of genetic factors affecting plasma homocysteine levels.¹² Demented patients with multiple infarcts had a higher frequency of the MTHFR-TT genotype than those without.⁸ However, it remains undetermined whether the MTHFR-T allele modifies the risk for either vascular dementia or LOAD.^{13–16} Cystathionine β -synthase (CBS) gene is another genetic factor to determine plasma homocysteine levels, since a 31-bp variable number tandem repeat (VNTR) spanning the exon 13–intron 13 boundary of the CBS gene is related to plasma homocysteine levels.¹⁷ Subjects with Down syndrome show the appearance of senile plaque in the brain in their thirties, a pathological hallmark of Alzheimer's disease (AD). CBS gene is localized in the critical region of Down syndrome, at 21q22.3,¹⁸ but the genetic association between LOAD and the CBS gene, to our knowledge, has not been reported. To elucidate how genetic factors related to plasma homocysteine level modify the occurrence of LOAD, we performed a case–control study to examine the relation of plasma homocysteine level and genetic polymorphisms modifying plasma homocysteine in patients with LOAD, and evaluated how these genetic factors contribute to the occurrence of LOAD.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

Patients with AD were diagnosed as having probable AD according to the criteria of the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA).¹⁹ Elderly subjects, living healthily and independently at home, were recruited in Suita City, Osaka, Japan. No cognitive impairment in these subjects was found by the questionnaire including date, orientation, past history and medical records. After written informed consent to participate in the present study was obtained, peripheral blood was drawn from the patients and these population-based control subjects. The Genome Ethical Committee of Osaka University Graduate School approved this procedure. The age of the patients ($n = 196$) at blood withdrawal was 79.2 years + 7.0 (mean + SD), range 65–98 years, and that of age-matched control subjects ($n = 385$) was 75.4 years + 5.0, range 65–92 years. Age at onset of

AD was 74.7 years + 6.9, range 65–94 years. Peripheral blood was drawn into ethylenediaminetetraacetic acid dinatrium (EDTA2Na), and plasma and cell fractions were separated within 6 h. DNA was extracted from the cell fraction using a QIAamp DNA blood kit (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at 4°C. Plasma was stored at 80°C until use.

Genotyping

The genotype of the APOE gene was determined using polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) according to the procedure by Wenham *et al.*²⁰ The C677T polymorphism of the MTHFR gene was genotyped by a PCR–RFLP method using the *HinfI* restriction enzyme according to the procedure described previously.²¹

The 31 bp VNTR region in the CBS gene was amplified using primers CBS3: 5'-GGAATGGT GACGCTTGGGAACAT-3' and CBS4: 5'-ACTTGAAA GTGGGTGCTTCTCAGC-3', and PCR product were electrophoresed in 2.5% agarose gel containing ethidium bromide and visualized on an ultraviolet transilluminator. The 31 bp tandem-repeat polymorphic alleles were determined by the comparison with the most frequently observed 796 bp alleles harboring 18 repeats.^{17,22}

Plasma homocysteines and albumin

For the patients with LOAD ($n = 77$) we examined the relationship between the allelic doses of the MTHFR-T allele and CBS-repeat doses with plasma total homocysteine level. The concentration of plasma homocysteine was measured by the high-pressure liquid chromatography (HPLC), that included derivatization with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (ABD-F) and postcolumn fluorescence detection.²³ To test the effect of nutrition, plasma albumin level was also measured by the BCG method described previously.²⁴

Statistics

The allele and genotype frequencies was compared by χ^2 -tests, and P -value <0.05 was considered significant after correction by the number of comparisons. Multiple logistic regression of the occurrence of LOAD with the dose of the APOE- ϵ 4, MTHFR-T, and CBS-20 VNTR alleles were examined. Kaplan–Meier survival curves free from LOAD were examined by the Mantel–Cox logrank test. The correlation of plasma

homocysteine level with age, dose of X chromosome, plasma albumin level, dose of the APOE- ϵ 4, MTHFR-T, and CBS-20 VNTR alleles was examined by multiple regression. *P*-values <0.05 was considered significant.

RESULTS

Allele and genotype frequencies of methylenetetrahydrofolate reductase-C766T and cystathionine β -synthase-variable number tandem repeat polymorphisms

We examined the genotype and allele frequencies of the MTHFR-C766T and CBS-VNTR polymorphisms in patients with LOAD and population-based nondemented controls (Tables 1 and 2). Genotype distributions of both of the polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The genotype frequency of the MTHFR-C766T polymorphism was not significantly different between the groups, but the allele frequency of MTHFR-T allele in the patient

group was relatively higher than that in the control group (Table 1). When the subjects were divided into APOE- ϵ 4 carrier and non-carrier, the MTHFR-T allele in the patient group was significantly more frequent than that in the control group in APOE- ϵ 4 non-carriers ($P < 0.02$). The same trend was also found in APOE- ϵ 4 carrier, but not significantly. However, we did not find any significant difference in the CBS-VNTR allele and genotype frequencies between the groups (Table 2).

To incorporate genetic interactions in risk effects, we performed a logistic regression of the APOE- ϵ 4, MTHFR-T and CBS-20 VNTR alleles for the occurrence of LOAD (Table 3). We detected a significant risk effect of the APOE- ϵ 4 (odds ratio = 5.2, 95% CI = 3.51–7.59, $P < 0.0001$) and also a marginally significant effect of the MTHFR-T allele (odds ratio = 1.4, 95% CI = 1.02–1.85, $P = 0.04$), but the CBS-20 VNTR allele did not show any significant effect. The risk effect of the MTHFR-T allele was more prominent

Table 1 Genotype and allele frequencies of methylenetetrahydrofolate reductase C766T polymorphism in patients with late-onset Alzheimer's disease (LOAD) and controls

Group	Genotype (frequency)			Allele (frequency)	
	CC	CT	TT	C	T
All subjects					
Patients (<i>n</i> = 194)	64 (0.330)	98 (0.505)	32 (0.164)	226 (0.582)	162 (0.418)
Controls (<i>n</i> = 379)	144 (0.380)	193 (0.509)	42 (0.111)	481 (0.635)	277 (0.365)
APOE- ϵ 4(+)					
Patients (<i>n</i> = 102)	38 (0.373)	52 (0.510)	12 (0.118)	128 (0.627)	76 (0.373)
Controls (<i>n</i> = 60)	25 (0.417)	30 (0.500)	5 (0.083)	80 (0.667)	40 (0.333)
APOE- ϵ 4(-)					
Patients (<i>n</i> = 92)	26 (0.282)	46 (0.500)	20 (0.217)	98 (0.533)	86 (0.467)*
Controls (<i>n</i> = 319)	119 (0.373)	163 (0.511)	37 (0.116)	401 (0.629)	237 (0.37)

The genotypes of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism of two patients and six controls were not determined because of the insufficient polymerase chain reaction amplification. Allele frequency of the MTHFR polymorphism in APOE- ϵ 4 (-) group was significantly different between the patients and controls ($P = 0.02$).

Table 2 Genotype frequencies of the cystathionine β -synthase (CBS) polymorphism in patients with late-onset Alzheimer's disease (LOAD) and controls

Group	Genotype (frequency)					Allele (frequency)	
	18/18	18/20	17/18	20/20	17	18	20
All subjects							
Patients (<i>n</i> = 190)	144 (0.758)	45 (0.237)	0 (0.000)	1 (0.005)	0 (0.000)	333 (0.876)	47 (0.124)
Controls (<i>n</i> = 384)	285 (0.742)	91 (0.237)	2 (0.005)	6 (0.016)	2 (0.003)	663 (0.863)	103 (0.134)
APOE- ϵ 4(+)							
Patients (<i>n</i> = 98)	70 (0.714)	27 (0.276)	0 (0.000)	1 (0.010)	0 (0.000)	167 (0.852)	29 (0.148)
Controls (<i>n</i> = 60)	49 (0.817)	9 (0.150)	0 (0.000)	2 (0.033)	0 (0.000)	107 (0.892)	13 (0.108)
APOE- ϵ 4(-)							
Patients (<i>n</i> = 92)	74 (0.804)	18 (0.196)	0 (0.000)	0 (0.000)	0 (0.000)	166 (0.902)	18 (0.098)
Controls (<i>n</i> = 324)	236 (0.728)	82 (0.253)	2 (0.006)	4 (0.012)	2 (0.003)	556 (0.858)	90 (0.139)

The genotypes of the CBS polymorphism of six patients and one controls were not determined because of the insufficient PCR amplification.

among APOE- ϵ 4 non-carriers (odds ratio = 1.5, 95% CI = 1.04–2.14, $P = 0.03$).

Methylenetetrahydrofolate reductase-TT genotype and onset of late-onset Alzheimer's disease

To examine the genetic effect of the defective MTHFR genotype, the common MTHFR-CC genotype and the defective MTHFR-TT genotype was compared for the survival free from LOAD. In all subjects, the subjects with MTHFR-TT genotype showed a trend to develop LOAD faster than those with MTHFR-CC genotype (Fig. 1a). This trend was observed in both APOE- ϵ 4 non-carriers (Fig. 1b) and APOE- ϵ 4 carriers (Fig. 1c). However, the significant difference was only supported in APOE- ϵ 4 non-carriers ($P < 0.05$) (Fig. 1b). We did not find any difference of the survival rate free

from LOAD between subjects with the CBS-20/20 VNTR genotype and those with the CBS-18/18 VNTR genotype (data not shown).

Correlation of plasma homocysteine level with the methylenetetrahydrofolate reductase-T allele

To examine the effect of age, sex, nutrition, and risk alleles for the occurrence of LOAD on plasma homocysteine level, we performed a multiple regression of these parameters in patients with LOAD (Table 4). Among those, significant correlations with plasma homocysteine level were found in the dose of X chromosome (standardized coefficient = -0.266 , $P = 0.01$) and that of the MTHFR-T allele (standardized coefficient = 0.404 , $P = 0.0002$). The dose of the CBS-20 VNTR allele showed a trend to increase the plasma homocysteine level, but marginally not significant (standardized coefficient = 0.185 , $P = 0.08$). No significant effects were found with age, plasma albumin level, and the APOE- ϵ 4 allele.

Table 3 Logistic regression of doses of the APOE- ϵ 4, methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-T and cystathionine β -synthase (CBS)-20 variable number tandem repeat (VNTR) alleles for the occurrence of late-onset Alzheimer's disease (LOAD)

Allele	Odds ratio (P-value)	95% Confidence Interval
All subjects		
APOE- ϵ 4	5.2*	3.51–7.59
MTHFR-T	1.4**	1.02–1.85
CBS-20 VNTR	0.8	0.55–1.27
APOE- ϵ 4(+) subjects		
APOE- ϵ 4	3.8	0.81–17.9
MTHFR-T	1.1	0.68–1.93
CBS-20 VNTR	1.2	0.61–2.51
APOE- ϵ 4(-) subjects		
MTHFR-T	1.5***	1.04–2.14
CBS-20 VNTR	0.7	0.37–1.16

* $P < 0.0001$, ** $P = 0.04$, *** $P = 0.03$.

DISCUSSION

We confirmed that plasma homocysteine level in patients with LOAD is genetically affected by the C766T polymorphism of the MTHFR gene, and that the VNTR length of the CBS gene showed a similar trend to the MTHFR-T allele. The MTHFR-T allele results in an Ala222Val substitution, leading to reduced enzyme activity and increased thermolability, and relates to increased plasma homocysteine level.²¹ The increase in the number of a 31-bp VNTR unit of the CBS gene shows a reduced activity of CBS caused by alternative splicing of exon 13, and relates with elevated plasma homocysteine level after

Figure 1 Kaplan–Meier survival curves free from late-onset Alzheimer's disease (LOAD). (●) subjects with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-CC genotype and (■) those with the MTHFR-TT genotype. Age of subjects is represented by seven groups: 65 years (ranged 65–67 years), 70 (ranged 68–72), 75 (ranged 73–77), 80 (ranged 78–82), 85 (ranged 83–87), 90 (ranged 88–92), and 95 (ranged 93–97). The curves were drawn for (a) all subjects; (b) APOE- ϵ 4 carriers; and (c) APOE- ϵ 4 non-carriers. Logrank test indicated a significant difference of the survival rate free from LOAD between the subjects in APOE- ϵ 4 non-carriers ($P < 0.05$).

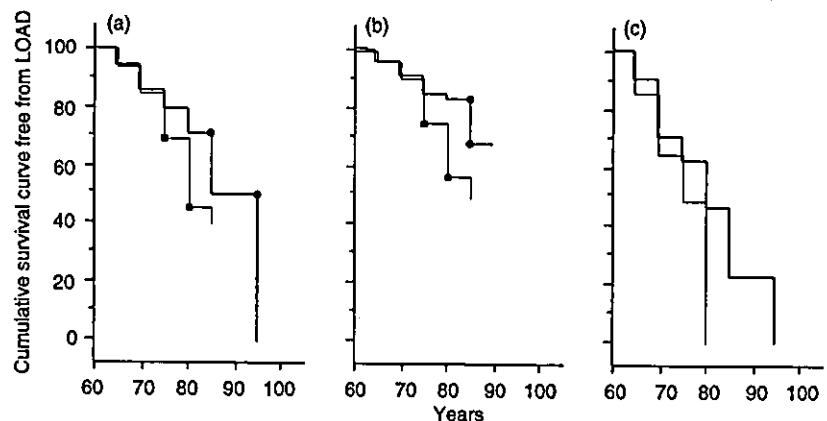


Table 4 Multiple regression of plasma homocysteine level with doses of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-T and cystathionine β -synthase (CBS)-20 variable number tandem repeat (VNTR) alleles

Factor	Coefficient (Standardized)	t-value
Age	0.095 (0.089)	0.785
X chromosome	-4.082 (-0.266)	-2.560*
Albumin	0.701 (0.038)	0.352
APOE- ϵ 4	-0.136 (-0.012)	-0.108
MTHFR-T	3.816 (0.404)	3.925**
CBS-20 VNTR	2.574 (0.185)	1.754

* $P = 0.01$, ** $P = 0.0002$.

methionine loading.¹⁷ A gene-gene interaction between the MTHFR and CBS gene has been shown in plasma homocysteine level.²⁵

We found a risk effect and a promotive effect on the occurrence of LOAD by the MTHFR-T allele in APOE- ϵ 4 non-carriers. The same trend was also found in APOE- ϵ 4 carriers, though not significantly. Several reports examined the risk effect of the MTHFR-T allele on the occurrence of LOAD, none of which found any significant effects.¹³⁻¹⁶ We showed that the VNTR of the CBS gene did not associate with the occurrence of LOAD. Thus, elevated plasma homocysteine level in LOAD in itself merely reflects one of a vascular factor of LOAD, as shown in cerebrovascular dementia with multiple infarcts.^{3,9}

It was well demonstrated that any positive association in LOAD other than APOE- ϵ 4 allele are difficult to replicate, which likely caused by its weak effect. However, selection bias of patients as well as controls often affects the association studies. The frequency of the MTHFR-T allele in Japanese controls was similar to that reported by Wakutani *et al.*¹⁶ We did not include either patients with cerebrovascular changes screened by neuroimaging studies. Therefore, it is unlikely that the patient groups in our study contained vascular dementia that was shown to associate with the MTHFR-T allele.⁹ On the other hand, the risk effect of the MTHFR-T allele for coronary heart disease is well demonstrated,²⁶ and the link between LOAD and coronary heart disease has been noted in relation to cerebral amyloid deposition.²⁷ Thus, the risk effect for the other diseases might affect the notification of patients with LOAD. Although we found the relation between LOAD and the MTHFR-T allele, the risk effect of the MTHFR-T allele should be carefully confirmed by not only meta-analysis of a large number of case-control studies but prospective cohort studies for

aging-related diseases. These studies will elucidate environmental differences to explain the different results of the association studies. Several studies indicated that plasma homocysteine level is related with cognitive function in the elderly,^{28,29} though this relation remains controversial.^{30,31} Neuroimaging studies evidenced that elevated plasma homocysteine level is related with cortical and hippocampal atrophy in non-demented subjects,^{32,33} and with white matter changes in AD cases.³⁴ It was shown that hyperhomocysteinemia is related to the progression and increasing severity of LOAD.³⁵ On the other hand, homocysteine enhances the toxicity of beta amyloid in vascular smooth muscle cells, showing the relation of homocysteine with cerebral amyloid angiopathy.³⁶ One of the unifying mechanisms of this evidence is that elevated plasma homocysteine level could underlie the alteration of microcirculation in the brain, resulting in critically attained threshold of cerebral hypoperfusion.³⁷

The CBS gene is localized at 21q22.3, inside the critical region of Down syndrome.^{38,39} The brains with Down syndrome show the appearance of senile plaques, a pathological hallmark of LOAD, in their thirties,⁴⁰ and the activity of CBS is increased in Down syndrome caused by gene-dose effect, which is opposite to the reduction of the CBS activity in LOAD.¹⁸ However, the content of hydrogen sulfides, endogenously produced from cysteine by CBS, was decreased in the brains with AD, and this decrease was associated with the reduction of S-adenosylmethionine (SAM), a CBS activator, catalyzed from methionine and ATP by methionine adenosyltransferase.⁴¹ It was also reported that AA genotype of A2756G polymorphism of 5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase gene (MTR), also called as methionine synthase and encoded at 1q43, that catalyzes homocysteine to methionine, is an APOE- ϵ 4 allele-independent risk factor for AD.⁴² Since we also found that the MTHFR-T allele is an APOE- ϵ 4 allele-independent risk factor for LOAD, folate cycle in homocysteine metabolism is likely to be involved in the development of LOAD. However, it remains undetermined how this metabolic regulation modifies the risk for LOAD.

In conclusion, we showed that the MTHFR-C766T polymorphism, a genetic factor correlated to elevated plasma homocysteine level, is related to the occur-

rence of LOAD. It was supported that control of plasma homocysteine could be beneficial to prevent the elderly from LOAD.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the elderly people who participated in the present study. This study was approved by the Genome Ethical Committee of Osaka University Graduate School of Medicine and was supported by the Research for the Future Program, Japan Society for the Promotion of Science (JSPS).

REFERENCES

- Shibayama H, Kobayashi H, Nakagawa M *et al*. Prevalence of dementia among the elderly in a Japanese community population – comparative study on the 1983 and 1996 survey. *Alch Study Psychoger* 2001; **1**: 317–325.
- Ayllin P, Morris S, Wakefield J, Grossinho A, Jarup L, Elliott P. Temperature, housing, deprivation and their relationship to excess winter mortality in Great Britain 1986–96. *Int J Epidemiol* 2001; **30**: 1100–1108.
- Clarke R, Smith AD, Jobst KA, Refsum H, Sutton L, Ueland PM. Folate, vitamin B12, and serum total homocysteine levels in confirmed Alzheimer disease. *Arch Neurol* 1998; **55**: 1449–1455.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J *et al*. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; **346**: 476–483.
- Selhub J, Jacques PF, Bostom AG *et al*. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *N Engl J Med* 1995; **332**: 286–291.
- den Heijer M, Koster T, Blom HJ *et al*. Hyperhomocystinemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* 1996; **334**: 759–762.
- Boushey CJ, Beresford SSA, Omenn GS, Motulsky AG. A meta-analysis of plasma homocysteine as a risk factor for arteriosclerosis vascular disease and the potential preventive role of folic acid. In: *International Congress on Homocysteine Metabolism: from Basic Science to Clinical Medicine*. Norwall: Kluwer Academic, 1995.
- Clarke R, Lewington S, Donald A *et al*. Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. *JAMA* 2002; **288**: 2015–2022.
- Yoo JH, Choi GD, Kang SS. Pathogenicity of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase for vascular dementia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**: 1921–1925.
- Mann NJ, Li D, Sinclair AJ *et al*. The effect of diet on plasma homocysteine concentrations in healthy male subjects. *Eur J Clin Nutr* 1999; **53**: 895–899.
- Franken DG, Boers GHJ, Blom HJ, Cruysberg JRM, Trijbels FJM, Hamel BCJ. Prevalence of familial mild hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 1996; **125**: 71–80.
- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG. MTHFR 677C→T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA* 2002; **288**: 2023–2031.
- Pollak RD, Pollak A, Idelson M, Bejarano-Achache I, Doron D, Blumenfeld A. The C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and vascular dementia. *J Am Geriatr Soc* 2000; **48**: 664–668.
- Bottiglieri T, Parnetti L, Arning E *et al*. Plasma total homocysteine levels and the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene: a study in an Italian population with dementia. *Mech Ageing Dev* 2001; **122**: 2013–2023.
- Brunelli T, Bagnoli S, Giusti B *et al*. The C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation is not associated with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; **315**: 103–105.
- Wakutanl Y, Kowa H, Kusumi M *et al*. Genetic analysis of vascular factors in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **977**: 232–238.
- Lievers KJ, Kluijtmans LA, Hell SG *et al*. A 31 bp VNTR in the cystathionine beta-synthase (CBS) gene is associated with reduced CBS activity and elevated post-load homocysteine levels. *Eur J Hum Genet* 2001; **9**: 583–589.
- Kraus JP, Williamson CL, Figaira FA *et al*. Cloning and screening with nanogram amounts of immunopurified mRNAs: cDNA cloning and chromosomal mapping of cystathionine beta synthase and the beta subunit of propionyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci* 1986; **83**: 2047–2051.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease. report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology* 1984; **34**: 939–944.
- Wenham PR, Price WH, Blundell G. Apolipoprotein E genotyping by one-stage PCR. *Lancet* 1991; **337**: 1158–1159.
- Frost P, Blom HJ, Milos R *et al*. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet* 1995; **10**: 111–113.
- Yang F, Hanson NQ, Schwichtenberg K, Tsai MY. Variable number tandem repeat in exon/intron border of the cystathionine beta-synthase gene: a single nucleotide substitution in the second repeat prevents multiple alternate splicing. *Am J Med Genet* 2000; **95**: 385–390.
- Araki A, Sako Y. Determination of free and total homocysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1987; **422**: 43–52.
- Hoshino T, Kamino K, Matsumoto M. Gene dose effect of the APOE-epsilon4 allele on plasma HDL cholesterol level in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2002; **23**: 41–45.
- Afman LA, Lievers KJ, Kluijtmans LA, Trijbels FJ, Blom HJ. Gene-gene interaction between the cystathionine beta-synthase 31 base pair variable number of tandem repeats and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C>T polymorphism on homocysteine levels and risk for neural tube defects. *Mol Genet Metab* 2003; **78**: 211–215.
- Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* 2000; **72**: 324–332.
- Sparks DL, Martin TA, Gross DR, Hunsaker JC 3rd. Link between heart disease, cholesterol, and Alzheimer's disease: a review. *Microsc Res Tech* 2000; **50**: 287–290.
- Lehmann M, Gottfries CG, Regland B. Identification of cognitive impairment in the elderly: homocysteine is an early marker. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999; **10**: 12–20.
- Morris MS, Jacques PF, Rosenberg IH, Selhub J. National Health and Nutrition Examination Survey. Hyperhomocysteinemia associated with poor recall in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Clin Nutr* 2001; **73**: 927–933.

- 30 Ravaglia G, Forti P, Maioli F *et al.* Blood homocysteine and vitamin B levels are not associated with cognitive skills in healthy normally ageing subjects. *J Nutr Health Aging* 2000; **4**: 218–222.
- 31 Kalmijn S, Launer LJ, Lindemans J, Bots ML, Hofman A, Breteler MM. Total homocysteine and cognitive decline in a community-based sample of elderly subjects: the Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 1999; **150**: 283–289.
- 32 Williams JH, Pereira EA, Budge MM, Bradley KM. Minimal hippocampal width relates to plasma homocysteine in community-dwelling older people. *Age Ageing* 2002; **31**: 440–444.
- 33 den Heijer T, Vermeer SE, Clarke R *et al.* Homocysteine and brain atrophy on MRI of non-demented elderly. *Brain* 2003; **126**: 170–175.
- 34 Hogervorst E, Ribeiro HM, Molyneux A, Budge M, Smith AD. Plasma homocysteine levels, cerebrovascular risk factors, and cerebral white matter changes (leukoaralosis) in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 2002; **59**: 787–793.
- 35 Postiglione A, Milan G, Ruocco A, Gallotta G, Gulotto G, Di Minno G. Plasma folate, vitamin B (12), and total homocysteine and homozygosity for the C677T mutation of the 5,10-methylene tetrahydrofolate reductase gene in patients with Alzheimer's dementia. A case-control study. *Gerontology* 2001; **47**: 324–329.
- 36 Mok SS, Turner BJ, Beyreuther K, Masters CL, Barrow CJ, Small DH. Toxicity of substrate-bound amyloid peptides on vascular smooth muscle cells is enhanced by homocysteine. *Eur J Biochem* 2002; **269**: 3014–3022.
- 37 de la Torre JC. Cerebral hypoperfusion, capillary degeneration, and development of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2000; **14**: S72–S81.
- 38 Munke M, Kraus JP, Ohura T, Francke U. The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am J Hum Genet* 1988; **42**: 550–559.
- 39 Korenberg J, Kawashima H, Pulst S *et al.* Molecular definition of the region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am J Hum Genet* 1990; **47**: 236–246.
- 40 Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* 1985; **17**: 278–282.
- 41 Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **293**: 1485–1488.
- 42 Beyer K, Lao JI, Latorre P *et al.* Methionine synthase polymorphism is a risk factor for Alzheimer disease. *Neuroreport* 2003; **14**: 1391–1394.



FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress

Yuka Yasuda,^a Takashi Kudo,^{a,*} Taiichi Katayama,^b Kazunori Imaizumi,^c
Misako Yatera,^a Masayasu Okochi,^a Hidenaga Yamamori,^a Naohiko Matsumoto,^a
Takayuki Kida,^a Akio Fukumori,^a Masayo Okumura,^c Masaya Tohyama,^b
and Masatoshi Takeda^a

^a Division of Psychiatry and Behavioral Proteomics, Department of Post-Genomics and Diseases, Course of Advanced Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^b Department of Anatomy and Neuroscience, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

^c Division of Structural Cell Biology, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

Received 8 July 2002

Abstract

FAD mutations in presenilin-1 (PS1) cause attenuation of the induction of the endoplasmic reticulum (ER)-resident chaperone GRP78/BiP under ER stress, due to disturbed function of IRE1, the sensor for accumulation of unfolded protein in the ER lumen. PERK, an ER-resident transmembrane protein kinase, is also a sensor for the unfolded protein response (UPR), causing phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) to inhibit translation initiation. Here, we report that the FAD mutant PS1 disturbs the UPR by attenuating both the activation of PERK and the phosphorylation of eIF2 α . Consistent with the results of a disturbed UPR, inhibition of protein synthesis under ER stress was impaired in cells expressing PS1 mutants. These results suggest that mutant PS1 impedes general translational attenuation regulated by PERK and eIF2 α , resulting in an increased load of newly synthesized proteins into the ER and subsequently increasing vulnerability to ER stress. © 2002 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Familial Alzheimer's disease (FAD); Presenilin-1 (PS1); ER stress; Unfolded protein response (UPR); PERK; eIF2 α

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, characterized pathologically by extracellular amyloid plaques that are composed of the deposition of β -amyloid (A β) peptides of 40–42 residues and the formation of neurofibrillary tangles, major components of which are abnormally phosphorylated tau, in the brain. Some early-onset types of autosomal-dominant familial AD (FAD) are caused by mutations in the amyloid precursor protein (APP) [1,2], presenilin-1 (PS1) [3], or presenilin-2 (PS2) [4,5] genes. FAD-linked PS1 variants alter proteolytic processing and trafficking of APP [6,7]. Moreover, mutations in PS1 increase cellular susceptibility to apoptosis [8]. One interpretation, derived from cell culture studies, was that the PS1 mu-

tant perturbs subcellular calcium homeostasis in affected cells [9]. These statutes would impose a burden on the endoplasmic reticulum (ER). It has been reported that PS1 is localized in subcellular compartments and appears to be present in particularly high levels in the ER, the intermediate compartment, and the *cis*-Golgi region [8–10]. This has led us to study the relationship between ER function and PS1. Approximately one-third of all cellular proteins are translocated into the lumen of the ER, where post-translational modification, folding, and oligomerization occur. When cells are burdened with ER stress, malformed proteins accumulate in the ER, and specific pathways for cell survival are activated. These ER stress responses have been termed the unfolded protein response (UPR) [11–13]. Recently, several ER stress mediators for the UPR were identified in mammalian cells [11–13]. One of these mediators is an

* Corresponding author. Fax: +81-6-6879-3059.

E-mail address: kudo@psy.med.osaka-u.ac.jp (T. Kudo).