

- through calcineurin-dependent mechanisms in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* 77: 354-371 (2002).
- [56] Raymond CR, Ireland DR, Abraham WC. NMDA receptor regulation by amyloid-beta does not account for its inhibition of LTP in rat hippocampus. *Brain Res* 968: 263-272 (2003).
- [57] Pettit DL, Shao Z, Yakel JL. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 21: RC120 (2001).
- [58] Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci* 16: 1034-1040 (1996).
- [59] Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275: 5626-5632 (2000).
- [60] Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75: 1155-1161 (2000).
- [61] Zamani MR, Allen YS. Nicotine and its interaction with beta-amyloid protein: a short review. *Biol Psychiatry* 49: 221-232 (2001).
- [62] Magdesian MH, Nery AA, Martins AH, Juliano MA, Juliano L, Ulrich H, *et al.* Peptide blockers of the inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by amyloid beta. *J Biol Chem* 280: 31085-31090 (2005).
- [63] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, *et al.* Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* 416: 535-539 (2002).
- [64] Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, *et al.* Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 2: 271-276 (1999).
- [65] Larson J, Lynch G, Games D, Seubert P. Alterations in synaptic transmission and long-term potentiation in hippocampal slices from young and aged PDAPP mice. *Brain Res* 840: 23-35 (1999).
- [66] Giacchino J, Criado JR, Games D, Henriksen S. *In vivo* synaptic transmission in young and aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Brain Res* 876: 185-190 (2000).
- [67] Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, *et al.* Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8: 1051-1058 (2005).
- [68] Conboy L, Murphy KJ, Regan CM. Amyloid precursor protein expression in the rat hippocampal dentate gyrus modulates during memory consolidation. *J Neurochem* 95: 1677-1688 (2005).
- [69] Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K. Neuronal overexpression of APP, the Drosophila homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9: 489-492 (1999).
- [70] Kamal A, Stokin GB, Yang Z, Xia CH, Goldstein LS. Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28: 449-459 (2000).
- [71] Kamal A, Almenar-Queralt A, LeBlanc JF, Roberts EA, Goldstein LS. Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414: 643-648 (2001).
- [72] Gunawardena S, Goldstein LS. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila. *Neuron* 32: 389-401 (2001).
- [73] Kimberly WT, Zheng JB, Guenette SY, Selkoe DJ. The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276: 40288-40292 (2001).
- [74] Kinoshita A, Whelan CM, Berezovska O, Hyman BT. The gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells. *J Biol Chem* 277: 28530-28536 (2002).
- [75] Kinoshita A, Whelan CM, Smith CJ, Berezovska O, Hyman BT. Direct visualization of the gamma secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein: association with Fe65 and translocation to the nucleus. *J Neurochem* 82: 839-847 (2002).
- [76] Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and Fe65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol* 153: 1403-1414 (2001).
- [77] Cao X, Sudhof TC. A transcriptionally [correction of transcriptionally] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293: 115-120 (2001).
- [78] Sumioka A, Nagaishi S, Yoshida T, Lin A, Miura M, Suzuki T. Role of 14-3-3gamma in FE65-dependent gene transactivation mediated by the APP cytoplasmic fragment. *J Biol Chem* 280: 42364-42374 (2005).
- [79] Heese K, Yamada T, Nagai Y, Sawada T. New aspect about APP signaling. *Brain Aging* 3(1): 15-20 (2003).
- [80] Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N, Cattaneo A. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6826-6831 (2000).
- [81] Capsoni S, Giannotta S, Cattaneo A. Beta-amyloid plaques in a model for sporadic Alzheimer's disease based on transgenic antinerve growth factor antibodies. *Mol Cell Neurosci* 21: 15-28 (2002).
- [82] Capsoni S, Giannotta S, Cattaneo A. Nerve growth factor and galantamine ameliorate early signs of neurodegeneration in anti-nerve growth factor mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12432-12437 (2002).
- [83] Bowman AB, Kamal A, Ritchings BW, Philp AV, McGrail M, Gindhart JG, *et al.* Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the Sunday driver (SYD) protein. *Cell* 103: 583-594 (2000).
- [84] Klopfenstein DR, Vale RD, Rogers SL. Motor protein receptors: moonlighting on other jobs. *Cell* 103: 537-540 (2000).
- [85] Taru H, Iijima K, Hase M, Kirino Y, Yagi Y, Suzuki T. Interaction of Alzheimer's beta-amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 277: 20070-20078 (2002).
- [86] Ito M, Yoshioka K, Akechi M, Yamashita S, Takamatsu N, Sugiyama K, *et al.* JSAP1, a novel Jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol Cell Biol* 19: 7539-7548 (1999).
- [87] Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol Cell Biol* 20: 1030-1043 (2000).
- [88] Verhey KJ, Meyer D, Deehan R, Blenis J, Schnapp BJ, Rapoport TA, *et al.* Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* 152: 959-970 (2001).
- [89] Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, Rincon M, Zheng TS, Davis RJ, *et al.* Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature* 389: 865-870 (1997).
- [90] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103: 239-252 (2000).
- [91] Matsuura H, Nishitoh H, Takeda K, Matsuzawa A, Amagasa T, Ito M, *et al.* Phosphorylation-dependent scaffolding role of JSAP1/JIP3 in the ASK1-JNK signaling pathway. A new mode of regulation of the MAP kinase cascade. *J Biol Chem* 277: 40703-40709 (2002).
- [92] Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, *et al.* Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem* 84: 864-877 (2003).
- [93] Cavalli V, Kujala P, Klumperman J, Goldstein LS. Sunday Driver links axonal transport to damage signaling. *J Cell Biol* 168: 775-787 (2005).
- [94] Marques CA, Keil U, Bonert A, Steiner B, Haass C, Muller WE, Eckert A. Neurotoxic mechanisms caused by the Alzheimer's disease-linked Swedish amyloid precursor protein mutation: oxidative stress, caspases, and the JNK pathway. *J Biol Chem* 278: 28294-28302 (2003).
- [95] Liu HY, Meakin SO. ShcB and ShcC activation by the Trk family of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 277: 26046-26056 (2002).
- [96] Russo C, Dolcini V, Salis S, Venezia V, Zambrano N, Russo T, *et al.* Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 277: 35282-35288 (2002).
- [97] Tarr PE, Contursi C, Roncarati R, Novello C, Ghersi E, Scheinfeld MH, *et al.* Evidence for a role of the nerve growth factor receptor TrkA in tyrosine phosphorylation and processing of beta-APP. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 324-329 (2002).

- [98] Tarr PE, Roncarati R, Pelicci G, Pelicci PG, D'Adamo L. Tyrosine phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc. *J Biol Chem* 277: 16798-16804 (2002).
- [99] Hock C, Heese K, Muller-Spahn F, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Decreased trkA neurotrophin receptor expression in the parietal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 241: 151-154 (1998).
- [100] Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol* 57: 846-851 (2000).
- [101] Hock CH, Heese K, Olivieri G, Hulette CH, Rosenberg C, Nitsch RM, *et al.* Alterations in neurotrophins and neurotrophin receptors in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* 59: 171-174 (2000).
- [102] Lad SP, Neet KE, Mufson EJ. Nerve growth factor: structure, function and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2: 315-334 (2003).
- [103] Campenot RB, MacLinnis BL. Retrograde transport of neurotrophins: fact and function. *J Neurobiol* 58: 217-229 (2004).
- [104] von Bartheld CS, Wang X, Butowt R. Anterograde axonal transport, transcytosis, and recycling of neurotrophic factors: the concept of trophic currencies in neural networks. *Mol Neurobiol* 24: 1-28 (2001).
- [105] Yano H, Chao MV. Mechanisms of neurotrophin receptor vesicular transport. *J Neurobiol* 58: 244-257 (2004).
- [106] Perini G, Della-Bianca V, Politi V, Della Valle G, Dal-Pra I, Rossi F, *et al.* Role of p75 neurotrophin receptor in the neurotoxicity by beta-amyloid peptides and synergistic effect of inflammatory cytokines. *J Exp Med* 195: 907-918 (2002).
- [107] Yaar M, Zhai S, Fine RE, Eisenhauer PB, Arble BL, Stewart KB, *et al.* Amyloid beta binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor and activates receptor signaling. *J Biol Chem* 277: 7720-7725 (2002).
- [108] Plant LD, Boyle JP, Smith IF, Peers C, Pearson HA. The production of amyloid beta peptide is a critical requirement for the viability of central neurons. *J Neurosci* 23: 5531-5535 (2003).
- [109] Tsukamoto E, Hashimoto Y, Kanekura K, Niikura T, Aiso S, Nishimoto I. Characterization of the toxic mechanism triggered by Alzheimer's amyloid-beta peptides via p75 neurotrophin receptor in neuronal hybrid cells. *J Neurosci Res* 73: 627-636 (2003).
- [110] Zhang Y, Hong Y, Bounhar Y, Blacker M, Roucou X, Tounekti O, *et al.* p75 neurotrophin receptor protects primary cultures of human neurons against extracellular amyloid beta peptide cytotoxicity. *J Neurosci* 23: 7385-7394 (2003).
- [111] Barker PA. p75NTR is positively promiscuous: novel partners and new insights. *Neuron* 42: 529-533 (2004).
- [112] Jung KM, Tan S, Landman N, Petrova K, Murray S, Lewis R, *et al.* Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor. *J Biol Chem* 278: 42161-42169 (2003).
- [113] Nishimoto I, Okamoto T, Matsuura Y, Takahashi S, Okamoto T, Murayama Y, *et al.* Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o). *Nature* 362: 75-79 (1993).
- [114] Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem* 270: 4205-4208 (1995).
- [115] Okamoto T, Takeda S, Giambarella U, Murayama Y, Matsui T, Katada T, *et al.* Nishimoto I. Intrinsic signaling function of APP as a novel target of three V642 mutations linked to familial Alzheimer's disease. *EMBO J* 15: 3769-3777 (1996).
- [116] Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82: 239-259 (1991).
- [117] Goedert M. Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 16: 460-465 (1993).
- [118] Iqbal K, Alonso Adel C, Chen S, Chohan MO, El-Akkad E, Gong CX, *et al.* Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 1739: 198-210 (2005).
- [119] Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 293: 1487-1491 (2001).
- [120] Zheng WH, Bastianetto S, Mennicken F, Ma W, Kar S. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience* 115: 201-211 (2002).
- [121] Duyckaerts C. Looking for the link between plaques and tangles. *Neurobiol Aging* 25: 735-739; discussion 743-736 (2004).
- [122] Kins S, Cramer A, Evans DR, Hemmings BA, Nitsch RM, Gotz J. Reduced protein phosphatase 2A activity induces hyperphosphorylation and altered compartmentalization of tau in transgenic mice. *J Biol Chem* 276: 38193-38200 (2001).
- [123] Kondratieff CM, Vandre DD. Alzheimer's disease neurofibrillary tangles contain mitosis-specific phosphoepitopes. *J Neurochem* 67: 2405-2416 (1996).
- [124] Goold RG, Gordon-Weeks PR. Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3beta is induced during PC12 cell differentiation. *J Cell Sci* 114: 4273-4284 (2001).
- [125] Yokota T, Mishra M, Akatsu H, Miyauchi T, Yamamoto T, Kosaka K, *et al.* Brain-Site-Specific Gene Expression Analysis in Alzheimer's Disease Patients. Submitted.
- [126] Hata R, Masumura M, Akatsu H, Li F, Fujita H, Nagai Y, *et al.* Up-regulation of calcineurin Abeta mRNA in the Alzheimer's disease brain: assessment by cDNA microarray. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 310-316 (2001).
- [127] Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N. Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150: 989-1000 (2000).
- [128] Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N. Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 155: 65-76 (2001).
- [129] Gonzalez-Billault C, Engelke M, Jimenez-Mateos EM, Wandosell F, Caceres A, Avila J. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 67: 713-719 (2002).
- [130] He W, Lu Y, Qahwash I, Hu XY, Chang A, Yan R. Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat Med* 10: 959-965 (2004).
- [131] Wildasin K. Role of reticulon proteins in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 3: 576 (2004).
- [132] Song S, Kim SY, Hong YM, Jo DG, Lee JY, Shim SM, *et al.* Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid-beta neurotoxicity. *Mol Cell* 12: 553-563 (2003).
- [133] Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS. CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem* 279: 4869-4876 (2004).
- [134] Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, *et al.* A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6336-6341 (2001).
- [135] Horn EJ, Albor A, Liu Y, El-Hizawi S, Vanderbeek GE, Babcock M, *et al.* RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties. *Carcinogenesis* 25: 157-167 (2004).
- [136] Kallijarvi J, Lahtinen U, Hamalainen R, Lipsanen-Nyman M, Palvimo JJ, Lehesjoki AE. TRIM37 defective in mulibrey nanism is a novel RING finger ubiquitin E3 ligase. *Exp Cell Res* 308: 146-155 (2005).
- [137] Song S, Jung YK. Alzheimer's disease meets the ubiquitin-proteasome system. *Trends Mol Med* 10: 565-570 (2004).
- [138] Heese K, Fujita M, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, *et al.* The splicing regulatory protein p18SRP is down-regulated in Alzheimer's disease brain. *J Mol Neurosci* 24: 269-276 (2004).
- [139] Heese K, Nagai Y, Sawada T. Nerve growth factor (NGF) induces mRNA expression of the new transcription factor protein p48ZnF. *Exp Mol Med* 36: 130-134 (2004).
- [140] Heese K, Yamada T, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, *et al.* Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem* 91: 1030-1042 (2004).
- [141] Nagai Y, Ogasawara A, Heese K. [Possible mechanisms of A beta(1-40)- or A beta(1-42)-induced cell death and their rescue factors]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 124: 135-143 (2004).
- [142] Taguchi K, Yamagata HD, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, *et al.* Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 57: 585-588 (2005).
- [143] Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, Ugen KE, Dickey C, Hardy J, *et al.* A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 982-985 (2000).

- [144] Janus C, Pearson J, McLaurin J, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, *et al.* A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease. *Nature* 408: 979-982 (2000).
- [145] Helmuth L. New therapies. New Alzheimer's treatments that may ease the mind. *Science* 297: 1260-1262 (2002).
- [146] Birmingham K, Frantz S. Set back to Alzheimer vaccine studies. *Nat Med* 8: 199-200 (2002).
- [147] Nitsch RM. Immunotherapy of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 18: 185-189 (2004).
- [148] Rosenberg RN. Immunotherapy for Alzheimer disease: the promise and the problem. *Arch Neurol* 62: 1506-1507 (2005).
- [149] De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, Capsoni S, Maffei L, Berardi N, *et al.* Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102: 3811-3816 (2005).
- [150] Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, *et al.* A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 11: 551-555 (2005).
- [151] Bradbury J. Hope for AD with NGF gene-therapy trial. *Lancet Neurol* 4:335 (2005).



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainresBRAIN
RESEARCH

Research Report

A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes

Kazuki Satoh^{a,b,*}, Mitsumi Hata^{a,b}, Seiji Takahara^{a,b}, Hidetoshi Tsuzaki^{a,b}, Hiroshi Yokota^b, Hiroyasu Akatsu^c, Takayuki Yamamoto^c, Kenji Kosaka^c, Tatsuo Yamada^d

^aThe Fifth Frontier Project, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo 134-8640, Japan

^bDrug Discovery Research Laboratories, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-16-13 Kitakasai, Edogawa-Ku, Tokyo 134-8640, Japan

^cChochu Medical Institute, Fukushima Hospital, Aichi 441-8124, Japan

^dFifth Department of Internal Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 11 June 2006

Available online 18 July 2006

Keywords:

Molecular cloning

Beta-amyloid

Astrocyte

mRNA expression

Alzheimer's disease

cDNA subtraction

ABSTRACT

Beta-amyloid (A β) deposition and senile plaque-associated astrocytes are common neuropathological features of Alzheimer's disease (AD). Although the molecular mechanisms by which A β contributes to the progression of neuropathologic changes have not been entirely established, there is little doubt that the association of A β with astrocytes, the predominant cell type in brain, significantly influences exacerbation of the disease. In an effort to identify astrocyte-derived molecules that may be intimately associated with progression of AD, we identified a novel A β -induced rat gene, designated Mib, whose human counterpart covers KIAA0233. Mib-transfected C6 cells express Mib protein in the endoplasmic reticulum and endoplasmic reticulum–Golgi-intermediate compartment. To evaluate roles of Mib in AD, we investigated its expression in the AD brain. In non-AD brains, Mib mRNA has been detected in neurons but not in quiescent astrocytes. On the contrary, in AD brains, Mib mRNA is expressed in activated astrocytes associated with senile plaques, but not expressed in neurons around lesions. From these observations, Mib appears to be a novel A β -responsive gene that may play a role in astrocyte inflammatory activation around senile plaques in the AD brain.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The neuropathological changes in the brains of patients with Alzheimer's disease (AD) include neuronal and synaptic loss, accumulation of abnormal tau filaments as intracellular neurofibrillary tangles, as well as the appearance of numerous senile plaques and reactive gliosis. A principal component of plaques is beta-amyloid (A β), which is demonstrated to induce

astrocyte activation in addition to possessing direct toxicity to neurons, and this extracellular deposition is considered to be one of the most crucial events in the onset of AD (Yankner, 1996; Dickson, 1997; Selkoe, 2001). Numerous activated astrocytes observed in lesions are a common feature in the AD brain as well as in many other neurodegenerative disorders. They surround the A β -deposited plaques, exhibit morphological changes, and produce a variety of inflammatory media-

* Corresponding author. Fax: +81 3 56968196.

E-mail address: satohj7i@daiichipharm.co.jp (K. Satoh).

tors in AD brains (Pike et al., 1995; McGeer and McGeer, 1995; Mrak et al., 1995; Johnstone et al., 1999; Wyss-Coray et al., 2003; Nagale et al., 2004).

These observations support the notion that the activated astrocytes in AD lesions have a significant influence on neighboring neurons and their environment in relation to progression of the disease. Apparently, A β has a critical role in the exacerbation of AD, and there is little doubt that the association of this molecule with astrocytes significantly affects the lesions of AD brains. Nevertheless, the molecular mechanisms by which A β contributes to the progression of astrocyte-mediated neuropathological changes and the actual influence these predominant cells in brain have on exacerbation of AD are not well established.

In an effort to identify key molecules that may be intimately associated with AD progression, we searched for A β -responsive mRNAs derived from astrocytes by using a cDNA subtraction technique. In this study, we identified a novel A β -induced gene covering KIAA0233, designated Mib. The rat and human protein domain structures, intracellular localization analysis, and evaluation of mRNA expression in AD brains are reported here. Our results give insights into the involvement of this novel gene in AD brain pathology.

2. Results and discussion

2.1. Identification of a novel A β -induced gene

One subtracted cDNA fragment that originated from a distinctly A β -induced astrocyte mRNA (Fig. 1) did not show any nucleotide sequence similarity with DDBJ/EMBL/GenBank data. We compiled an A β -treated rat astrocyte cDNA library, screened it using this fragment as a probe, and cloned a 7.0 kb cDNA. Determination of the nucleotide sequence revealed this cDNA to be a novel rat gene with an ORF of 6318 bp (registered in DDBJ/EMBL/GenBank with the accession number AB161229) initiated by an appropriate sequence (GCCATGATGG) for the eukaryotic consensus (Kozak, 1987). The subtracted cDNA fragment, harboring 200 bp nucleotides, was found to extend over the short 3'-terminal-end of the ORF and 3'-untranslated regions in the mRNA. No additional translation initiation sites in the 5'-upstream region of the obtained cDNA were obtained by the 5'-RACE method (data not shown). The cDNA encodes 2106 amino acids, and the deduced protein has a typical signal sequence (residues 1–27), followed by 23 transmembrane regions (Fig. 2). Except for the numerous transmembrane regions, there were no distinctly predictive motifs in this protein, so that we designated this protein as Mib (a membrane protein induced by beta-amyloid-treatment). A β treatment of rat astrocytes resulted in an approximately 7-fold induction of Mib compared with nontreated cells, as quantified by the intensity of radioactive bands on Northern blot analysis and normalized to those of the β -actin (Figs. 1A and B).

2.2. Determination of human counterpart, hMib

Based on 82.9% amino acid identity (68.8% at the nucleotide level), rMib is thought to be the rat orthologue of the human gene covering KIAA0233 (Nagase et al., 1996). The observation

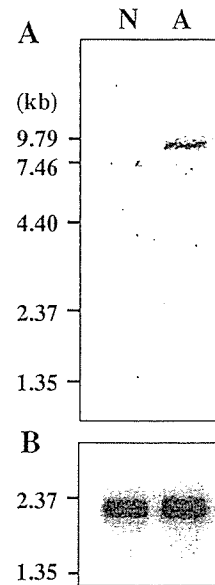


Fig. 1 – Northern blot analysis of rMib. Each lane contains 2 μ g of poly(A)+RNA isolated from nontreated (N) and beta-amyloid (25 μ M) treated (A) rat astrocytes. (A) The blot was hybridized with the random primed subtracted rMib cDNA probe and exposed for 3 h. (B) As an internal control, the blot was hybridized with the β -actin cDNA control probe and exposed for 2 h.

that the deduced amino acids of rMib have additional N-terminal sequences to that of KIAA0233, as mentioned in the N-terminal truncation warning on the HUGE web site (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfpage/KIAA0233/>), prompted us to determine the human counterpart cDNA, hMib. The terminal and internal nucleotide sequences of the hMib mRNA were determined by RACE and RT-PCR methods with oligonucleotide primers based on the sequences of KIAA0233 (see Experimental procedure). The compilation of nucleotide sequences revealed that hMib cDNA, with an ORF of 6270 bp (registered in DDBJ/EMBL/GenBank with the accession number AB161230) and the same translational initiation sequence as that of rMib mentioned above, encodes 2090 amino acids. The deduced protein has a typical signal sequence (1–27 residues) and 24 transmembrane domains (Fig. 2). Human Mib has 54 amino acids added to the N-terminus of KIAA0233 and shares 83.1% amino acid identity with the rat counterpart (69.4% at the nucleotide level).

2.3. Tissue expression

Rat Mib displayed moderate expression in lung and kidney, and very weak expression in heart, spleen, and liver (Fig. 3). The under-detectable expression of rMib in the brain suggests that the expression is controlled at low levels in the steady state and is consistent with the result shown in Fig. 1. The expression pattern of hMib in tissues was similar to the result displayed on the HUGE web site (<http://www.kazusa.or.jp/huge/gfimage/northern/html/KIAA0233.html>) (data not shown). As with the result from rat tissues, hMib expression is also regulated to be low in brain relative to other tissues.

2.4. Mib intracellular localization

The observation that Mib has a large number of transmembrane domains prompted us to evaluate a possibility that the protein may reside specifically in some organelles. To elucidate the intracellular localization of Mib, a plasmid containing the C-terminal GFP-fused rMib ORF region was transiently introduced into C6 rat glial cells. After 48 h posttransfection, the cells were analyzed by double immunofluorescence staining for each intracellular resident protein. Rat Mib was co-localized with SERCA2 (a marker for endoplasmic reticulum (ER); Fig. 4A) and β -COP (a marker for ER-Golgi-intermediate compartment (ERGIC) and cis-Golgi; Fig. 4B) but not with GM130 (a marker for cis-Golgi; Fig. 4C) or markers for mitochondria, early endosomes, and lysosomes (data not shown). These results indicate that Mib resides in the ER and ERGIC (also referred to as vesicular tubular clusters), but does not enter into the Golgi apparatus. Based on its numerous transmembrane domains, Mib appears to be a protein existing in membranes constituting the ER and ERGIC and might be involved in intracellular protein transport and/or modification.

2.5. Mib expression in activated astrocytes adjacent to senile plaques of Alzheimer's disease brain

Mib has been identified as an $A\beta$ -responsive astrocyte gene through an effort to identify novel astrocyte molecules involved in Alzheimer's disease. To evaluate the pathological involvement of hMib in AD, localization of the gene transcripts was evaluated in cerebral cortex sections from the patients by *in situ* hybridization analysis. As shown in Fig. 5A, mRNA for hMib was expressed in only neurons, but not in astrocytes in age-matched non-AD cortex sections. In AD brain sections, there appeared areas where hMib mRNA expression was not observed in neurons or was observed in damaged-shaped neurons, and these areas are thought to be lesions. In these 'neuron-negative' areas, hMib mRNA expression was detected in some cells surrounding the nonspecifically stained senile plaques (Fig. 5B). These plaques, which were associated with hMib mRNA-positive cells, were verified to contain $A\beta$ using an anti- $A\beta$ antibody (Fig. 5C). Immunohistochemistry with anti-GFAP revealed that these senile plaque-associated hMib mRNA-positive cells were activated astrocytes (Fig. 5D). A review of five AD brain sections indicated that approximately half of the activated astrocytes located around classical senile plaques were positive for hMib mRNA expression. Control hybridization sections, which were incubated without the DNA probe or with a 1:1 mixture of the digoxigenin-11dUTP-labeled and nonlabeled PCR DNA probe, were negative. When a 10:1 mixture of the digoxigenin-11dUTP-labeled and non-labeled PCR DNA probe was used, only a weak signal could be detected (data not shown). These results indicate that hMib is a distinctly inducible gene in human astrocytes *in vivo* similar to the result of *in vitro* studies on rMib in rat astrocytes (Fig. 1), because hMib mRNA was detected in activated astrocytes around senile plaques in AD brain, but not in quiescent astrocytes in non-AD brain nor in lesion-free areas of AD brains. In contrast, neurons express hMib mRNA in non-AD brains and in lesion-free areas of AD brains. These results

suggest that hMib expression may be required for maintenance of homeostasis in neuronal activities, although it is not clear whether loss of hMib mRNA in neurons of AD brains is caused by cellular death or loss of homeostasis in diseased neurons. It is also possible that the roles of Mib may differ between astrocytes and neurons.

In inflammatory states, as in AD and other neurodegenerative disorders, numerous activated astrocytes are observed in lesions. Mib might be involved in astroglial inflammatory activation through intracellular protein transport and/or modification, based on analysis of its subcellular localization. There is a possibility that Mib may be involved in ER stress (Kondo et al., 2005), because inducible nitric oxide synthase, which produces the stress-causing nitric oxide (Oyadomari et al., 2001), has been predominantly screened from the same subtracted library (Sato et al., 2002). To investigate whether expression of hMib mRNA in activated astrocytes occurs in other neurodegenerative disorders than AD, we evaluated localization of the mRNA in substantia nigra sections from Parkinson's disease (PD) patients by *in situ* hybridization analysis. In substantia nigra of neurologically normal control, hMib mRNA expression was observed only in neurons (Fig. 6A). In PD substantia nigra, the number of melanin-containing neurons was extremely decreased, and hMib mRNA expression was not detected in a few remaining melanin-containing neurons or activated astrocytes (Fig. 6B). Human Mib mRNA expression was observed in some nonmelanized neurons (Fig. 6C). Existence of activated astrocytes in PD sections used was confirmed by immunohistochemistry with anti-GFAP (data not shown). Taken together with the facts that rMib was screened out from $A\beta$ -treated astrocyte cDNA library and hMib mRNA expression was observed in senile plaque-associated astrocytes, these results suggest induction of Mib mRNA expression in activated astrocytes may be caused by astrocytes' connection with $A\beta$. Further functional investigation into Mib may provide additional insights into its physiological role, particularly in neurodegenerative inflammation and disease pathways in AD.

3. Experimental procedures

3.1. Astrocyte cell culture and $A\beta$ peptides treatment

Rat astrocytes were prepared from cerebral cortex by a previously described method (Kato et al., 1979). Briefly, cerebra of 18-day fetuses of Wistar rats (Charles River Laboratories) were isolated and dissociated with trypsin before culturing in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) containing 20% fetal calf serum (FCS; Gibco) and antimycotic solution (Sigma) for 1 week. After trypsin treatment, the secondary culture was grown in DMEM containing 10% FCS. The preparation of aggregated $A\beta$ was as previously described (Sato et al., 2000). After the astrocytes (first passage cells) reached about 80% confluency, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and the medium was replaced with DMEM containing B27 (Gibco) supplement. After 48 h, aggregated $A\beta$ (25 μ M) or control medium was then added to the cells and incubated for 15 h.

3.2. cDNA subtraction and screening

Total RNA of β -treated or nontreated astrocytes was purified (Chomczynski and Sacchi, 1987) and poly A (+)

RNA was obtained using oligo (dT) latex resin (Roche). β -treated cDNA was subtracted by using a PCR-select cDNA subtraction kit (Clontech) with nontreated astrocyte-derived cDNAs (forward subtraction), and the concurrent reverse

```

1' MVWSIMYHSW LTFVLLWAC LIWTVRSRHQ LAMLCSPCIL LYGLTLCCIR YVWAMEL-PE
*****
1" MVWSITYHSW LTFVLLWAC LIWTVRSRHQ LAMLCSPCIL LYGMTLCCIR YVWAMDLRPE

60' LPTTLGVPVSL HQLGLEHTRY PCLDLGAMLL YLLTFWLLLR QFVKEKLLKK RKAPSTLLEV
*****
61" LPTTLGVPVSL RQLGLEHTRY PCLDLGAMLL YLLTFWLLLR QFVKEKLLKW AESPAALTEV

120' TVSDTEPTQT QTLRLSGLGEL VTGLYVKYWI YVCAGMFIVV SFAGRLVVYK IVYMFLLC
*****
121" TVADTEPTRT QTLRLSGLGEL VKGVYKWI YVCAGMFIVV SFAGRLVVYK IVYMFLLC

180' LTLFQVYYTL WRKLLRNFVW LVVAYTMLVL IAVYTFQFD PFTYWRNLTG FTDEQLGDLG
*****
181" LTLFQVYYSL WRKLLRNFVW LVVAYTMLVL IAVYTFQFD FPAYWRNLTG FTDEQLGDLG

240' LEQFSVSELF SSILIPGFLL LACILQLHYF HRPFMQLTDL EHVPPPGTRR LRWAHRQDTV
*****
241" LEQFSVSELF SSILVPGFLL LACILQLHYF HRPFMQLTDM EHVSLPGTRL PRWAHRQDAV

300' SEAPLL---- ------QH QEEEEVFRDD GQSMGPHQT TQVPEGTASQ WGLVADRLLD
*****
301" SGTPLLRREQ QEHQQQQEE EEEEEBSRDE GLGVATPHQA TQVPEG-AAK WGLVAERLLE

348' LASSFSAVLT RIQVFRCLL ELHVFKLVAL YTVWVALKEV SVMNLLLVLV WAFALYPRF
*****
360" LAAGFSDVLS RVQVFLRLL ELHVFKLVAL YTVWVALKEV SVMNLLLVLV WAFALYPRF

408' RPMASCLSTV WTCIIIVCKM LYQLKIVNPH EYSSNCTEFP HNSTNLQPLE ISQSLLYRGP
*****
420" RPMASCLSTV WTCVIIIVCKM LYQLKVVNPQ EYSSNCTEFP HNSTNLLPTE ISQSLLYRGP

468' VDPANWFGVR KGYPNLGYIQ NHLQILLLL VFEAVYRRQE HYRRQHQQAP LPAQALCADG
*****
480" VDPANWFGVR KGFPNLGYIQ NHLQVLLL VFEAVYRRQE HYRRQHQLAP LPAQAVFASG

528' TRQRLDQDLL SCLKYFINFF FYKFGLEICF LMAVNVIGQR MNFMVILHGC WLVAILTTRR
*****
540" TRQQLDQDLL GCLKYFINFF FYKFGLEICF LMAVNVIGQR MNFLVTLHGC WLVAILTTRR

588' REAIARLWPN YCLFRTLFL YQYLLCLGMP PALCIDYPWR WSQAI PMNSA LIKWLYLPDF
*****
600" RQAIARLWPN YCLFLALFL YQYLLCLGMP PALCIDYPWR WSRVPMNSA LIKWLYLPDF

648' FRAPNSTNLI SDFLLLCAS QWQVFSAEQ TEEWQRMAGV NTDHLEPLRG EPNPVPNFH
*****
660" FRAPNSTNLI SDFLLLCAS QWQVFSAEQ TEEWQRMAGV NTDRLLEPLRG EPNPVPNFH

708' CRSYLDMLKV AVFRYLFWL VVVVFTGAT RISIFGLGYL LACFYLLFG TTLQKDTRA
*****
720" CRSYLDMLKV AVFRYLFWL VVVVFTGAT RISIFGLGYL LACFYLLFG TALLQDTRA

768' QLVLWDCLIL YNVTVIISK MSLSLSCVFV EQMQSNFCWV IQLFSLVCTV KGYDYPKEMK
*****
780" RLVLWDCLIL YNVTVIISK MSLSLACVFV EQMQTGFCWV IQLFSLVCTV KGYDYPKEMM

828' TRDRDCLLPV EEAGIIWDSI CFFPPLLQRR VFLSHYFLHV SADLKATALQ ASRGFALYNA
*****
840" DRDQDCLLPV EEAGIIWDSV CFFPPLLQRR VFLSHYFLHV RADLQATALL ASRGFALYNA

888' ANIKNINFHR QTEERSLAQL KRQMKRIRAK QEKYRQSQAS RG---QLQS TDPQ-EPGPD
*****
900" ANLKSIDFHR RIEEKSLAQL KRQMERIRAK QEKHRQGRVD RSRPQDTLGP KDPGLEPGPD

```

Fig. 2 – Comparison of the Mib amino acid sequences. The amino acid residues for rat (top line) and human (bottom line) Mib are shown and have 83% homology, based on identical matches. The numbers denoted at the left side of the sequences correspond to numbering of respective proteins. The Mib N-terminal region consists of a putative signal sequence (1–27 amino acids, underlined) followed by 23 transmembrane domains in rat or 24 in human. Seven potential N-linked glycosylation sites corresponding to the sequence N-X-S/T are boxed. Domain structure was predicted by PSORT II analysis.

943' SPGSSSPRT QWRPWQDHA TVIHSGDYFL FESDSEEEEE ALPEDPRPAA QSAFQMayQA
 ***** **

960" SPGSSSPRR QWRPWLDHA TVIHSGDYFL FESDSEEEEE AVPEDPRPSA QSAFQLAYQA
 ***** **

1003' WVTNAQTVLR QR--REQAR RDRAEQLASG GDLSPEVELV DVPENEMAGH SHVMQRVLST
 ***** **

1020" WVTNAQAVLR RRQEQEQAR QEQAQQLPTG GGPSQEVEPA EGPEEAAAGR SHVVQRVLST
 ***** **

1060' MQFLWVLGQA TVDGLTRWLR TFKDHRMS DVLCAERYLL TQELLRGGEV HRGVLQQLYV
 ***** **

1080" AQFLWMLGQA LVDELTRWLG EFTRRHGTMS DVLRAERYLL TQELLQGGEV HRGVLQQLYT
 ***** **

1120' SEDEIALSGP VENRDGPSTA SSGLGAEELP SSMTDDTSGP LSTGYNTRSG SEBIITDTGG
 ***** **

1140" SQAEATLPGP TEAPNAPSTV SSGLGAEELP SSMTDDMGSP LSTGYHTRSG SEEAATDPGE
 ***** **

1180' LQAGTSLHGS QELLANARTR MRTASELLLD RRLRIPELEE AEQFEAQGR TLRLLRAMYQ
 ***** **

1200" REAGASLY-- QGLM----- -RTASELLLD RRLRIPELEE AELFAEQGR ALRLLRAVYQ
 ***** **

1240' CVAAHSELLC YFIIILNHMV TASNASLVLP VLVFLWAMLT IPRPSKRFWM TAIVFTEVMV
 ***** **

1251" CVAAHSELLC YFIIILNHMV TASNAGSLVLP VLVFLWAMLS IPRPSKRFWM TAIVFTEIIV
 ***** **

1300' VTKYLFQGF FPWNSYIVLR RYENKPYFPP RILGLEKTDG YIKYDLVQLM ALFFHRSQLL
 ***** **

1311" VVKYLFQGF FPWNSHVVLV RYENKPYFPP RILGLEKTDG YIKYDLVQLM ALFFHRSQLL
 ***** **

1360' CYGLWDHEED GVPKDHCRSS EKDQEAEEES EAKLESQPET GTGHPPEBVL TGTPKDHIQG
 ***** **

1371" CYGLWDHEED SPSKEHDKSG EEEQGAEEGP -----GVP AATEDHIVQ
 ***** **

1420' KGSVRSKDEI QDPPEDLKPQ HRRHISIRFR RR-KETQGPK GAAVVEAEHE EGEEGREAAG
 ***** **

1414" EARVGPDTGT PEPQVELRPR DTRRISLFR RKKKEGPARK GAAATEAEDR EEEGEEBKE
 ***** **

1479' RKRLRRPREG LKIREKMKAA GRRLQSFCLS LAQSFYQPLR RFFHDILHTK YRAATDVYAL
 ***** **

1474" APTGREKRPS -RSGGRVRAA GRRLQGFCLS LAQGYRPLR RFFHDILHTK YRAATDVYAL
 ***** **

1539' MFLADIVDIV VIIFGFWAFG KHSAAATDIAS SLSDDQVQA FLFMLLVQFG TMVVDRALYL
 ***** **

1533" MFLADVDFI IIIFGFWAFG KHSAAATDITS SLSDDQVPEA FLVMLLIQFS TMVVDRALYL
 ***** **

1599' RKTIVLGNLAF QVVLVVAIHL WMFFILPAVT ERMFRQNAVA QLWYFVKCIY FALSAYQIRC
 ***** **

1593" RKTIVLGLAF QVALVLAIHL WMFFILPAVT ERMFNQNVVA QLWYFVKCIY FALSAYQIRC
 ***** **

1659' GYPTRILGNF LTKKYNHNL FLPQGFRLVP FLVELRAVMD WWTDTTSL SNMVCVEDIY
 ***** **

1653" GYPTRILGNF LTKKYNHNL FLPQGFRLVP FLVELRAVMD WWTDTTSL SSMVCVEDIY
 ***** **

1719' ANIFIKCSR ETEKYPQPK GQKKKIVKY GMGGLILFL IAIWFPPLF MSLLRSVGV
 ***** **

1713" ANIFIKCSR ETEKYPQPK GQKKKIVKY GMGGLILFL IAIWFPPLF MSLLRSVGV
 ***** **

1779' VNQPIDVTVT LKLGGEPLF TMSAQPSIV PFTPEYEEL SQQFDPYLA MQFISQYSPE
 ***** **

1773" VNQPIDVTVT LKLGGEPLF TMSAQPSII PFTAQAYEEL SRQFDPQLA MQFISQYSPE
 ***** **

1839' DIVTAQIEGS SGALWRISPP SRAQMKHELY NGTADITLRF TWNFQDLAK GGSVEYTNBK
 ***** **

1833" DIVTAQIEGS SGALWRISPP SRAQMKRELY NGTADITLRF TWNFQDLAK GGTVEYANEK
 ***** **

1899' HTLELAPNST ARRQLAQLLE GRPDQSVVIP HLPFKYIRAP NGPEANPVKQ LQPDEEDYL
 ***** **

1893" HMLALAPNST ARRQLASLLE GTSQSVVIP NLPFKYIRAP NGPEANPVKQ LQPNEADYL
 ***** **

1959' GVRIQLRREQ VGTGTSGEQA GTKASDFLEW WVIELQDCQA ECNLLPMVIF SDKVSPPSLG
 ***** **

1953" GVRIQLRREQ -GAGATG--- -----FLEW WVIELQECRT DCNLLPMVIF SDKVSPPSLG
 ***** **

2019' FLAGYGIVGL YVSIVLVVGK FVRGFFSDIS HSIMPEELPC VDRILKLCQD IFLVRETRLE
 ***** **

2003" FLAGYGIMGL YVSIVLVIGK FVRGFFSEIS HSIMPEELPC VDRILKLCQD IFLVRETRLE
 ***** **

2079' ELEEELYAKL IFLYRSPETM IKWTREKE
 ***** **

2063" ELEEELYAKL IFLYRSPETM IKWTREKE
 ***** **

Fig. 2 (continued).

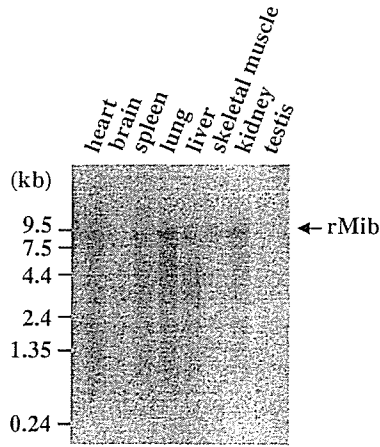


Fig. 3 – Tissue analysis of rat Mib mRNA expression. Each lane represents 2 μ g of rat poly(A)+RNA purified from normal heart, brain, spleen, lung, liver, skeletal muscle, kidney, and testis. The blot was hybridized with the rMib cDNA probe and exposed for 16 h.

subtraction was also performed. Compilation of a cDNA-subtracted plasmid library and screening procedures were as described previously (Sato et al., 2002). Briefly, PCR-

amplified cDNA fragments from randomized clones from the forward-subtracted plasmid library were blotted onto Hybond-N+ nylon membranes (Amersham) followed by hybridization with randomly 32 P-labeled forward and reverse-subtracted cDNAs, respectively. cDNA fragments that showed specific concentrations in the forward-subtracted cDNAs compared with those of reverse were selected as candidates for A β -induced cDNA fragments. Each 2 μ g of poly A (+) RNA from A β -treated and nontreated astrocytes was subjected to 1.2% formamide agarose gel electrophoresis before being transferred to a Hybond-N nylon membrane (Amersham). The membranes were hybridized with the randomly 32 P-labeled cDNA fragment candidates or β -actin (Clontech) followed by detection with BAS2000 (Fuji Film). The subtracted cDNA fragments that showed A β -induced expression by Northern blot analysis were sequenced with ALF Express Sequencer (Pharmacia) and a homology search of the sequences was performed by using the NCBI database. The full-length cDNA of one subtracted fragment that did not show any homology with the database was obtained from an A β -treated rat cDNA library (5×10^5 plaques) compiled in λ ZAP II (Stratagene) with the subtracted fragment as a probe. The sequence of the full open reading frame (ORF) was determined with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer and designated as rat Mib (rMib). Based on the deduced amino-acid sequence, the domain structure was predicted by a bioinformatic algorithm, PSORT II.

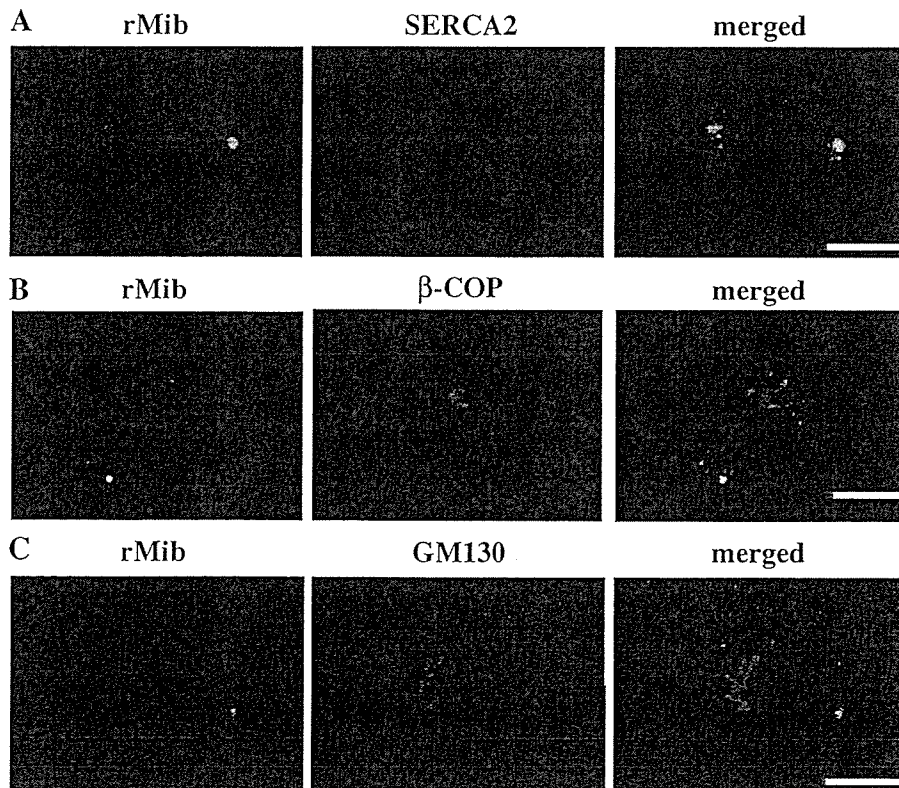


Fig. 4 – Intracellular localization of Mib. C6 cells were transiently transfected with GFP-tagged rMib. After 48 h, the cells were fixed, permeabilized, and double-labeled with anti-SERCA2 (A), anti- β -COP (B), or anti-GM130 (C) antibodies (red color) prior to analysis by confocal laser scanning microscopy. Note the co-localization of rMib with SERCA2 and β -COP, as shown by the yellow color where the fluorescence signals overlap, but not with GM130. Scale bars: 10 μ m.

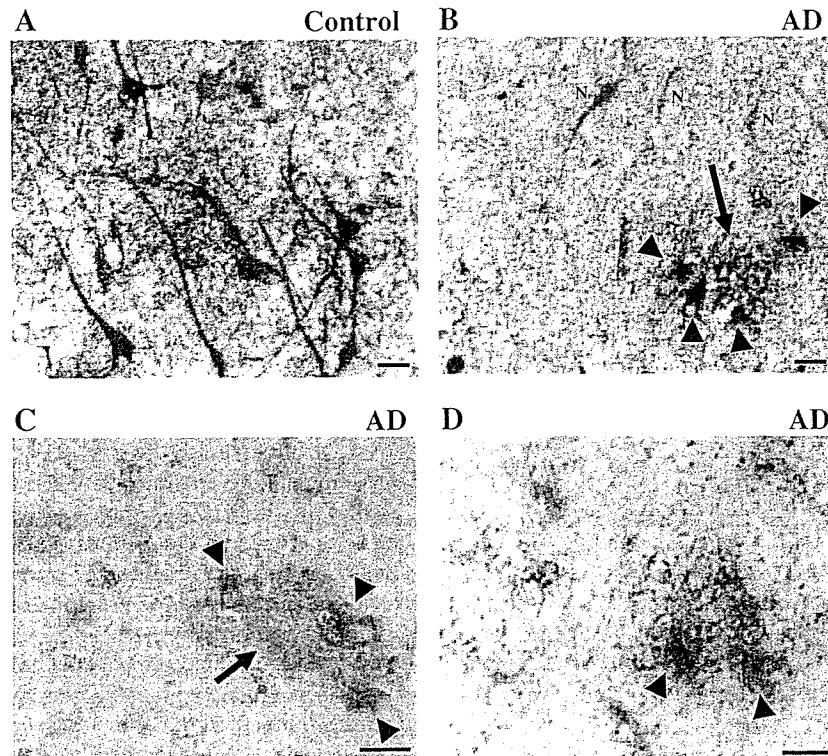


Fig. 5 – In situ localization of hMib mRNA in non-AD (A) and AD brain sections (B, C, D). (A) Positive signals for hMib mRNA were seen in neurons in non-AD cerebral cortex. (B) In the AD brain, unlike the non-AD one, areas devoid of hMib mRNA expression in neurons were observed. In these areas where hMib mRNA-positive neurons were not seen, signals for hMib mRNA were seen in several other nonneuronal cells (arrowheads). Positive cells surrounding nonspecifically stained senile plaques (arrow) were observed. Neuron was faintly stained (N). Nonspecific staining was seen in some vessels. (C) In situ hybridization histochemistry for hMib mRNA (blue black) followed by immunohistochemistry with anti-A β antibody (brown) in AD brain. Cells positive for hMib mRNA expression (arrowheads) directly surround senile plaques positive for A β (arrow). (D) In situ hybridization histochemistry for hMib mRNA (blue black) followed by immunohistochemistry with anti-GFAP antibody (brown) in AD brain. Cells positive for hMib mRNA expression (arrowheads) were also positive for GFAP. Scale bars: 20 μ m.

3.3. Determination of nucleotide sequence of the human Mib

Nucleotide primers used here were generated based on the KIAA0233 nucleotide sequence. The terminal mRNA sequences were determined by 5'- and 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) methods with a GeneRacer kit (Invitrogen) according to the supplier's instructions. The gene-specific primer used for the 5'-RACE reaction is 5'-GAACATGCCAGCACACATAGATC-3' and that for the 3'-RACE is 5'-TGCACGGCGGCAGCTG-3'. For determination of the remaining internal mRNA sequences by reverse transcriptase PCR (RT-PCR), the cDNA was divided into 6 regions to avoid DNA polymerization errors. Primer sequences used for amplification of respective regions were as follows: nt 357–1222, forward primer 5'-GGTACCGTGGCAGACACAG-3' and reverse primer 5'-CCACCAGCAGCAGGTTTCATC-3'; nt 1152–1958, forward primer 5'-CAAGCTGGTGGCCCTGTAC-3' and reverse primer 5'-CACTTGATGAGTGGGAGTTCATG-3'; nt 1889–2706, forward primer 5'-CGGCCCTGTGCATTGATTATCC-3' and reverse primer 5'-GAGGTTGGCAGCGTTGTAGAG-3'; nt 2618–3711, forward primer 5'-GCCATTACTACCTGCAGTCCAG-3'

and reverse primer 5'-CCCCTCCGCAAACAGCTC-3'; nt 3618–4765, forward primer 5'-GTACCAGGGACTGATGCGG-3' and reverse primer 5'-CGCGGTCAACCACCATGG-3'; nt 4668–5757, forward primer 5'-GGCCACAGACATCACGTCC-3' and reverse primer 5'-CACAGACTGGTCCGAGGTG-3' (nt: nucleotides number of hMib ORF sequence registered in DDBJ/EMBL/GenBank with the Accession No. AB161230). Human placenta poly A (+) RNA (Clontech), SuperScript II (Gibco), and KOD Plus DNA polymerase (Toyobo) were used as the cDNA template, reverse transcriptase, and high fidelity DNA polymerase, respectively. Each PCR product was cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen), and each sequence was determined and verified from six independent clones.

3.4. Tissue mRNA expression

To determine the tissue expression profiles of the rat and human genes, Northern blots of poly(A)+RNA extracted from rat or human tissues (MTN blot; Clontech) were hybridized with a randomly 32 P-labeled rat subtracted cDNA probe or human cDNA probe covering nt 3352–3711, as described above.

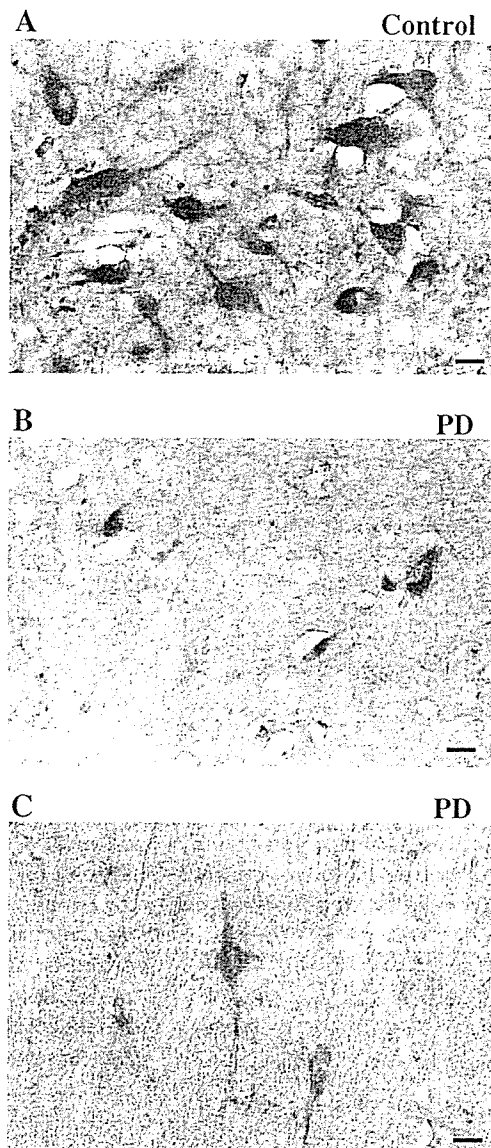


Fig. 6 – In situ localization of hMib mRNA in substantia nigral sections from neurologically normal control (A) and Parkinson's disease (PD) patients (B, C). (A) Positive signals for hMib mRNA were observed in neurons in control substantia nigra. (B) In PD, the number of melanin-containing neurons was extremely decreased, and hMib mRNA expression was not observed in a few remaining melanin-containing neurons. (C) Human Mib mRNA expression was detected in some nonmelanized neurons in PD. Scale bars: 20 μ m.

3.5. Intracellular localization analysis

The ORF region of rMib was cloned into the pHMGFP vector (Promega) and verified by sequencing. The resultant plasmid harboring C-terminal GFP-fused rMib was transfected into C6 rat glioma cells purchased from the American Type Culture Collection and maintained in DMEM containing 10% FCS at 37 °C under 5% CO₂ in a 35-mm dish with an attached coverslip, using FuGENE 6 (Roche). After 48 h, cells were washed with PBS and then fixed with 3.7% paraformaldehyde in PBS

for 15 min, followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS. Cells were then incubated with mouse monoclonal anti-SERCA2 (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPases) antibody (clone IID8; Affinity Bioreagents), rabbit polyclonal anti- β -COP (β -coatmer-protein) antibody (Affinity Bioreagents) or mouse monoclonal anti-GM130 antibody (clone 35; BD Transduction Laboratories) in PBS for 1.5 h at room temperature. After this incubation, cells were washed and incubated for 1 h with either Alexa Flour 568-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes). The stained cells were observed with a confocal laser scanning microscopy (Leica TCS NT).

3.6. Brains

The brains were obtained from the brain bank of the Choji Medical Institute of Fukushima Hospital and protocols used were approved by the ethics committee of Fukushima Hospital. The scientific use of these human materials was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and informed consents were obtained from the guardians of the patients. The brains from five neurologically normal control patients in which Alzheimer's disease (AD)-type changes were lacking (ranged from 54 to 82 years), and those from five patients with AD (ranged from 67 to 80 years) were examined. The diagnosis of AD was established using the criteria recommended by the National Institute on Aging (Khachaturian, 1985) and the Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD) (Mirra et al., 1991). The brains from three neurologically normal control patients (ranged from 61 to 85 years), and those from three patients with Parkinson's disease (PD) (ranged from 61 to 84 years) who fulfilled the diagnostic criteria (Calne et al., 1992) were examined. In all cases, brains were obtained within 2–13 h after death. Small blocks were dissected from the parietal lobes and stored at –80 °C until used. The frozen samples were thawed and fixed for 2 days in phosphate-buffered 4% paraformaldehyde. They were then transferred to a maintenance solution of 15% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and kept in the cold until used. Sections were cut on a freezing microtome at 20- μ m thickness.

3.7. In situ hybridization

Human Mib expression in AD brain tissue was evaluated by *in situ* hybridization histochemistry. An hMib cDNA fragment encompassing nt 3352–3711 of the ORF was amplified by PCR and cloned into pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). A cDNA probe for hMib was constructed by PCR using T7 and SP sequences in the vector as primers. Amplifications were done in 100 μ l PCR buffer containing 10 pM primer, 2 nM dNTPs, 200 pM digoxigenin-11-dUTP (Roche), 10 ng template plasmid, and 5 U ampli-Taq DNA polymerase with a thermal cycler (Perkin-ElmerGeneAmp PCR System 9600). Samples were denatured at 94 °C for 5 min, followed by 30 cycles of amplification for 30 s at 94 °C, 30 s at 50 °C, and 30 s at 72 °C. The final extension was at 72 °C for 5 min. Sections were hybridized at 37 °C for 2 days in buffer containing 50% formamide, 4 \times SSC, 0.2 \times Denhardt's solution, 21 ng/ml salmon sperm DNA, and 250 ng/ml digoxigenin-11-dUTP labeled and nonlabeled PCR DNA probes.

After hybridization, sections were rinsed three times in 1× SSC. Hybridization was detected by an enzyme-catalyzed color reaction with the DIG Nucleic Acid Detection kit (Boehringer Mannheim Biochemica) according to the supplier's instructions. Negative controls were pretreated with RNAase and processed by identical procedures. Other control experiments were done with mixtures of either 10:1 or 1:1 of the digoxigenin-11dUTP-labeled and nonlabeled PCR DNA probes. After detection of the mRNA signal for hMib by in situ hybridization, immunohistochemistry (Yamada et al., 1998) was used to characterize senile plaques or the labeled cells using antibody against anti-A β (1:1000, mouse monoclonal, Signet) or anti-glia fibrillary acidic protein (GFAP) (1:10,000, rabbit polyclonal, DAKO). The sections were mounted on glass slides and coverslips were sealed with liquid paraffin.

Acknowledgments

We greatly appreciate Nobuyuki Suzuki for astrocyte culture expertise, Tatsuya Inoue for bioinformatical analysis and Kei Suga for helpful discussion and advice. We are also grateful to Tadashi Horiuchi, Yoshinari Satoh and Yasuhide Hirota for helpful suggestion and support.

REFERENCES

- Calne, D.B., Snow, B.J., Lee, C., 1992. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 32, S125–S127.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Dickson, D.W., 1997. The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321–339.
- Johnstone, M., Gearing, A.J., Miller, K.M., 1999. A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *J. Neuroimmunol.* 93, 182–193.
- Kato, T., Chiu, T.C., Lim, R., Troy, S.S., Turriff, D.E., 1979. Multiple molecular forms of glia maturation factor. *Biochim. Biophys. Acta* 579, 216–227.
- Khachaturian, Z.S., 1985. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* 42, 1097–1105.
- Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., Imaizumi, K., 2005. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat. Cell Biol.* 7, 186–194.
- Kozak, M., 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15, 8125–8148.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1995. The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res.* 21, 195–218.
- Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., Berg, L., 1991. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD): Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479–486.
- Mrak, R.E., Sheng, J.G., Griffin, W.S., 1995. Glial cytokines in Alzheimer's disease: review and pathogenic implications. *Hum. Pathol.* 26, 816–823.
- Nagale, R.J., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K.C., Wegiel, J., 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 663–674.
- Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayasi, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kotani, H., Miyajima, N., Nomura, N., 1996. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes: VI. The coding sequences of 80 new genes (K1AA0201-K1AA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.* 3, 321–329.
- Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E., Mori, M., 2001. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10845–10850.
- Pike, C.J., Cummings, B.J., Cotman, C.W., 1995. Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 132, 172–179.
- Satoh, K., Nagano, Y., Shimomura, C., Suzuki, N., Saeki, Y., Yokota, H., 2000. Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in beta-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 283, 221–223.
- Satoh, K., Hata, M., Yokota, H., 2002. A novel member of the leucine-rich repeat superfamily induced in rat astrocytes by beta-amyloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 756–762.
- Selkoe, D., 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* 81, 741–766.
- Wyss-Coray, T., Loike, J.D., Brionne, T.C., Lu, E., Anankov, R., Yan, F., Silverstein, S.C., Husemann, J., 2003. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat. Med.* 9, 453–457.
- Yamada, T., Tsujioka, Y., Taguchi, J., Takahashi, M., Tsuboi, Y., Shimomura, T., 1998. White matter astrocytes produce hepatocyte growth factor activator inhibitor in human brain tissues. *Exp. Neurol.* 153, 60–64.
- Yankner, B.A., 1996. Mechanisms of neuronal degradation in Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498.

アルツハイマー病と脂質

道川 誠

Clinical Neuroscience 別冊

Vol. 25 No. 2 2007年2月1日発行

中外医学社

アルツハイマー病と脂質

道川 誠

はじめに

1906年にドイツの精神科医である Alois Alzheimer がアルツハイマー病患者の第一例を報告して以来、主に臨床病理学的な研究が行われてきたが、疾患の原因やメカニズムの解明には至らなかった。しかし、1980年代に入り、生化学的な解析によって病理的特徴である老人斑および神経原線維変化を形成する主要な蛋白質が同定されて以降、アルツハイマー病の研究の進歩は速度を増した。その後、分子生物学的手法の導入により原因遺伝子の同定、発症メカニズムの解明は加速度的に進んだ。一方、危険因子に関する研究も進められ、1993年には脂質代謝を司る apolipoprotein E (ApoE) をコードする対立遺伝子 $\epsilon 4$ が最も強い危険因子であることが明らかにされた。しかし ApoE がどのようなメカニズムで疾患発症に関わっているかは、未だに結論が出ていない。その後脳内コレステロール代謝に関連する分子をコードする遺伝子 (*ABCA1*, *CYP46*, *SOAT1* など) の遺伝子多型とアルツハイマー病発症頻度との関連が指摘されていることなどから、脳内コレステロール代謝変動とアルツハイマー病発症機構との関連が示唆されるに至っている。

脳内コレステロール代謝とアルツハイマー病

脳内コレステロール代謝を制御する分子をコードする遺伝子多型とアルツハイマー病発症との関連が指摘されている。最も重要なのが、ApoE をコードする対立遺伝子 $\epsilon 4$ をもつことがアルツハイマー病発症の危険因子であることを明らかにした研究である¹⁾。ApoE は、それぞれ3つの対立遺伝子 $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の遺伝子産物であるが、人種による差異を超えてこれら遺伝子多型をもつ割合は一定の傾向を示すことが知られ、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型が最も多く(50~70%)、 $\epsilon 3$ アリルをもつ割合は全体の70~80%に達することが示されている。これに対して、 $\epsilon 2$ および $\epsilon 4$ のアリルの頻度は、10~15%および5~10%であることが示されている。しかし、アルツハイマー病患者においては、 $\epsilon 4$ のアリルの頻度は30数パーセントから50%強であることが明らかにされ、強力な危険因子である。

その後の研究から ApoE 4 のアルツハイマー病発症に関するメカニズムに関する研究がなされ、いくつかの仮説が

提唱されている。例えば、ApoE の抗酸化作用が ApoE 3 と ApoE 4 で異なり、それが神経細胞防御作用の違いを生むとする説^{2,3)}、ApoE はアイソフォーム特異的に amyloid β -蛋白 ($A\beta$) の沈着や除去に対する作用をもつとする説、脳内コレステロール代謝に重要な脳内 HDL 新生作用における ApoE アイソフォーム特異性から発症機構へ関与するとする説^{4,5)}などである。これらの研究から ApoE の役割は多様であることが明らかになったが、何がアルツハイマー病発症に最も影響しているかは未だ結論が出ていない。しかし、筆者らはそのコレステロール代謝に対する作用に着目している。なぜなら筆者らは ApoE のアイソフォーム特異的なコレステロール代謝制御機能を見出し、更にコレステロール代謝がタウオパチー発症に関与する可能性を見出したからである。

ApoE 以外にもコレステロール代謝と関連するいくつかの遺伝子多型が報告されている。例えば、脳内コレステロールが排出される際には 24 S-hydroxycholesterol に代謝されるが、その代謝酵素をコードする遺伝子である *CYP46* の遺伝子多型⁶⁾、HDL 新生に重要な役割を果たす *ABCA1* をコードする遺伝子 *ABCA1* の遺伝子多型⁷⁾、*ACAT* をコードする遺伝子 *ACAT* の遺伝子多型⁸⁾などである。これらは、アルツハイマー病発症頻度、脳内 $A\beta$ 沈着あるいは髄液のコレステロールレベルと有意な相関があることを示しており、脳内コレステロール代謝変動とアルツハイマー病発症との関連を強く示唆している。しかし、これらの遺伝子多型によってコードされる蛋白質の作用については未だ明らかではなく、脳内コレステロール代謝がどのようにアルツハイマー病発症と関連するかについては、議論の余地がある。*ACAT* との関連でいえば細胞内コレステロールエステル量が APP 代謝や $A\beta$ 産生を調節し、エステル化を担う *ACAT* の阻害剤投与によって $A\beta$ 産生を抑制するとする研究がある。総コレステロール量の変化は、コレステロールエステル量の変化として反映されると考えられるため、エステル量に焦点を当てた考え方は現実的であるといえるかもしれない。

血清コレステロール値とアルツハイマー病

血清コレステロール値とアルツハイマー病との関連についての疫学研究については、未だ結論は出ていない。例えば、疫学縦断研究による解析で、血清のコレステロール高

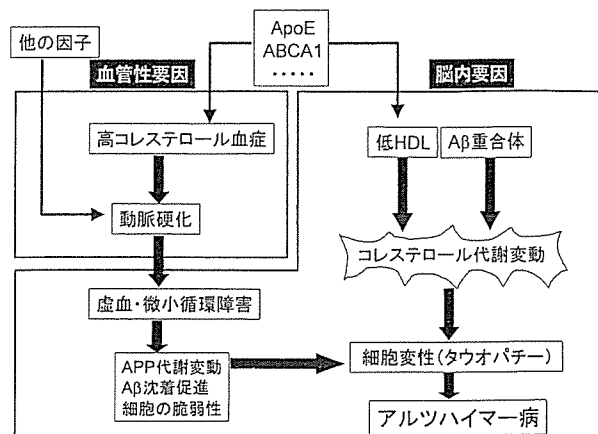
みちかわ まこと 国立長寿医療センター研究所/アルツハイマー病研究部部长

値は、アルツハイマー病になるリスクを上昇するという研究⁹⁾がある一方で、逆に血清コレステロール高値は、アルツハイマー病あるいは血管性認知症になるリスクを減少させるとする研究¹⁰⁾もある。更に、両者間には相関がないとする研究¹¹⁾もある。これら相反する結果をどう説明できるのだろうか。一つの可能性として、血清コレステロール値が中年期に測定されたもの⁹⁾か、老年期に測定されたもの¹⁰⁾かによってコレステロール高値が全く逆の意味をもつ可能性がある。両者間に相関がないとする研究は、コレステロール測定時の年齢の幅が大きく、そのため一定の傾向が出にくかった可能性がある。このような関係は、他の疾患でもみられ、中年期における血清コレステロール高値は、虚血性心疾患のリスクの上昇と関連するが、老年期の血清コレステロール高値は相関しないことが分かっている。これと類似した関係がアルツハイマー病の場合にも当てはまるのかもしれない。中年期の血清コレステロール高値が、何故アルツハイマー病発症と関連しているのかは不明であるが、一つの可能性として虚血性心疾患と同様に動脈硬化による脳循環障害・虚血がアルツハイマー病病理発現に関与する可能性を指摘しておきたい¹²⁾。動脈硬化ならびにその関連因子とアルツハイマー病発症との相関は、多くの研究が指摘しているからである¹³⁾。脳虚血状態では、APPの代謝が変化しA β 産生の上昇がおこるとされ、また血液脳関門の機能が障害されA β の排出が障害され、A β 沈着が増悪するとされているからである(図)。一方、なぜ老年期の血清コレステロール高値がリスクを下げるかについては不明である。あるいは栄養状態や全身状態の変化を反映しているのかもしれない。いずれにしても、もし老年期において血清コレステロール高値がアルツハイマー病になる過程を抑制しているとすれば、老年期あるいはアルツハイマー病発症後にスタチンなどによって血清コレステロール値を下げることに慎重でなくてはならないだろう。

なお、血清コレステロール値はApoEの遺伝子多型とも関連がある。例えば、血清コレステロール値は高い順にApoE 4 < ApoE 3 < ApoE 2であることが複数の研究で示されている。こうした結果は、アルツハイマー病発症とApoE 4型とが、血清コレステロール高値という点で結びつくことを示しており、ApoE 4が危険因子として働くメカニズムとして血清コレステロール値を介している可能性を示しているともいえるだろう。

スタチンとアルツハイマー病 —スタチンの疾患発症抑制効果

上記のような考え方からすると、コレステロール降下剤であるスタチン服用は、アルツハイマー病予防に効果があるとする研究結果¹⁴⁾にも一定の理解が得られるかもしれない。しかし、この分子メカニズムを説明する研究は、上記の考え方とは異なる展開をみせた。スタチンおよびメチル



体循環系、中枢神経系における脂質代謝とアルツハイマー病

ベータサイクロデキストリン処理によって細胞内および細胞膜コレステロール量を減少させるとA β 産生が低下し、 α -セクレターゼ活性が増して無毒な α APP量を増加させるという研究である。また、スタチンを服用させたモルモットの解析から、スタチン服用によって、髄液中のA β 量が減少することも示された¹⁵⁾。これらの研究は、スタチンのアルツハイマー病発症抑制(もし本当なら)の機序としてAPP代謝・A β 産生系への作用を提示している。しかしいくつかの疑問点も出されている。例えば、実験に使われたスタチン濃度は極めて高く臨床で使われるスタチン濃度でも同じことがおこるのかどうか、スタチンの髄液移行濃度とその作用効果との観点からの検討が必要だという点である。スタチンの常用量では髄液コレステロール値を下げるもののA β 産生には影響しない¹⁶⁾とする報告もあり、A β 産生との関連で説明する考え方には否定的な見方もある。スタチンによって髄液中のA β 量の低下を招いたとする研究¹⁵⁾は、通常服用量の100倍も高いスタチン量を投与したためであり、疫学研究でみられた抑制効果がA β 量の低下によるものかどうか慎重に検討する必要があるためである。その後の研究では、スタチン投与はアルツハイマー病発症に関係ないとする疫学研究や、スタチン投与は逆にA β 産生を促進するという結果¹⁷⁾が報告されている。おそらくこうした混乱の原因は、動物モデルや細胞とヒトとではスタチンの投与濃度や髄液移行に違いがある可能性があるのをはじめ、加齢に伴う動脈硬化の要素が欠落していることに原因があると考えられる。

脳内コレステロール代謝とアルツハイマー病

それでは、コレステロールとアルツハイマー病との関連は、動脈硬化を介する脳循環障害・脳虚血に起因するものとして理解すればよいのであろうか。別のいい方をすれば、脳内コレステロール代謝とアルツハイマー病病理には関連がないのであろうか。脳内コレステロール代謝に関する数報の論文では、脊髄液のコレステロール濃度が有意に低下している¹⁸⁾、あるいは脳のコレステロールレベルも低下し

ている¹⁹⁾と報告している。アルツハイマー病発症と関連する遺伝子多型が指摘されている ApoE や ABCA 1 は脳内にも発現し、特に HDL 新生に関与すると考えられることから、これらの遺伝子多型の機能変動は脳内 HDL レベルの低下に関連している可能性が示唆される。実際、筆者らの研究から、ApoE 3 は ApoE 4 に比べて HDL 新生能力が 2 倍以上あること^{4,5)}が明らかになっており、神経突起の伸長やシナプス形成に ApoE 3 型は有利であることが示されている。従って“血中コレステロール値—動脈硬化”の問題とは別に“脳内のコレステロール代謝”の問題として ApoE の関与する HDL 産生・供給の問題があると考えられる(図)。

タウオパシーとアルツハイマー病

神経細胞内コレステロール量の減少は、タウ蛋白のリン酸化亢進²⁰⁾を招き、HDL コレステロールの利用はシナプス形成に必須であること²¹⁾が示された。コレステロール欠乏がタウ蛋白のリン酸化亢進を誘導することは、コレステロール代謝異常を中核病態とする Niemann-Pick disease, type C 1 (NPC 1) のモデルマウス脳でも確認され、MAPK 活性の上昇およびタウ蛋白のリン酸化亢進²²⁾、cdk 5 の活性化亢進や他の細胞骨格蛋白のリン酸化亢進の結果であることが確かめられている。以上の結果は、コレステロール代謝がアミロイドカスケードにおいて中心的な役割を果たしている可能性を示している。その意味で、脳内コレステロール代謝の恒常性維持に重要である HDL 産生増強を治療標的とすることができる。HDL は神経細胞へのコレステロール供給作用以外に、A β と結合し、それを除去する作用があり、HDL 産生に必須とされる ABCA 1 あるいは ApoE/ApoJ 発現欠損マウスでの A β 沈着が増強することが知られている。この意味でも HDL 産生増強を治療標的とすることは理に適うと考えられる。

むすび

以上、述べてきたようにコレステロールとアルツハイマー病との関連は話題が先行し、疫学データの解釈と、実験データを基に解釈されたメカニズムとに乖離や混乱があるといえる。筆者は、血中コレステロール代謝とアルツハイマー病の関係と、脳内コレステロール代謝とアルツハイマー病の関係は、別々に論議しなければならないと思う。血中のコレステロール代謝と脳内のそれとは、直接の関連は認められていないからである。血中のコレステロール代謝の変動(高コレステロール血症)は動脈硬化を促進し、その結果脳内の循環不全や虚血を招き、それに起因した APP 代謝変動や A β 沈着促進、ならびに神経細胞の脆弱性などを介してアルツハイマー病発症に関与する。一方脳内コレ

ステロール代謝変動(HDL 産生・供給能低下)は、タウオパシーに関与する、と考えてみてはどうかと提案したい。スタチンや他の動脈硬化関連因子の効果がアルツハイマー病発症に影響するとすれば血管性要因としてであり、脳内では唯一のリポ蛋白である HDL 産生を促進することで、タウオパシーの抑制や A β 除去の促進によって予防・治療に貢献できるのではないかと考えている。

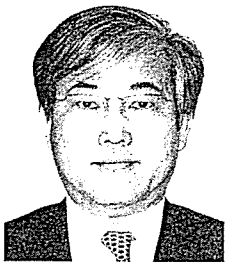
文 献

- 1) Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, et al. Apolipoprotein E : high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 ; 90 : 1977-81.
- 2) Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat Genet*. 1996 ; 14 : 55-61.
- 3) Tokuda T, Tamaoka A, Matsuno S, et al. Plasma levels of amyloid beta proteins did not differ between subjects taking statins and those not taking statins. *Ann Neurol*. 2001 ; 49 : 546-7.
- 4) Michikawa M, Fan QW, Isobe I, et al. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem*. 2000 ; 74 : 1008-16.
- 5) Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, et al. Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apoE 3 and apoE 4 knock-in mice. *J Biol Chem*. 2002 ; 277 : 29919-26.
- 6) Passotiroopoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, et al. Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP 46 polymorphism. *Arch Neurol*. 2003 ; 60 : 29-35.
- 7) Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, et al. ABCA 1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2003 ; 24 : 421-6.
- 8) Wollmer MA, Streffer JR, Tsolaki M, et al. Genetic association of acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase with cerebrospinal fluid cholesterol levels, brain amyloid load, and risk for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2003 ; 8 : 635-8.
- 9) Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*. 1998 ; 17 : 14-20.
- 10) Romas SN, Tang MX, Berglund L, et al. APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology*. 1999 ; 53 : 517-21.
- 11) Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, et al. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population : the Hisayama Study. *Neurology*. 1995 ; 45 : 1161-8.
- 12) Hofman A, Ott A, Breteler MM, et al. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet*. 1997 ; 349 : 151-4.
- 13) Honig LS, Kukull W, Mayeux R. Atherosclerosis and AD : analysis of data from the US National Alzheimer's Coordinating Center. *Neurology*. 2005 ; 64 : 494-500.
- 14) Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, et al. Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol*. 2000 ; 57 : 1439-43.
- 15) Fassbender K, Simons M, Bergmann C, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 ; 98 : 5856-61.
- 16) Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, et al. Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology*. 2002 ; 59 : 1257-8.
- 17) Abad-Rodriguez J, Ledesma MD, Craessaerts K, et al. Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *J Cell Biol*. 2004 ; 167 : 953-60.
- 18) Demeester N, Castro G, Desrumaux C, et al. Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin : cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. 2000 ; 41 : 963-74.
- 19) Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, et al. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development : increased density of gangliosides GM 1 and GM 2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem*. 2005 ; 92 : 171-82.
- 20) Fan QW, Yu W, Senda T, et al. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem*. 2001 ; 76 : 391-400.
- 21) Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 2001 ; 294 : 1354-7.
- 22) Sawamura N, Gong JS, Garver WS, et al. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem*. 2001 ; 276 : 10314-9.

コレステロールとAlzheimer病

—Cholesterol paradox を紐解く—考察

Cholesterol and Alzheimer's disease



道川 誠(写真) 柳澤勝彦

Makoto MICHIKAWA and Katsuhiko YANAGISAWA

国立長寿医療センター研究所アルツハイマー病研究部

◎アポリポ蛋白 E(アポ E)は脳内コレステロール代謝を担う主要なアポリポ蛋白質であるが、*ApoE* の対立遺伝子 $\epsilon 4$ をもつことが、強力な Alzheimer 病の危険因子であることが明らかになった。この発見以降もコレステロール代謝を制御する蛋白発現をコードする複数の遺伝子多型と Alzheimer 病発症頻度との相関が示され、コレステロール代謝と Alzheimer 病との関連が示唆されている。加えて高コレステロール血症やスタチン服用と Alzheimer 病発症との関連も指摘され、おもに細胞内コレステロールレベルと amyloid β 蛋白産生との観点から議論されている。しかし一方では、この両者の因果関係を否定する研究結果もあいついでいる。本稿は、これまでの研究結果を整理して混乱の背景に横たわる問題を明らかにし、このパラドックスをどのように紐解くべきかを考える試みである。すなわち、コレステロールの問題は体循環系と中枢神経系に分けることが大前提であり、前者は動脈硬化による脳循環障害・虚血の Alzheimer 病病理発現への関与、後者はアポ E に依存する脳内 HDL 代謝の神経変性への関与、として理解できるのではないかと考えている。

Key word Alzheimer病, コレステロール, アポリポ蛋白E

1906年にドイツの精神科医である Alois Alzheimer が Alzheimer 病患者の第一例を報告したのはちょうど 100 年前のことである。その後、おもに臨床病理学的な研究が行われてきたが、疾患の原因やメカニズムの解明には至らなかった。しかし 1980 年代に入り、生化学的な解析によって、病的特徴である老人斑および神経原線維変化を形成する主要な蛋白質が同定されて以降、Alzheimer 病の研究の進歩は速度を増した。その後、分子生物学的手法の導入により原因遺伝子の同定、発症メカニズムの解明は加速度的に進んだ。一方、危険因子に関する研究も進められ、1993 年には脂質代謝をつかさどるアポリポ蛋白 E (apolipoprotein E: アポ E) をコードする対立遺伝子 $\epsilon 4$ がもっとも強い危険因子であることが明らかにされた。

アポ E がどのようなメカニズムで疾患発症にかかわっているのかはいまだに議論があるところで

あるが、その後脳内コレステロール代謝に関連する分子をコードする遺伝子 (*ABCA1*, *CYP46*, *SOAT1* など) の遺伝子多型と Alzheimer 病発症頻度との関連が指摘されていることから、脳内コレステロール代謝変動と Alzheimer 病発症機構との関連が示唆されている。

本稿では、おもにコレステロール代謝と Alzheimer 病発症機構との関連について述べたい。

脳内コレステロール代謝関連蛋白をコードする遺伝子多型との関連

コレステロール代謝と Alzheimer 病を結びつけるもっとも重要な根拠となるものは、脳内コレステロール代謝を制御する分子をコードする遺伝子多型と Alzheimer 病発症との関連である。なかでも重要なのが、アポ E をコードする対立遺伝子 $\epsilon 4$ をもつことが Alzheimer 病発症の危険因子であることを明らかにした研究である¹⁾。アポ E は、

それぞれ3つの対立遺伝子 $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の遺伝子産物である。人種による差異を超えてこれら遺伝子多型をもつ割合は一定の傾向を示すことが知られ、 $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型がもっとも多く全体の50~70%を占め、 $\epsilon 3$ アリルをもつ割合は全体の70~80%に達することが示されている。これに対して $\epsilon 2$ および $\epsilon 4$ のアリルの頻度は10~15%および5~10%であることが示されている。しかし、Alzheimer病患者においてはこの割合が有意に変化し、 $\epsilon 4$ のアリルの頻度は30数%から50%強であると報告されている。

こうしたアリル頻度の変化の意味を明らかにするために、アポE4のAlzheimer病発症にかかわるメカニズムに関する研究がなされ、いくつかの仮説が提唱されている。たとえば、アポEの抗酸化作用がアポE3とアポE4で異なり、それが神経細胞防御作用の違いを生むとする説^{2,3)}、アポEはタウ蛋白リン酸化状態および神経原線維変化形成に対する作用の違い、あるいは細胞骨格蛋白の構造と機能に対する作用の違いで説明する説、アポEはアイソフォーム特異的に amyloid β 蛋白(A β)の沈着や除去に対する作用をもつとする説、脳内コレステロール代謝に重要な脳内HDL新生作用におけるアポEアイソフォーム特異性から発症機構へ関与するとする説^{4,5)}などである。

以上のようにアポEの役割は多様であるが、なにかAlzheimer病発症にもっとも影響しているかについてはいまだ確定していない。しかし、著者らはそのコレステロール代謝に対する作用に着目している。なぜなら、以下に示すようにコレステロール代謝変動とAlzheimer病発症との関連がさまざまな観点から指摘されている文脈のなかでは、アポEのアイソフォーム特異的なコレステロール代謝制御機能に着目することのほうが自然であると考えからであり、また著者らの研究からコレステロール代謝がタウオパチー発症に関与する可能性を見出したからである。

アポE以外にもコレステロール代謝と関連するいくつかの遺伝子多型が報告されている。たとえば、HDL新生に重要な役割を果たす ABCA1 をコードする遺伝子 ABCA1 の遺伝子多型⁶⁾、脳内コレステロールが排出される際には 24S-hydroxy-

cholesterol に代謝されるが、その代謝酵素をコードする遺伝子である CYP46 の遺伝子多型⁷⁾、ACAT をコードする遺伝子 ACAT の遺伝子多型⁸⁾ などである。これらは、Alzheimer病発症頻度、脳内A β 沈着あるいは髄液のコレステロールレベルと有意な相関があることを明かしており、脳内コレステロール代謝変動とAlzheimer病発症との関連を強く示唆している。

しかし、これらの遺伝子多型によってコードされる蛋白質の作用の違いについてはいまだ明らかではなく、脳内コレステロール代謝がどのように変動するのか、またこうした脳内コレステロール代謝変動がいかにAlzheimer病発症と関連するかについては、今後の検討が必要である。このほかに細胞内コレステロールエステル量がAPP代謝やA β 産生を調節し、エステル化を担うACATの阻害剤投与によってA β 産生を抑制するとする研究がある。細胞内の遊離コレステロール量は厳密に制御されていると考えられるため、その量を変動させることは簡単ではない。総コレステロール量の変化はコレステロールエステル量の変化として反映されると考えられるため、エステル量に焦点をあてた考え方は現実的であるといえるかもしれない。

コレステロールパラドックス

——血清コレステロール値とAlzheimer病

血清コレステロール値とAlzheimer病との関連についての疫学研究では矛盾した結果が報告されている。たとえば、疫学縦断研究による解析で、血清のコレステロール高値はAlzheimer病になるリスクを上昇するという研究^{9,10)}がある一方で、逆に血清コレステロール高値はAlzheimer病あるいは血管性認知症になるリスクを減少させるとする研究¹¹⁻¹⁴⁾がある。さらに、両者間には相関がないとする研究¹⁵⁻¹⁸⁾もある。これら相反する結果をどう説明できるのであろうか。著者がコレステロールパラドックスとよぶ所以である。

ひとつの可能性として、以下のような考え方ができるのではないかと考えられる。すなわち、血清コレステロール値が中年期に測定されたもの^{9,10)}か老年期に測定されたもの¹¹⁻¹⁴⁾かによって、

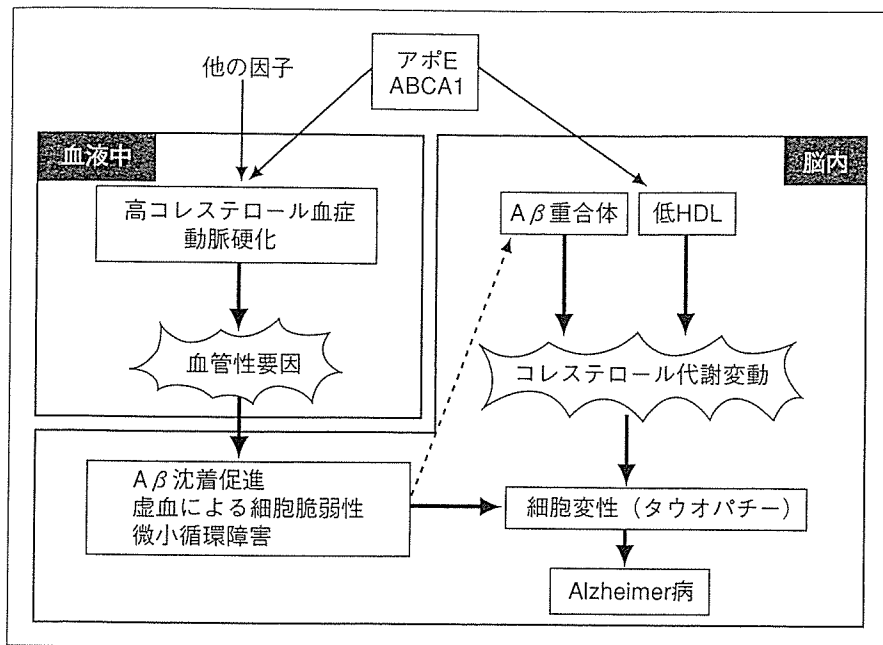


図 1 体循環系，中枢神経系における脂質代謝とAlzheimer病(仮説)

コレステロール高値がまったく逆の意味をもつという可能性である。両者間に相関がないとする研究はコレステロール測定時の年齢の幅が大きく，そのため一定の傾向が出にくかった可能性がある。すでに多くの研究から，中年期における血清コレステロール高値は虚血性心疾患のリスクの上昇と関連するが，老年期の血清コレステロール高値は相関しないことがわかっている。これと類似した関係が Alzheimer 病の場合にもあてはまるのかもしれない。中年期の血清コレステロール高値は Alzheimer 病発症の危険因子として働くが Alzheimer 病を発症する老年期では，むしろ低下する傾向があるとされる^{9,11)}。

中年期の血清コレステロール高値が，どのようなメカニズムで Alzheimer 病発症と関連しているのかはこれらの結果のみからは不明であるが，ひとつの可能性として，虚血性心疾患と同様に動脈硬化をきたした結果，脳循環障害・虚血によって Alzheimer 病発症に関与する可能性がある。実際，動脈硬化ならびにその関連因子と Alzheimer 病発症との相関は多くの研究が指摘しているところである¹⁹⁻²²⁾。最近，低 HDL 血症を含むメタボリック症候群が Alzheimer 病発症と強く相関することが示されており，Alzheimer 病発症の背景に血管性要因(動脈硬化)が関与することを示唆している²³⁾。脳虚血状態では APP の代謝が変化し Aβ 産

生の上昇が起こる²⁴⁾とされ，また血液脳関門の機能が障害され Aβ の排出が障害され^{25,26)}，Aβ 沈着が増悪する²⁷⁾とされているからである(図 1)。一方，なぜ老年期の血清コレステロール高値がリスクを下げるのかについては不明である。あるいは栄養状態や全身状態の変化を反映しているのかもしれない。いずれにしても，もし血清コレステロール高値が Alzheimer 病になる過程を抑制しているとすれば，スタチンなどによって血清コレステロール値を下げ，Alzheimer 病発症の予防をはかるとする考え方(後述)は再考を求められるであろう。

なお，血清コレステロール値はアポ E の遺伝子多型とも関連がある。たとえば，血清コレステロール値は高い順にアポ E4>アポ E3>アポ E2 であることが複数の研究で示されている。こうした結果は Alzheimer 病発症とアポ E4 型とが，血清コレステロール高値という点で結びつくことを示しており，アポ E4 が危険因子として働くメカニズムとして血清コレステロール値を介している可能性を示しているともいえるであろう。

スタチンと Alzheimer 病

一方，スタチンの服用者では非服用者あるいは他の薬剤の服用者に比べて Alzheimer 病発症率の有意な低下がみられるという報告²⁸⁻³⁰⁾がなされ

た。この意味については前の章で述べたような考え方から、コレステロール降下剤であるスタチン服用は抗動脈硬化効果を介して Alzheimer 病予防に効果があるとの理解も可能であった。しかし、スタチン服用と Alzheimer 病発症抑制の分子メカニズムを説明する研究はこの考え方とは異なる展開をみせた。すなわち、脳内の神経細胞におけるコレステロールレベルと A β 産生との関連に焦点が当てられたのである。スタチンおよびメチルベータサイクロデキストリン処理によって細胞内および細胞膜コレステロール量を減少させると A β 産生が低下³¹⁾、 α セクレターゼ活性が増強して無毒な α APP 量を増加させる³²⁾ というものであった。さらに、スタチンを服用させたモルモットの解析から、スタチン服用によって髄液中の A β 量が減少することも示された³³⁾。これらの研究はスタチンの Alzheimer 病発症抑制(もし本当なら)の機序として、APP 代謝・A β 産生系への作用を提示している。

しかしこの場合、いくつかの疑問点もだされている。たとえば、実験に使われたスタチン濃度がきわめて高いことから、臨床で使われるスタチン濃度でも同じことがいえるのかどうか、スタチンの髄液移行濃度とその効果との観点からの検討が必要だという疑問である。その後の報告では、スタチンの常用量では髄液コレステロール値を下げるものの A β 産生には影響しないと報告され³⁴⁾、スタチンの Alzheimer 病抑制効果を A β 産生との関連で説明する考え方には否定的な見方もある。スタチンによって髄液中の A β 量の低下を招いたとする動物実験³³⁾ は通常服用量の 100 倍も高いスタチン量を投与したためであり、疫学研究でみられた抑制効果が A β 量の低下によるものかどうか慎重に検討する必要があるのである。実際、スタチン投与は Alzheimer 病発症に関係ないとする疫学研究^{17,35)} や、スタチン投与は逆に A β 産生を促進するという結果^{36,37)} が報告されている。おそらくこうした混乱は、動物モデルや細胞とヒトとはスタチンの投与濃度や髄液移行に違いがある可能性があることや、加齢に伴う動脈硬化の要素が欠落してしまうことなどに起因しているのではないかと考えられる。

以上のような状況を考慮すれば、スタチンのもつコレステロール合成抑制作用を主作用とした場合には脳内コレステロール代謝に働いた結果と考えるより、むしろ体循環系での作用としての動脈硬化抑制効果を介して Alzheimer 病発症抑制に働いている可能性を考えるべきかもしれない。これは前項で述べた高コレステロール血症が動脈硬化促進を介して Alzheimer 病の危険因子となっている可能性³⁸⁾とも符号する。それでは動脈硬化とその結果としての脳循環障害はどのように Alzheimer 病病理に関係するのか。これについては次項で述べたい。

動脈硬化・循環障害と Alzheimer 病病理

動脈硬化・循環障害と Alzheimer 病病理との関連についてはすでにいくつかの報告がある。たとえば、加齢ラット脳の慢性的な循環不全によって APP の代謝に影響を与え脳内 A β レベルが増加するとされる²⁴⁾。また、局所的な脳虚血によってラット脳の APP の mRNA レベルが増加すること³⁹⁾、ならびに脳全体の虚血負荷の後に APP が蛋白レベルでも増加することが確認されており²⁷⁾、Alzheimer 病における神経変性過程に、脳虚血が増悪因子として一定の役割を果たしている可能性が指摘されている。かつて脳血管性認知症の危険因子であった高血圧、糖尿病、高コレステロール血症などが Alzheimer 病の危険因子でもあることが明らかになってきた。

これらの事実の詳細なメカニズムは今後検討される必要があるが、おそらく動脈硬化などの血管性病変に起因する循環障害や慢性脳虚血が Alzheimer 病発症の閾値を下げる可能性、あるいはより直接的に、たとえば A β の産生や沈着を促進する作用をもつ可能性、さらには慢性脳虚血が血液脳関門の脆弱性を惹起させ、その結果、脳外への A β のクリアランス能力を障害してしまう可能性^{25,40)}などを意味しているのではないかと考えられる。

脳内コレステロール代謝と Alzheimer 病

それではコレステロールと Alzheimer 病との関連は、動脈硬化を介する脳循環障害・脳虚血に起