

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病巣での膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 1
の生物学的・臨床医学的意義の解析

平成 19 年度 総括研究報告書

主任研究者 工藤 一郎

平成 20 (2008) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	-----	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	12
III. 研究成果の刊行物・別刷	-----	13

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

アルツハイマー病巣での膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 1
の生物学的・臨床医学的意義の解析

主任研究者 工藤 一郎 昭和大学薬学部教授

【研究要旨】

プロスタグランジン (PG) 類の産生を抑制する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) がアルツハイマー病 (AD) の進行を抑えることが疫学的に示され、その分子機構としては NSAIDs の抗炎症作用による神経細胞死の抑制が想定されているが、PG 類産生と AD 進行との関連については未だ明確にされていない。本研究では、PG 類産生と AD 進行との関連を明らかにするために、NSAIDs の標的となる COX-2 の下流で働く mPGES-1 に注目し解析を行い、今年度は、まず、AD 患者脳の高齢化では mPGES-1 蛋白質が高発現していること、さらに AD 患者の脳におけるこの mPGES-1 の発現が AD の特徴的病理像と重なることを明らかにした。また、AD で見られる老人斑を自然発症する変異型アミロイド前駆蛋白質高発現マウス (TG2576 マウス) においても、mPGES-1 蛋白質が老人斑周辺の astrocyte において高発現していることを示した。さらに、病態との明確な関連は示せなかったものの、AD 患者の尿中では PGE₂ およびその代謝物の量が増加する傾向を示すことを明らかにした。これらの結果から、mPGES-1 が AD 進行に何らかに関与していることが示唆された。

分担研究者

原 俊太郎 (昭和大学薬学部・准教授)

高橋三津雄 (福岡大学薬学部・教授)

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) は高齢化社会とともにその発症率が増え、変性性認知症の中で最も発症頻度の高い疾患である。その症状は悲惨であるものの、この疾患に対する有効な薬としては塩酸ドネペジル (アリセプト) しかなく、その治療薬の開発、より詳細な AD の発症・進行の

分子メカニズムの解明が望まれている。

一方、プロスタグランジン (PG) 類産生を抑制する非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) が AD の進行を抑えることが疫学的に示され、その分子機構としては NSAIDs の抗炎症作用による神経細胞死の抑制が想定されている (McGeer and McGeer (2007))。しかしながらこれまでに、PG 類産生と AD 進行との関連についてはほとんど明確にされていない。AD の進行においては、アミロイド前駆蛋白質 (APP) 由来の β ペプチド ($A\beta$) が

重要な役割を果たすことが知られ、ADの治療薬の標的としてはAβの切り出しに関わるプロテアーゼを中心に解析が進められている。しかし、このプロテアーゼは神経系で多彩な作用をもつため、この酵素を阻害することには多くの問題点が残されている。そこで、本研究では、炎症刺激により発現が誘導され、様々な疾患の進行に関わる膜結合型プロスタグランジンE合成酵素1 (mPGES-1) に注目し、本酵素とAD進行との関連を明らかにするとともに、mPGES-1 阻害剤がADに対する治療薬となりうる可能性を検証することを目的とする。

PGE₂はPG類のうち生体内で最も多く存在し、胃粘膜保護等の生体恒常性の維持に加え、炎症やがんの発症や進行に関わる、多種多様な作用をもつ脂質性メディエーターである。図1にその生合成経路を示す。膜リン脂質にホスホリパーゼA₂ (PLA₂) が作用することでアラキドン酸が切り出され、このアラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ (COX) によりPGH₂が生じる。さらにPGH₂からPGESの作用によりPGE₂が産生される。COXのアイソザイムには、構成的に発現し生体の恒常性維持に働いているCOX-1に

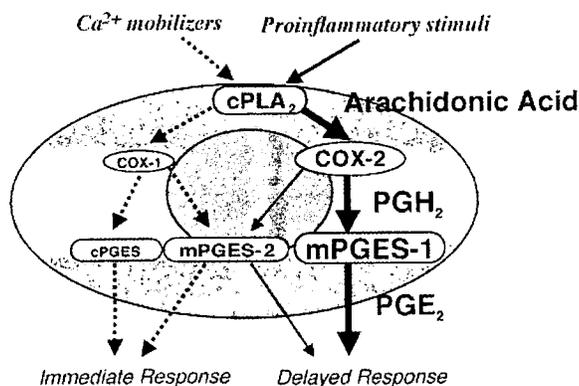


図1 PGE₂の生合成経路

加え、炎症等の刺激により誘導されるCOX-2が存在する。古典的なNSAIDsは、COX-1とCOX-2のいずれをも阻害するために重篤な胃腸障害を引き起こすことが知られている。そこで、刺激時にのみ誘導されるCOX-2を特異的に阻害することができれば、副作用のないNSAIDsができると期待されたが、最近になり、COX-2特異的阻害剤には、心血管リスクを上昇させるという副作用が見出されている (Hara and Kudo (2006))。

一方、COXの下流で働くPGESには、細胞質型PGES (cPGES)、mPGES-1、mPGES-2の3種類のアイソザイムが知られているが、このうち、mPGES-1のみが誘導型酵素であり、同じ誘導型酵素であるCOX-2と選択的に機能連関することが、主任研究者らの研究により明らかにされている (Murakami et al. (2000))。mPGES-1は、MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism) familyに含まれるグルタチオン要求性の分子量約16キロダルトンの膜結合型酵素である。主任研究者らは、これまでに、その遺伝子欠損マウスを用い、mPGES-1がリウマチ性関節炎や肉芽腫形成といった炎症反応進行のみならず、がんの発症や進展、転移といった現象にも深く関わることを *in vivo* で見出している (Kamei et al. (2003, 2004), Kubota et al. (2005), Yamakawa et al. (2008))。現在では、COX-2特異的阻害剤に代わる「副作用のない抗炎症薬」として国内外でmPGES-1の阻害剤の開発が進められており、本研究においてmPGES-1阻害剤がADに対しても有効なことが示唆されれば、その意義は大変大きい。

AD と PG との関連についてはこれまであまり報告がなかったが、最近になって、米国のグループから、PGE₂受容体の1つEP2がミクログリア細胞の活性化やβセクレターゼによるAPPのプロセッシングに関わること (Montine et al. (2002)、Shie et al. 2005)) や、神経細胞死がEP2に加え、他の受容体であるEP4により調節されていること (Echeverria et al. (2005)) が報告された。また、熊本大のグループもごく最近、EP2、EP4がAβ産生に関わることを報告している (Hoshino et al. (2007))。しかし、これらPGE₂受容体は正常状態でも発現が見られ、PGE₂受容体を介するシグナルは神経細胞の生存の促進と抑制の両方の作用をもつことが示されている (McCullough et al. (2004))。一方、mPGES-1は、その発現が炎症時やがんなどほぼ病態時に限られ、薬剤の標的としての有用性はきわめて高い。mPGES-1とADとの関連については、第一製薬のグループが、mPGES-1がAβを投与されたラットのアストロサイトで発現誘導されることを報告している (Sato et al. (2000)) のみである。前述したように主任研究者らは、mPGES-1が炎症やがんの発症や進展に深く関わることをその遺伝子欠損マウスにより示してきた。本研究では、遺伝子欠損マウスを用い、mPGES-1によるPGE₂の異常産生がAD進行に関わることを明らかにする。

また、これまでのADとPGに関する研究はいずれも実験動物を用いた解析であり、ヒトの病態とPG類との直接的関連については示されていない。分担研究者・高橋は神経内科医としてAD患者の治療、予防に関わると同時に、免疫組織化学的・細胞生物学的手法により、AD

進行に関わる分子の同定を試みてきた (Farkas et al. (2003))。本研究では、高橋との共同研究によりAD患者由来の試料を用いることで、より直接的にヒト疾患におけるAD進行の分子機構を解明することを試みる。

B. 研究方法

1) ヒト脳組織の免疫組織学的解析

AD患者9例、パーキンソン病や脳梗塞後遺症などの非AD神経疾患患者5例、脳には異常が見られない対照者4例の剖検脳組織よりパラフィン切片を作製し、抗mPGES-1抗体、抗mPGES-2抗体、抗cPGES抗体により免疫染色を行った。また、発現細胞を同定するには、neuron、microglia、astrocyte、それぞれのマーカー蛋白質MAP2、HLA-DR、GFAPに対する抗体により、病巣部の同定には、抗リン酸化tau抗体AT8や抗Aβ抗体82E1により二重染色を行った。

2) TG2576マウス脳組織の免疫組織学的解析

TG2576マウスは、ヒト変異型 (スウェーデン変異と呼ばれるK670N/M671L)のAPPを高発現し、14ヶ月齢程度から脳内アミロイド沈着である老人斑を形成するADのモデルマウスである。16ヶ月齢のこのTG2576マウスと、対照の同月齢のC57BL/SJL、それぞれ4匹より、脳を4%パラホルムアルデヒドで灌流した後採取した。この脳組織よりパラフィン切片を作製し、1)と同様に、抗mPGES-1抗体、抗mPGES-2抗体、抗cPGES抗体により免疫染色を行った。また、発現細胞の同定には、MAP2、Iba1 (microgliaのマーカー蛋白質)、GFAPに対する抗体、病巣部の同定には82E1抗体を用いた。

3) ラット胎仔由来神経細胞の調製と PGE₂による神経細胞死の検討

Wistar ラットの胎生 17 日の胎仔海馬より細胞を調製した後、培地を変えることにより、neuron を主として含む neuron rich culture (NRC) および neuron に加え astrocytes、microglia 等も含む mixed culture (MC) を得た。細胞の種類は、neuron、microglia、astrocyte、それぞれのマーカー蛋白質 MAP2、CD11b、GFAP に対する抗体により染色し、確認した。細胞が 7 回分裂したところで、12.5 μ M あるいは 25 μ M の PGE₂ を添加し、WST-1 アッセイにより細胞数を、LDH の放出量および TUNEL 染色により細胞死を検討した。

4) ラット培養神経細胞株 C6 細胞を用いた A β による神経細胞死の検討

ラットグリオーマ由来 C6 細胞は、細胞内 cAMP レベルの上昇により、アストロサイトマーカー発現誘導や細胞形態変化などのアストロサイト様分化が観察される細胞であり、神経細胞死のモデル細胞としてよく用いられる。この細胞に、1~100 μ M の dimethylPGE₂ (PGE₂ の安定誘導体) あるいは 30 μ M の A β ₃₁₋₃₅ を添加し、細胞死を検討した。また、A β ₃₁₋₃₅ を添加した時の mPGES-1 の発現変化、PGE₂ 産生量の変化についても、それぞれ RT-PCR 法、EIA kit により解析した。

5) マウス胎仔由来神経細胞の調製と A β による神経細胞死の検討

Balb/c マウスの胎生 16.5 日の胎仔より 大脳初代培養神経細胞を調製し、1 週間培養した後、30 μ M の A β ₃₁₋₃₅ を添加し、細胞死、mPGES-1 の発現変化、PGE₂ 産生量を検討した。細胞の種類は、3)と同様に、neuron、microglia、astrocyte、それぞれのマーカー蛋白質 MAP2、CD11b、GFAP に

対する抗体により染色し、確認した。

6) ヒト尿中 PGE₂ およびその代謝物量の定量

AD 患者および健康人より尿を採取し、希釈した後、Cayman 社の PGE₂ EIA kit および PGE metabolite EIA kit を用い、定量した。PGE metabolite EIA kit は、13,14-dihydro-15-ketoPGE₁、13,14-dihydro-15-ketoPGE₂ やその誘導体、ならびに bicycloPGE₁ を測定することができる。

(倫理面への配慮)

AD 患者脳の免疫組織学的解析および AD 患者の尿中における PG 類の測定においては、福岡大学医学部において倫理委員会の承認を受け、患者に対するインフォームドコンセントを徹底した。

また、ラットおよびマウスを用いた解析においては、昭和大学、福岡大学の実験動物指針に従って実験を行った。

C. 研究結果

1) AD 病巣での mPGES-1 の発現部位の同定および病態との関連

AD、非 AD 神経疾患の患者及び正常対照者の脳組織を用いた免疫組織化学的解析を行ったところ、図 2 に示すように、AD 患者脳の海馬では、非 AD 神経疾患患者やコントロールの対照者と比べて、mPGES-1 の蛋白質が高発現していることが明らかとなった。また、この mPGES-1 の陽性シグナルは、AD の病巣部 (リン酸化 tau の発現部位や老人斑) と重なっており、その発現と AD の特異的病理所見である神経原繊維変化や dystrophic neurite との間に関連が認められた。一方、mPGES-1 以外の PGES (cPGES および mPGES-2) については、その発現と病態との間に関連

は見られなかった。

さらに、PGESの発現細胞についても検討したところ、mPGES-1は、mPGES-2、cPGESとともにneuronに発現していることもわかった。mPGES-2の発現はastrocyteにも認められた。

2) mPGES-1 遺伝子欠損下での実験的 AD

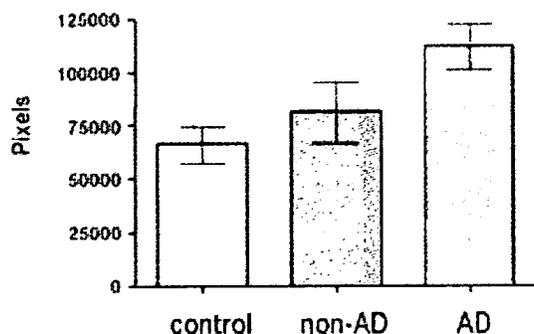


図2 剖検脳組織における mPGES-1蛋白質の発現

の発症 (実験動物および培養神経細胞を用いた予備的解析)

[TG2576 マウスを用いた解析]

16ヶ月齢のTG2576および対照の野生型マウスの脳におけるmPGES-1の発現を免疫組織染色により検討したところ、mPGES-1蛋白質は野生型マウスでは発現が認められないにも関わらず、TG2576マウスでは局所的に発現が認められた。抗Aβ抗体82E1との二重染色の結果、このmPGES-1の局所的な発現はAβ沈着部位の周辺であることがわかった。一方、mPGES-1以外のPGES(cPGESおよびmPGES-2)蛋白質は、野生型、TG2576マウス、いずれの脳組織でもその発現が認められた。さらに、PGESの発現細胞についても検討したところ、mPGES-2、cPGESがneuronに発現しているのに対し、

mPGES-1はヒトの場合と異なり、老人斑周辺の一部のastrocyteにおいて高発現していることを見出した。

本研究では、このTG2576マウスをmPGES-1遺伝子欠損マウスと交配し、飼育に伴いTG2576マウスで観察されるAD様の病理像及び症状がmPGES-1の遺伝子欠損により減弱するかについて、免疫組織染色や行動観察により解析することを計画している。本年度は、mPGES-1遺伝子欠損TG2576マウスを作製し、その飼育を開始した。12ヶ月齢のマウスを用いた予備的な行動観察では、mPGES-1遺伝子欠損により、TG2576マウスに見られる記憶力の低下が回復する傾向が見られた。

[ラット胎仔由来神経細胞を用いた解析]

ラット胎仔海馬より、neuronを主として含むneuron rich culture(NRC)およびneuronに加えastrocyte、microglia等も含むmixed culture(MC)を調製し、各々の細胞に対するPGE₂の効果を検討したところ、PGE₂はNRCにおいて細胞数を減少させたのに対し、逆にMCにおいて細胞数を増加させた。細胞からのLDH放出についても検討したところ、PGE₂はNRCにおいてLDH放出を増加させた。また、PGE₂はNRCにおいて細胞の形態変化をもたらし、TUNEL陽性細胞数を増加させることから、NRCにおけるアポトーシスを誘導することがわかった。

[ラット培養神経細胞株C6細胞を用いた解析]

ラットグリオーマ由来C6細胞を30μMのAβ₃₁₋₃₅で刺激すると、刺激後48時間以降より、無刺激の細胞に比べ、PGE₂産生量の増加が観察された(図3)。また、刺

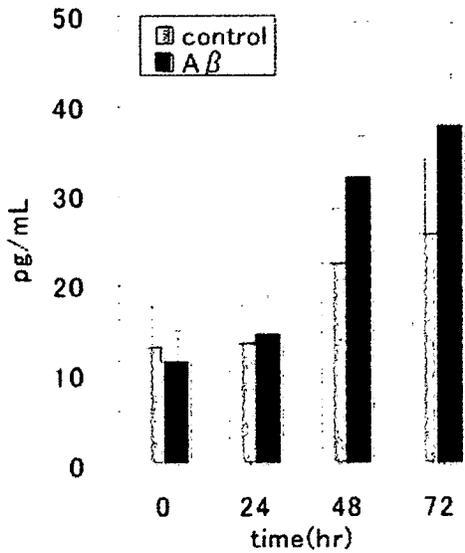


図3 Aβ刺激に伴うC6細胞におけるPGE₂産生の変化

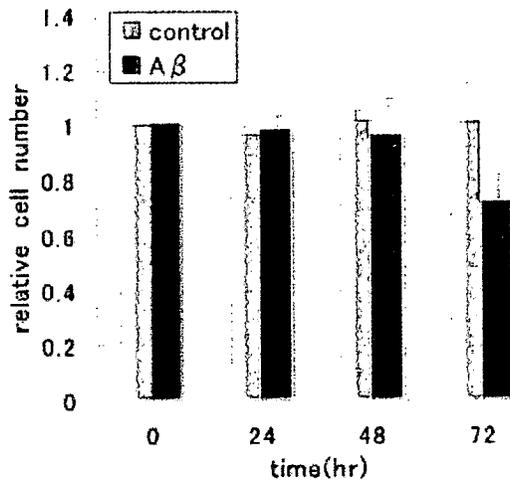


図4 AβによるC6細胞の細胞死

刺激後 72 時間では刺激に伴う細胞数の減少が認められた (図 4)。さらに、Aβ₃₁₋₃₅ 刺激による mPGES-1 の発現変化について RT-PCR 法により検討したところ、刺激 12 時間後から mPGES-1 mRNA の増加が観察された (図 5)。一方、mPGES-1 と関連し機能する COX-2 の発現に変化は見られなかった。

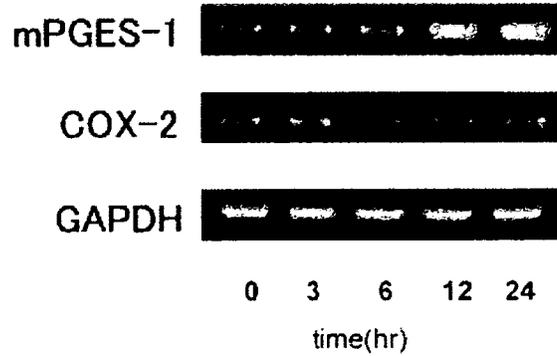


図5 Aβ刺激に伴うC6細胞における mPGES-1 mRNA の発現変化

次に、PGE₂ の安定誘導体 dimethylPGE₂ 存在下一晩培養した際の細胞死についても検討した。その結果、dimethylPGE₂ の用量に依存して、生存細胞数が減少することがわかった。

[マウス胎仔由来神経細胞を用いた解析]

マウス胎仔より大脳初代培養神経細胞を調製し、30 μM の Aβ₃₁₋₃₅ の存在下一晩培養したところ、対照細胞に比べ、細胞数の減少に加え、mPGES-1 発現誘導、PGE₂ 産生量の増加が観察された。

3) AD 患者試料での PG 類の変動

AD 患者および健常人の尿中の PGE₂ および代謝物の定量を行ったところ、健常人では 282±74 pg/ml の PGE₂、308±87 pg/ml の PGE₂ 代謝物が検出されたのに対し、AD 患者では 480±102 pg/ml の PGE₂、701±150 pg/ml の PGE₂ 代謝物が検出された。まだ AD 患者の症例数が少なく、病態との明確な関連は示せなかったものの、いずれも AD 患者では増加する傾向が見られた。特に PGE₂ 代謝物については、*P*<0.05 で有意な差であった。

D. 考察

本年度の解析により、まず、AD 患者脳の一部では mPGES-1 蛋白質が高発現していること、AD 患者の脳におけるこの mPGES-1 の発現が AD の特徴的病理像と重なることが明らかとなった。さらに、AD のモデルマウスである TG2576 マウスにおいても、野生型マウスに見られない mPGES-1 蛋白質が老人斑周辺の astrocyte において高発現していることが示された。これらの結果から、AD 患者の脳では、mPGES-1 の発現が亢進し、その結果産生が増大した PGE₂ が、AD 進行に何らかの形で関与している可能性が考えられた。また、病態との明確な関連は示せなかったものの、AD 患者の尿中では PGE₂ およびその代謝物の量が増加する傾向を示すこともわかった。今後、この尿中における PGE₂ およびその代謝物の量と病態進行との関連を示すことができれば、新たな AD の病態を検討するマーカーとして用いることが可能になるかもしれない。

本研究では、今後、この mPGES-1 由来の PGE₂ が実際に AD の進行に関与しているのかを実験的に証明すること、さらに、関与しているとすれば、どのような分子機構を介しているかを明らかにすることが重要である。mPGES-1 由来 PGE₂ の病態への関与については、mPGES-1 欠損 TG2576 マウスを作製し、TG2576 マウスで観察される AD 様の病理像及び症状が mPGES-1 の遺伝子欠損により減弱するかを解析することで証明できると考えている。病理像がどのように変化しているか明らかになれば、mPGES-1 が AD の進行にどのような分子機構を介し関与するかを示す糸口となる

ことも期待できる。

また、PGE₂ の神経細胞死への関与については、PGE₂ が神経細胞の生存の促進と抑制の両方の作用をもつことが示されている。本年度の解析では、neuron を主として含む NRC と、neuron に加え astrocyte、microglia 等も含む MC では、PGE₂ の効果が逆となることも示された。これまでの解析で神経細胞に対する PGE₂ の効果が様々であったのは、用いた神経細胞の細胞集団の違いによるものであった可能性も考えられる。in vitro で PGE₂ の効果を解析する場合には、どのような細胞集団を用いたかが重要である。

さらに、本年度は、ラットグリオーマ由来の C6 細胞、マウス大脳由来の初代培養神経細胞において、Aβ が mPGES-1 の発現誘導を引き起こすことを見いだした。AD の進行に伴い mPGES-1 が発現誘導されるのであれば、どのような機構を介し mPGES-1 の発現が誘導されるかを解析することも重要である。これまで、IL-1/TNF といった炎症性サイトカインや発癌プロモーター TPA による mPGES-1 の発現誘導には、Egr-1 という転写因子が関わることで、主任研究者らにより報告されている (Naraba et al. (2002))。しかしながら、Aβ 刺激による mPGES-1 の誘導には、IL-1/TNF や TPA による誘導によるものに比べかなり長い誘導までのラグを必要とし、Egr-1 を介する機構とは異なる分子機構が関わる可能性が強い。C6 細胞を用いることによりこの点も明らかにできるかもしれない。

また、C6 細胞、マウス大脳初代神経細胞は、Aβ により細胞死に至ることも示された。前述したように、PGE₂ の神経細胞死への関与は用いた細胞の種類により

異なるため、この A β による細胞死が mPGES-1 由来の PGE₂ に単に依存するかどうかは不明である。しかし、これらの細胞において A β 刺激に伴い誘導された mPGES-1 に依存し産生された PGE₂ が、autocrine/paracrine 的に作用し、細胞死を引き起こした可能性も十分考えられる。実際、C6 細胞を PGE₂ の安定誘導体である dimethylPGE₂ で処理すると細胞死が引き起こされた。また、C6 細胞がもつ COX-2 の発現を Resveratrol により阻害すると、A β による細胞死が軽減されたという報告もある (Kim et al. (2006))。この点については、今後、C6 細胞の mPGES-1 を siRNA によりノックダウンしたり、mPGES-1 遺伝子欠損マウス由来の脳初代神経細胞を調製し用いたりすることにより、A β による細胞死における mPGES-1 の関与を明らかにしていく計画である。

E. 結論

本年度は、AD 患者の脳では、mPGES-1 の発現が亢進し、その結果産生が増大した PGE₂ が、AD 進行に何らかの形で関与している可能性を示すことができた。今後は、この関与を直接的に証明することにより、mPGES-1 阻害剤の AD への有効性を示唆していきたいと考えている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Masahiro Haji, Yoshiharu Akitakae, Miwa Okazaki, Daisuke Kamei, Kazuhiko Ono, Masato Hosokawa, Ichiro

Kudo, and Mitsuo Takahashi. Expression of prostaglandin E₂ synthases relevant to Alzheimer's disease pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroReport* 投稿中

(2) 中谷良人、亀井大輔、工藤一郎 PGE₂ 合成酵素の新展開 細胞工学 26, 1227-1230 (2007.11)

(3) 亀井大輔、工藤一郎、村上誠 COX-2 の下流で機能する膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES-1) 治療学 41, 1236-1240 (2007.12)

2. 学会発表

[国際学会]

(1) Shuntaro Hara, Yukihiro Kondo, Masaharu Mita, Ryosuke Nakamura, Takayuki Maruyama, Shuh Narumiya, and Ichiro Kudo. Role of prostaglandin E₂ receptor EP1 in bladder carcinogenesis. 10th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (2007.9)

(2) Daisuke Kamei, Makoto Murakami, Yoshihito Nakatani, Shuntaro Hara, and Ichiro Kudo. Role of microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) in tumor growth and metastasis. 10th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Diseases (2007.9)

(3) Shuntaro Hara. Role of proinflammatory prostaglandin E₂ in bladder tumor progression. The 4th Annual Meeting Showa International Symposium for Life Sciences (2007.10)

(4) Miwa Okazaki, Yoshiharu Akitakae, Kazuhiko Ono, Masato Hosokawa, and Mitsuo Takahashi. Biomodal effect of

PGE₂ in different cell environments of rat primary cultured hippocampal cells. Neuroscience 2007, Society for Neuroscience 37th Annual Meeting (2007.11)

[国内学会]

- (1) 黒澤まみ、亀井大輔、佐々木由香、林寛子、中谷良人、原俊太郎、工藤一郎 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) のがん悪性化への関与 第 51 回日本薬学会関東支部大会 (2007.10)
- (2) 小松智子、黒木由紀子、原俊太郎、近藤幸尋、工藤一郎 膀胱癌悪性化におけるプロスタグランジン E₂ 受容体 EP1 の役割の検討 第 51 回日本薬学会関東支部大会 (2007.10)
- (3) 亀井大輔、佐々木由香、黒澤まみ、林寛子、中谷良人、原俊太郎、工藤一郎 膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) による悪性形質転換機構の解析 BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007.12)
- (4) 黒澤まみ、亀井大輔、佐々木由香、林寛子、中谷良人、原俊太郎、工藤一郎 がん細胞及び宿主における膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) のがん増殖への関与 BMB2007 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 (2007.12)
- (5) 富岡陽子、町田和之、細川雅人、小野和彦、William Campbell、中島学、高橋三津雄 合成アミリンに対する凝集阻害候補物質の探索とスクリーニング 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

(6) 土師将裕、秋武義治、前田達宏、岡崎美和、小野和彦、細川雅人、亀井大輔、原俊太郎、工藤一郎、高橋三津雄 アルツハイマー病モデルマウスの病態形成におけるプロスタグランジン E₂ 合成酵素の関与 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

(7) 橋口知加子、町田和之、松永敦子、秋武義治、小野和彦、細川雅人、中島学、高橋三津雄 合成アミロイドβ蛋白の高次構造と生理活性の経時的観察 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

(8) 小松智子、原俊太郎、丸山隆幸、近藤幸尋、工藤一郎 膀胱癌細胞の低酸素応答性転写因子 HIF-1 の発現に及ぼすプロスタグランジン E₂ の影響 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

(9) 黒木由紀子、亀井大輔、原俊太郎、工藤一郎 培養神経細胞における炎症性刺激による膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 1 の発現誘導 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

(10) 黒澤まみ、亀井大輔、佐々木由香、林寛子、中谷良人、原俊太郎、工藤一郎 がん細胞及び宿主における膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) のがん増殖への関与 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

(11) 佐々木由香、亀井大輔、黒澤まみ、林寛子、中谷良人、石川由起雄、石井壽晴、原俊太郎、工藤一郎 大腸化学発がんモデルにおける膜結合型プロスタグランジン E 合成酵素 (mPGES-1) の役割 日本薬学会第 128 年会 (2008.3)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

《参考文献》

- Echeverria, V., Clerman, A. and Doré, S. (2005) Stimulation of PGE receptors EP2 and EP4 protects cultured neurons against oxidative stress and cell death following β -amyloid exposure. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2199-2206.
- Farkas, I., Takahashi, M., Fukuda, A., Yamamoto, N., Akatsu, H., Baranyi, L., Tateyama, H., Yamamoto, T., Okada, N. and Okada, H. (2003) Complement C5a receptor-mediated signaling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 278, 5764-5771.
- Hara, S. and Kudo, I. (2006) COX-2 inhibitors and the risk of cardiovascular events. *Jpn. Med. Assoc. J.* 49, 276-278.
- Hoshino, T., Nakaya, T., Homan, T., Tanaka, K., Sugimoto, Y., Araki, W., Narita, M., Narumiya, S., Suzuki, T. and Mizushima, T. Involvement of prostaglandin E_2 in production of amyloid- β peptides both *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 278, 32676-32688.
- Kamei, D., Murakami, M., Nakatani, Y., Ishikawa, Y., Ishii, T. and Kudo, I. (2003) Potential role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in tumorigenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 19396-19405.
- Kamei, D., Yamakawa, K., Takegoshi, Y., Mikami-Nakanishi, M., Nakatani, Y., Oh-ishi, S., Yasui, H., Azuma, Y., Hirasawa, N., Ohuchi, K., Kawaguchi, H., Ishikawa, Y., Ishii, T., Uematsu, S., Akira, S., Murakami, M. and Kudo, I. (2004) Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J. Biol. Chem.* 279, 33684-33695.
- Kim, Y.E., Lim, S.Y., Rhee, S.H., Park, K.Y., Kim, C.H., Choi, B.T., Lee, S.J., Park, Y.M. and Choi, Y.H. (2006) Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in β -amyloid-treated C6 glioma cells. *Int. J. Mol. Med.* 17, 1069-1075.
- Kubota, K., Kubota, T., Kamei, D., Murakami, M., Kudo, I., Aso, T. and Morita, I. (2005) Change in prostaglandin E synthases (PGEs) in microsomal PGES-1 knockout mice in a preterm delivery model. *J. Endocrinol.* 187, 339-345.
- McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R.M. and Andreasson, K. (2004) Neuroprotective function of the PGE $_2$ receptor in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 24, 257-268.
- McGeer, P.L. and McGeer, E.G. (2007) NSAIDs and Alzheimer disease: Epidemiological, animal model and clinical studies. *Neurobiol. Aging* 28, 639-647.
- Montine, T.J., Milatovic, D., Gupta, R.C., Valyi-Nagy, T., Morrow, J.D. and Breyer, R.M. (2002) Neuronal oxidative damage from activated innate immunity is EP2 receptor-dependent. *J. Neurochem.* 83, 463-470.
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Ikeda, T., Fueki, M., Ueno, A., Oh-ishi, S. and Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E_2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E_2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32783-32792.
- Naraba, H., Yokoyama, C., Tago, N., Murakami, M., Kudo, I., Fueki, M., Oh-ishi, S. and Tanabe, T. (2002) Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E_2 synthase gene: Essential role of the transcription factor

Egr-1. *J. Biol. Chem.* 277, 28601-28608.

Satoh, K., Nagano, Y., Shimomura, C., Suzuki, N., Saeki, Y. and Yokota, H. (2000) Expression of prostaglandin E synthase mRNA is induced in b-amyloid treated rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 283, 221-223.

Shie, F.S., Breyer, R.M. and Montine, T.J. (2005) Microglia lacking E prostanoid receptor subtype 2 have enhanced A β phagocytosis yet lack A β -activated neurotoxicity. *Am. J. Pathol.* 166, 1163-1172.

Yamakawa, K., Kamekura, S., Kawamura, N., Saegusa, M., Kamei, D., Murakami, M., Kudo, I., Uematsu, S., Akira, S., Chung, U.I., Nakamura, K. and Kawaguchi, H. (2008) Association of microsomal prostaglandin E synthase 1 deficiency with impaired fracture healing, but not with bone loss or osteoarthritis, in mouse models of skeletal disorders. *Arthritis Rheum.* 58, 172-183.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
中谷良人、 亀井大輔、 工藤一郎	PGE ₂ 合成酵素の新展開	細胞工学	26(11)	1227-1230	2007
亀井大輔、 工藤一郎、 村上 誠	COX-2 の下流で機能する膜結 合型 PGE 合成酵素 (mPGES-1)	治療学	41(12)	1236-1240	2007

研究成果の刊行物・別刷

1. Masahiro Haji, Yoshiharu Akitakae, Miwa Okazaki, Daisuke Kamei, Kazuhiko Ono, Masato Hosokawa, Ichiro Kudo, and Mitsuo Takahashi.
Expression of prostaglandin E₂ synthases relevant to Alzheimer's disease pathology in a mouse model of Alzheimer's disease.
NeuroReport (投稿中)
2. 中谷良人、亀井大輔、工藤一郎
PGE₂合成酵素の新展開
細胞工学 26, 1227-1230 (2007.11)
3. 亀井大輔、工藤一郎、村上誠
COX-2 の下流で機能する膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES-1)
治療学 41, 1236-1240 (2007.12)

Expression of mPGES-1 relevant to Alzheimer's disease pathology in a mouse model

Yoshiharu **Akitake**¹, Miwa **Okazaki**¹, Daisuke **Kamei**², Masahiro **Haji**¹, Kazuhiko **Ono**¹,
Masato **Hosokawa**¹, Ichiro **Kudo**², and Mitsuo **Takahashi**^{1,*}

Running title: PGES in mouse model of AD

¹Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka
University

²Showa University School of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, Japan

*Address for correspondence: Mitsuo Takahashi, MD, PhD.

Department of Clinical Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka
University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan

E-mail : takahasi@fukuoka-u.ac.jp

Fax. : +81-92-863-0389

Tel. : +81-92-871-6631 Ext. 6645

Grants : The Comprehensive Research on Aging and Health under Health and Labour
Sciences Research Grants

Abstract

Epidemiological and clinical studies have suggested that long-term use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) moderates the onset or progression of Alzheimer's disease (AD). NSAIDs inhibit cyclooxygenase (COX) activity thereby aborting production of prostanoids. Prostaglandin E₂ (PGE₂) is the main product of COX function and acts as an inflammatory mediator. Since inflammatory pathologies have been observed in AD brains, we attempted to elucidate the relationship between PGE₂ production and AD pathology. To this end, we examined the expression of PGE synthases (mPGES-1, mPGES-2, cPGES) with immunohistochemistry using the respective antibodies of these synthases in a aged mouse model of AD. Results revealed mPGES-1- positive staining surrounding beta-amyloid plaques. This suggests that PGE₂ expression is increased in the vicinity of senile plaques.

Key words: Alzheimer's disease, Prostaglandin E synthase, Animal model, Inflammation

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is characterized pathologically by the accumulation of beta-Amyloid (A β) plaques, neurofibrillary tangles (NFTs), and neuronal loss. A β has a neurotoxic effect on the brain and activates astrocytes and microglia. It has been observed that the accumulation these cells in the AD barains associated with senile plaques. In addition, these cells have been shown to induce a cytokine-mediated acute phase response and activation of the complement cascade in the vicinity of these plaques [1-3]. The inflammatory responses associated with A β might affect the onset or development of AD. These observations have been supported by the results of many epidemiological studies and have suggested that the use of NSAIDs can significantly reduce the risk of developing AD [4-7].

NSAIDs have an inhibitory effect on COX which catalyzes conversion of arachidonic acid to prostaglandins. Although it remains uncertain as to how NSAIDs prevent the development of AD, several studies have shown that COX expression in AD brains is increased compared to control brains [8-10]. It has been suggested that arachidonic acid metabolism is disturbed in AD. In fact, the levels of PGE₂, which is the main product of COX, are elevated in cerebrospinal fluid of AD patients [11]. Downstream of COX,

prostaglandins are synthesized by their respective synthases, and prostaglandin E synthase (PGES) is known to consist of three distinct isoforms (cytosolic PGES: cPGES, microsomal PGES-1: mPGES-1, microsomal PGES-2: mPGES-2) [12]. However, little is known about the events occurring downstream of COX in AD.

To elucidate the expressions of PGES associated with AD pathology, we examined the distribution of PGES in an aged AD mouse model (Tg2576). Tg2576 mice harbor the Swedish mutation of the amyloid precursor protein (APP) and exhibit some of the pathological features of the AD brain, such as A β plaques [13], the accumulation of glial cells and the expression of inflammatory cytokines [14]. Accordingly, these transgenic mice are proving a useful model for examining AD pathology. Immunohistochemical analysis revealed that the forms of expression of mPGES-1 were associated with A β plaques. In contrast, the expression of other PGESs was not observed in the vicinity of these plaques.

Materials and Methods

Subjects

All Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Fukuoka University. Brains were obtained from four AD model mice (Tg2576: C57BL/SJL), which contained the APP gene with the human Swedish mutations (K670N/M671L), and four age-matched control mice (C57BL/SJL) of 16 months of age.

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized with ether. Then using peristaltic pump, they were perfused with saline followed by 4% paraformaldehyde in PBS. Their brains were removed from their skulls and immersed in 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C overnight. The brains were then dehydrated, degreased with ethanol, and embedded in paraffin.

Using a microtome, tissues were cut into 5µm-thick sections that were mounted onto glass slides and stored. For immunohistochemistry, sections were deparaffinized in xylene, hydrated in an ascending ethanol and then autoclaved in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 20 min at 120°C for antigen retrieval. After cooling at room temperature, the sections were treated for 30 min with 0.3% H₂O₂ to eliminate endogenous peroxidase activity, and transferred to 5% skim milk in PBS for blocking for 30 min at room temperature. After washing with PBST, the sections were incubated with each specific primary antibody for 48 hr at 4°C. Following incubation with primary antibodies, the sections were washed with PBST and then treated with the appropriate biotinylated secondary antibody for 2 hr at room temperature, followed by incubation in avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC reagent, diluted 1: 1000, Vector, Burlingame, CA) for 1 hr at room temperature. The sections were then washed 3 times with Tris-HCl (pH 7.6) for 5 min each time, and peroxidase labeling was visualized by incubation with a DAB solution containing 0.01% 3,3'-diaminobezidine (Dojindo, Kumamoto, Japan), 0.05 M imidazole (Wako, Osaka, Japan), 0.00015% H₂O₂ and 0.6% nickel ammonium sulfate (Sigma, St. Louis, MO) in 0.05