

Daisuke Kamei, Makoto Murakami, Yuka Sasaki, Yoshihito Nakatani, Masataka Majima, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Shuntaro Hara, Ichiro Kudo	Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contributes to tumour growth, invasion and metastasis.	Biochemical Journal	425 (2)	361-371	2010
Shuntaro Hara, Daisuke Kamei, Yuka Sasaki, Akemi Tanemoto, Yoshihito Nakatani, Makoto Murakami	Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models.	Biochimie	in press		2010

研究成果の刊行物・別刷

1. 中谷良人、亀井大輔、工藤一郎  
PGE<sub>2</sub> 合成酵素の新展開  
細胞工学 **26**, 1227-1230 (2007. 11)
2. 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)
3. Manabu Takata, Manabu Nakashima, Taro Takehara, Hideyo Baba, Kazuyuki Machida, Yoshiharu Akitakae, Kazuhiko Ono, Masato Hosokawa and Mitsuo Takahashi.  
Detection of amyloid  $\beta$  protein in the urine of Alzheimer's disease patients and healthy individuals.  
*Neurosci. Lett.* **435**, 126-130 (2008. 4)
4. Motoharu Sakaue, Naoko Mori, Maiko Okazaki, Mayuka Ishii, Yayoi Inagaki, Yuka Iino, Kiyomi Miyahira, Mai Yamamoto, Takeshi Kumagai, Shuntaro Hara, Masako Yamamoto and Kazuyoshi Arishima.  
Involvement of independent mechanism upon poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in methylmercury cytotoxicity in rat cerebellar granule cell culture.  
*J. Neurosci. Res.* **86**, 3427-3434 (2008.11)
5. Motoharu Sakaue, Naoko Mori, Misato Makita, Kana Fujishima, Shuntaro Hara, Kazuyoshi Arishima and Masako Yamamoto.  
Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by grain-derived neurotrophic factor in vitro.  
*Brain Res.* **1273**, 155-162 (2009)
6. Daisuke Kamei, Makoto Murakami, Yuka Sasaki, Yoshihito Nakatani, Masataka Majima, Yukio Ishikawa, Toshiharu Ishii, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Shuntaro Hara and Ichiro Kudo.  
Microsomal prostaglandin E synthase-1 in both cancer cells and hosts contribute to tumor growth, invasion and metastasis.  
*Biochem. J.* **425**, 361-371 (2010)

7. Shuntaro Hara, Daisuke Kamei, Yuka Sasaki, Akemi Tanemoto, Yoshihito Nakatani, Makoto Murakami.

Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models.

*Biochimie* 印刷中 (2010)

8. Yoshiharu Akitake, Yukiko Kuroki, Yuka Sasaki, Masato Hosokawa, Daisuke Kamei, Hiroyasu Akatsu, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, Yoshito Nakatani, Ichiro Kudo, Shuntaro Hara and Mitsuo Takahashi.

Microsomal prostaglandin E synthase-1 deficiency attenuates neuronal cell death and mitigates Alzheimer's disease-like pathology in a mouse model.

投稿中

## 特集 脂質の新たな機能を追う

PGE<sub>2</sub> 合成酵素の新展開New Insight into the Role of PGE<sub>2</sub> Synthases

中谷良人 亀井大輔 工藤一郎

Yoshihito Nakatani, Daisuke Kamei, Ichiro Kudo

PGE<sub>2</sub> 合成酵素 (PGES) は PGE<sub>2</sub> 生合成系の最終段階である PGH<sub>2</sub> を PGE<sub>2</sub> に変換する過程を触媒する酵素で、同定が遅れていたが 1999 年以降相次いで cPGES/p23, mPGES-1, mPGES-2 の 3 つの分子種が発見された。最近、細胞内で各々の酵素が異なる刺激によって使い分けられていることが明らかになってきた。さらに遺伝子欠損マウスの解析から、cPGES/p23 は胎仔期の肺の発達、mPGES-1 は発痛や炎症性疾患、骨形成などに深く関与することがわかった。

## key words

PGE<sub>2</sub>, cPGES/p23, mPGES-1, mPGES-2

1 中谷良人 昭和大薬学部 衛生化学教室 E-mail: nakatani@pharm.showa-u.ac.jp

1991 年東京大学薬学部卒業、1994 年同大学院薬学系研究科博士課程中退後、昭和大薬学部助手、2000 年博士(薬学)を授かり、専任講師に就任。

亀井大輔 昭和大薬学部 衛生化学教室

工藤一郎 昭和大薬学部 衛生化学教室

## はじめに

PGE<sub>2</sub> (プロスタグランジン E<sub>2</sub>) 合成酵素 (PGES) は PGE<sub>2</sub> 生合成系の最終段階である PGH<sub>2</sub> を PGE<sub>2</sub> に変換する過程を司る酵素で、現在までに、細胞質に存在する約 23kDa の cPGES/p23 と膜面に存在する 2 種類の mPGES (mPGES-1, mPGES-2) の 3 つの分子種が存在することが明らかになっている。cPGES/p23 と mPGES-1 についてはすでに遺伝子欠損マウスが作製されており、生体内での役割が解明されつつある。

## I. cPGES/p23

## 1. 発見と酵素学的性質

筆者らはエンドトキシンの 1 つである LPS (リポポリサッカライド) を投与したラットの脳可溶性画分に無処置ラットのそれと比較して高い PGES 活性が存在することを見だし、cPGES/p23 を精製し、一次構造を決定することに成功した<sup>1)</sup>。cPGES/p23 のリコンビナントタンパク質を用いた解析により、PGES 活性の発現にグルタチオン (GSH) が必須であり、GSH S-トランスフェラーゼ (GST) の基質の 1 つである 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) により酵素活性がほぼ完全に阻害されることがわかった。これらの性質はラット脳可溶性画分に検出された PGES 活性の特徴と類似していた。ラットにおける臓器分布を検討した結果、広範な臓器に恒常的に発現していることがわかったが、脳では LPS 投与による遺伝子発現の上昇が観察された。さらに、cPGES/

p23 は常在型酵素であるシクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) とカップリングして、即時的な PGE<sub>2</sub> 産生に関与することを見いだした (図 1)。また、cPGES は ATP が結合した熱ショックタンパク質 Hsp90 に会合するタンパク質である p23 と同一分子であり<sup>2)</sup>、筆者らは cPGES/p23 の酵素活性が Hsp90 との結合により上昇すること<sup>3)</sup>、プロテインキナーゼ CK2 により cPGES/p23 の 113 番目と 118 番目の Ser が両方ともリン酸化を受けると、活性の上昇ならびに Hsp90 との結合の亢進が起こり活性化状態になることを明らかにした<sup>4)</sup>。

## 2. 生体内機能

最近、筆者らは cPGES/p23 欠損マウスを樹立した結果、へ

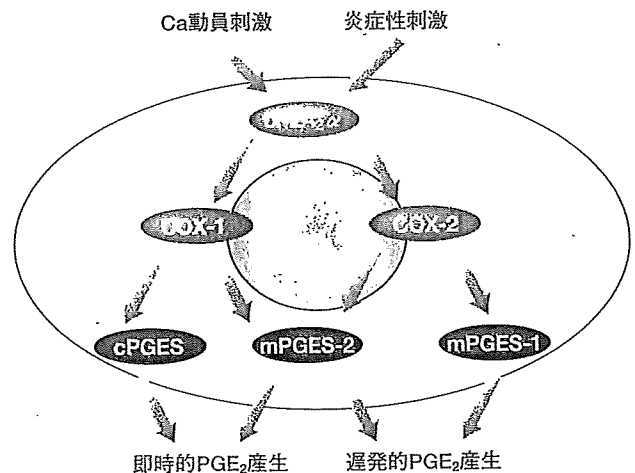


図 1. PGE<sub>2</sub> 生合成酵素群の機能的相関の模式図

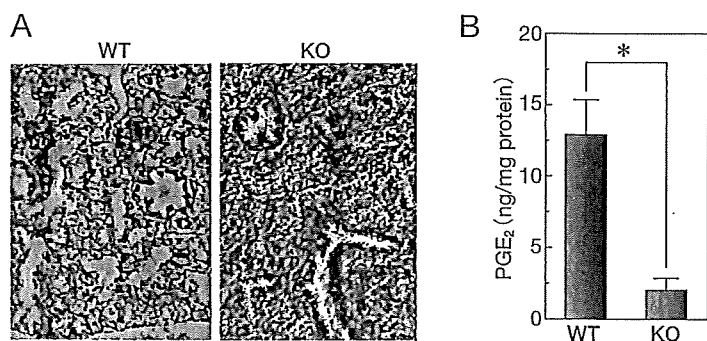


図2. cPGES/p23 はマウス胎仔の肺の発達に必須である18.5dpc マウス胎仔の肺組織切片のHE染色像 (A) と肺組織含有PGE<sub>2</sub>量 (B). cPGES/p23欠損マウスで肺胞形成の不全と肺組織内PGE<sub>2</sub>産生量の低下が観察された. \*; P < 0.05. Nakatani Y, et al: Biochem Biophys Res Commun (2007) 362: 387-392 より改変.

テロ欠損マウスは正常に発育し生殖機能にも異常は見られなかったが、ホモ欠損マウスは出生直後に死に至ることがわかった<sup>5)</sup>。そこで胎仔の解析を行うと、周産期の欠損マウス胎仔は野生型マウスに比べて有意に体重が軽いことがわかった。また、cPGES/p23欠損マウス胎仔より調製した初代培養繊維芽細胞の細胞増殖を調べた結果、野生型よりも有意に遅く、cPGES/p23が正常な細胞増殖に必要であることが示唆された。さらに興味深いことに、cPGES/p23欠損マウス胎仔の表皮と肺で形態的に顕著な異常が見られた。周産期のcPGES/p23欠損マウス胎仔の皮膚には光沢があるが、組織切片を観察すると角質形成が不十分で、表皮が非常に薄い。ケラチノサイトの増殖をPGE<sub>2</sub>が促進することが報告されていることから、表皮形成にcPGES/p23由来のPGE<sub>2</sub>が重要であることが想定される。次に、出生直前の18.5日 (dpc) のcPGES/p23欠損マウス胎仔は母体から摘出した後、自発呼吸を開始せず死に至る。そこで、胎仔肺の組織切片を作製し観察した結果、野生型マウスではすでに肺胞の形成が始まっており多数の空胞が形成されていたが、cPGES/p23欠損マウスでは空胞がほとんど観察されなかったことから、致死の原因は肺の形成不全であると考えられた (図2A)。以上の結果から、cPGES/p23は、マウス胎仔の皮膚や肺の正常な分化や増殖に必要な不可欠であることが明らかになった。

さらに、胎仔肺組織中のPGE<sub>2</sub>含有量を測定した結果、野生型マウスと比べてcPGES/p23欠損マウスの肺のPGE<sub>2</sub>量は著しく低値を示した (図2B)。一方、形態的に大きな異常が見られなかった心臓や肝臓の含有PGE<sub>2</sub>量はcPGES/p23欠損マウスと野生型マウスでほとんど差がなかった。したがって、マウス胎仔の肺組織中のPGE<sub>2</sub>合成は主にcPGES/p23を介して行われ、産生されたPGE<sub>2</sub>が肺の正常な発達に重要であることが予想された。

筆者らとほぼ同時期にD. PicardらもcPGES/p23欠損マウスの作製に成功しており、周産期致死であることや皮膚や肺における形態的な異常などの表現型は筆者らの結果とよく一致していた<sup>6)</sup>。cPGES/p23はHsp90に結合してステロイドホルモン受容体のような細胞内受容体の機能の維持

に関わることが知られているので、彼らはcPGES/p23のコシヤペロンとしての機能を重視し、cPGES/p23欠損マウスではグルココルチコイドを介したシグナリングが減弱し、サーファクタントタンパク質などの発現が低下するため、肺の形成不全が起こることを予想している。

これまでにPGE<sub>2</sub>合成に関わる様々な酵素やPGE<sub>2</sub>受容体の欠損マウスが作製され、解析されてきた。COX-1/COX-2のダブル欠損マウスやEP4受容体欠損マウスは出生後数日以内に動脈管開存症<sup>注1</sup>で死に至ることが報告されている<sup>7,8)</sup>。しかし、cPGES/p23の場合のように出生直後に死に至るという重篤な表現型を示すものは報告されていない。cPGES/p23がPGE<sub>2</sub>産生に寄与することに加えて、分子シャペロン機構への寄与もあるために、生体にとって必須で代替できない重要な機能を持つのであろう。

## II. mPGES-1

### 1. 発見と酵素学的性質

遺伝子データベースにMGST1-L1の名称で登録されていたESTクローンがPGE<sub>2</sub>合成酵素活性を有することが報告された<sup>9)</sup>。mPGES-1はcPGES/p23と一次構造上の相同性は示さないがGSH依存性で分子量は約15kDaであった。ヒトにおいて恒常的に胎盤、精巣、乳腺、膀胱および前立腺に高い遺伝子発現が、小腸および結腸などの臓器に低い発現が検出されているが、その他の臓器では通常状態でほとんど発現が見られない。mPGES-1は炎症刺激で強く発現誘導されることが知られており、例えば、ヒト肺癌由来細胞であるA549細胞をIL-1βで刺激するとmPGES-1の発現が上昇することが示されている。また、筆者らはラット腹腔マクロファージをLPSで処理した際にmPGES-1の遺伝子発現が誘導されることを観察している。mPGES-1は活性発現にGSHが必要であるが、CDNBによる阻害を受けない。蛍光抗体染

注1 大動脈と肺動脈をつなぐ動脈管は、子宮の中では開いているが、生まれるとすぐに閉じてしまう。これが開いたままになってしまう疾患。

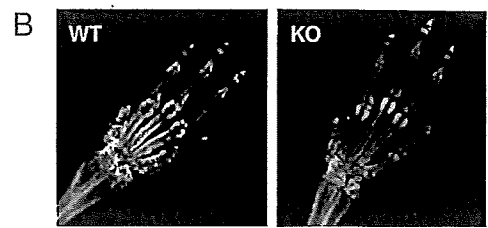
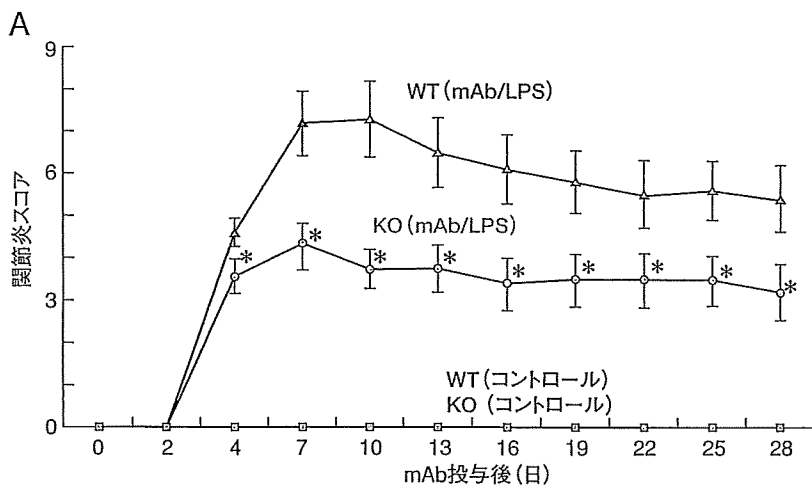


図3. mPGES-1は炎症性関節破壊に関与する  
 A: 抗コラーゲン抗体 (mAb) 誘導関節炎の経時的評価. mPGES-1欠損マウス (KO) では症状の緩和が見られる. \*;  $P < 0.05$ .  
 B: 抗コラーゲン抗体投与28日後の前肢のX線画像. mPGES-1欠損マウスでは骨破壊の抑制が見られる. Kamei D, et al: J Biol Chem (2004) 279: 33684-33695 より改変.

色により mPGES-1 は核周縁部の膜に局在することがわかった。また、筆者らは mPGES-1 が上流の COX-2 と機能関連して PGE<sub>2</sub> 産生に関与することを明らかにしており<sup>10)</sup>(図1), 実際にヒトの大腸癌、乳癌組織や胃潰瘍組織において COX-2 と mPGES-1 の共発現が観察されている。興味深いことに、COX-2 と mPGES-1 を共発現させた細胞株では顕著な PGE<sub>2</sub> 産生の亢進が観察されるだけでなく悪性形質転換が起こることを見いだした<sup>10)</sup>。mPGES-1 遺伝子のマウスおよびヒトにおける発現調節機構については、遺伝子上流100bp付近に存在する2つのGCボックスが必須であり、これらの部位に転写調節因子 Egr-1 (early growth response-1) が結合することが報告された<sup>11)</sup>。Egr-1 は細胞増殖や炎症反応に密接に関連する遺伝子の発現調節を行うことが知られているので、mPGES-1 による PGE<sub>2</sub> 産生がこれらの現象に深く関与することが示唆される。

## 2. 生体内機能

mPGES-1 ホモ欠損マウスは通常飼育状況では正常に発育し、生殖機能にも特に異常は見られなかったが、種々の病態下では野生型マウスと異なる応答が見いだされた。筆者らは、酢酸ライジング法<sup>注2)</sup>を用いた急性疼痛モデル<sup>12)</sup>、綿糸移植法<sup>注3)</sup>を用いた急性炎症モデル<sup>12)</sup>、抗コラーゲン抗体投与による慢性関節炎モデル<sup>12)</sup>(図3)、大腿骨骨折法を用いた骨再形成モデルなどの解析を行った結果、いずれの現象も mPGES-1 欠損マウスでは野生型マウスに比べて有意に減弱していた。また、LPS 投与による発熱<sup>13)</sup>や、脳虚血再灌流による脳卒中モデルにおける脳障害の程度が欠損マウスで減弱すること<sup>14)</sup>、LDL (低密度リポタンパク質) 受容体欠損マウスとのダブル欠損マウスにおける動脈硬化の軽減<sup>15)</sup>などが報告されている。したがって、疼痛の知覚、炎症性疾患、骨形成、発熱、脳梗塞や動脈硬化の発症と進展を mPGES-1

由来の PGE<sub>2</sub> が促進することが明らかになった。

また筆者らは、発癌や癌の進展への mPGES-1 の関与も検討している。mPGES-1 欠損マウスに培養癌細胞を移植し増殖を検討した結果、癌組織の増殖の遅延が観察された。さらに、培養癌細胞を静脈内投与した際の肺への転移も mPGES-1 欠損マウスで有意に減少した。したがって、癌細胞の増殖や血行性転移に mPGES-1 由来の PGE<sub>2</sub> が寄与することが明らかになった。大腸ポリープの形成に EP2 受容体を介した接着分子ラミニン B や VEGF (vascular endothelial growth factor) の発現誘導が関与することが示唆されている<sup>16)</sup>が、mPGES-1 由来の PGE<sub>2</sub> がどのような分子メカニズムで発癌を惹起するののかについてはいまだに明らかになっておらず、今後の課題の1つである。

## 3. 抗炎症薬の標的として

COX-2 選択的阻害薬 (ロフェコキシブ) は副作用の少ない“夢の抗炎症薬”として期待されていたが、大規模臨床試験の結果、長期間の服用で急性心筋梗塞などの心血管系の疾患のリスクを有意に上昇することが明らかになり、2004年に市場から撤退するという事態に陥った。では次世代の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の開発につながる創薬ターゲットは存在するのか? 上述のように、炎症性疾患、発熱や発痛に関わる PGE<sub>2</sub> の産生に主に寄与する mPGES-1 が炎症性疾患の治療薬のターゲットとして期待が高まっている。すなわち、mPGES-1 を特異的に抑制できれば、PGI<sub>2</sub> や TXA<sub>2</sub> (トロンボキサン A<sub>2</sub>) の産生に影響を与えずに、炎症や発痛を引き起こす PGE<sub>2</sub> の生成を選択的に阻害することができるので、

注2 マウス腹腔内に酢酸を投与すると、苦悶症状 (ライジング) を示す。この反応を痛みの指標として行う試験。

注3 マウス背部皮下に1cm長の綿糸を移植し、綿糸周辺の炎症性肉芽の形成を評価する方法。

心血管系疾患のような重篤な副作用を起こさずに、抗炎症作用を発揮すると考えられる。今のところ、mPGES-1に対して強力の特異的な阻害作用を示す化合物は見つけられていないようであるが、mPGES-1が次世代NSAIDs開発の有力なターゲットの1つであることは間違いないであろう。

### III. mPGES-2

#### 1. 発見と酵素学的性質

最近、ウシ心臓ミクロソーム画分から33kDaの膜結合型PGESが精製、同定された<sup>17)</sup>。mPGES-2は前述のcPGES/p23やmPGES-1とは異なりGSH非存在下でも有意な活性を発現し、GSHのみならず他の還元性化合物の存在下で活性が上昇する。cDNAから想定される全長は377アミノ酸であるが、翻訳後にプロセシングされ、成熟酵素ではN末端87アミノ酸が欠落している。mPGES-2は一次構造上GSTファミリーには属さないが、アミノ酸の104から120番目にチオレドキシシンやグルタレドキシシンのコンセンサス配列が存在し、N末端の疎水性アミノ酸に富む領域で膜に結合することが示唆されていた。最近、mPGES-2の結晶構造解析が行われ、ホモダイマーを形成しN末端側で膜リン脂質二重層に結合すること、

mPGES-2と造血管型PGDSの触媒部位の立体構造は非常に類似していることが明らかになった<sup>18)</sup>。mPGES-2を過剰発現した細胞株を用いた解析で、ゴルジ体でN末端部分がプロセシングされ、成熟型になり細胞質や核辺縁部に分布することが明らかになっている<sup>19)</sup>。mPGES-2はCOX-1とCOX-2の両方と機能連関してPGE<sub>2</sub>産生に関わる(図1)。また、mPGES-2は様々な細胞や臓器に恒常的に発現しているが、例外的にヒト大腸癌に高い発現が見られることがある。

#### おわりに

他のプロスタノイドの最終合成酵素の同定に比べてPGE<sub>2</sub>合成酵素の同定は遅れたものの、酵素学的解析、活性調節機構や細胞内での上流のCOXとの機能的連関などの解析が進み、最近になって遺伝子欠損マウスが作製され、生体にとっての重要性が解明され始めている。最も広範な細胞で生合成されるPGE<sub>2</sub>が様々な生命現象や病態に関わることに疑いの余地がないが、これまでのPLA<sub>2</sub>、COX、EP受容体の欠損マウスの解析に加え、PGES欠損マウスの解析でもその重要性が再認識されている。さらに、分子シャペロンとアラキドン酸代謝系の両方に関わるcPGES/p23の発見は新たな脂質の生理活性の解明への橋渡しになるかもしれない。

#### — 文献 —

- 1) Tanioka T, et al: J Biol Chem (2000) 275: 32775-32782
- 2) Johnson JL, et al: Mol Cell Biol (1994) 14: 1956-1963
- 3) Tanioka T, et al: Biochem Biophys Res Commun (2003) 303: 1018-1023
- 4) Kobayashi T, et al: Biochem J (2004) 381: 59-69
- 5) Nakatani Y, et al: Biochem Biophys Res Commun (2007) 362: 387-392
- 6) Grad I, et al: Mol Cell Biol (2006) 26: 8976-8983
- 7) Loftin CD, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2001) 98: 1059-1064
- 8) Segi E, et al: Biochem Biophys Res Commun (1998) 246: 7-12
- 9) Jakobsson PJ, et al: Proc Natl Acad Sci USA (1999) 96: 7220-7225
- 10) Murakami M, et al: J Biol Chem (2000) 275: 32783-32792
- 11) Naraba H, et al: J Biol Chem (2002) 277: 28601-28608
- 12) Kamei D, et al: J Biol Chem (2004) 279: 33684-33695
- 13) Engblom D, et al: Nat Neurosci (2003) 6: 1137-1138
- 14) Ikeda-Matsuo Y, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103: 11790-11795
- 15) Wang M, et al: Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103: 14507-14512
- 16) Seno H, et al: Cancer Res (2002) 62: 506-511
- 17) Tanikawa N, et al: Biochem Biophys Res Commun (2002) 291: 884-889
- 18) Yamada T, et al: J Mol Biol (2005) 348: 1163-1176
- 19) Murakami M, et al: J Biol Chem (2003) 278: 37937-37947

## COX-2/PGE<sub>2</sub>合成経路の分子・生化学 2

# COX-2の下流で機能する膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES-1)

亀井大輔 工藤一郎 村上 誠

かめい だいすけ：昭和大学薬学部 衛生化学，日本学術振興会特別研究員 (PD)，  
くどう いちろう：昭和大学薬学部 衛生化学，  
むらかみ まこと：同，東京都臨床医学総合研究所細胞膜情報伝達プロジェクト1，PREST，JST

### ● はじめに

非ステロイド性消炎鎮痛薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) は解熱鎮痛抗炎症効果を示し，広く臨床の場で使用されているが，すべてのプロスタグランジン (PGs) 類の産生を一括遮断するための副作用の問題が深刻に議論されている。さらに近年，2種のシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase : COX) 分子種のうち誘導型の COX-2 に対する選択的阻害薬が開発されたが，重大な心血管系への副作用が判明し，NSAIDs の安全性への懸念は依然として解消されていない。

著者らはこれまでに COX の下流で PGE<sub>2</sub>産生を特異的に制御する PGE 合成酵素 (PGES) を単離同定し，その機能解析を行ってきた。とりわけ COX-2 の下流で選択的に機能している膜結合型 PGES-1 (mPGES-1) が，発痛，炎症性疾患，がん，虚血性脳疾患などの増悪因子として機能していることが明らかになってきた。これらの知見は，mPGES-1 阻害薬が NSAIDs に代わる効果的な医薬品となりうる可能性を強く示唆している。本稿では，著者らによる mPGES-1 遺伝子欠損 (KO) マウスによる研究成果を中心に，他グループの知見をふまえ，mPGES-1 阻害薬の有効性，およびその問題点について概説する。

### ● プロスタグランジン E<sub>2</sub> 合成経路と膜結合型 PGES-1

PGE<sub>2</sub> の合成経路は，ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> による膜グリセリン脂質からのアラキドン酸の遊離，COX によるアラキドン酸の PGH<sub>2</sub> への代謝，PGES による PGE<sub>2</sub> への異性化，という3段階の酵素反応からなる (図1)。現在，PGES には細胞質型 PGES (cPGES)，mPGES-1，mPGES-2 の3種の分子種が同定されている<sup>1)</sup>。

このうち mPGES-1 は，膜結合型グルタチオン-S-トランスフェラーゼファミリーに属する分子量 17kDa の核膜酵素で，3量体を形成する。酵素活性には 110 番目のアルギニン残基が必要で，さらにグルタチオンを補因子として要求する。本酵素はインターロイキン (IL)-1 やリポ多糖 (LPS) などの炎症性刺激により発現誘導され，この発現機構には TLR4/MyD88/NF-IL-6 経路が重要であるほか，転写因子 Egr-1 による転写制御が報告されている<sup>2,3)</sup>。mPGES-1 の最も興味深い特徴は，生体内において主に COX-2 (誘導型 COX) と比較的選択的に機能連関して，遅発的 PGE<sub>2</sub> 産生に寄与していることである<sup>4)</sup>。病理学的解析においても，さまざまな疾患の病変部位に COX-2 と mPGES-1 の共発現が認められている<sup>1,5,6)</sup>。このことから各種病態下における PGE<sub>2</sub> 産生には，COX-2/



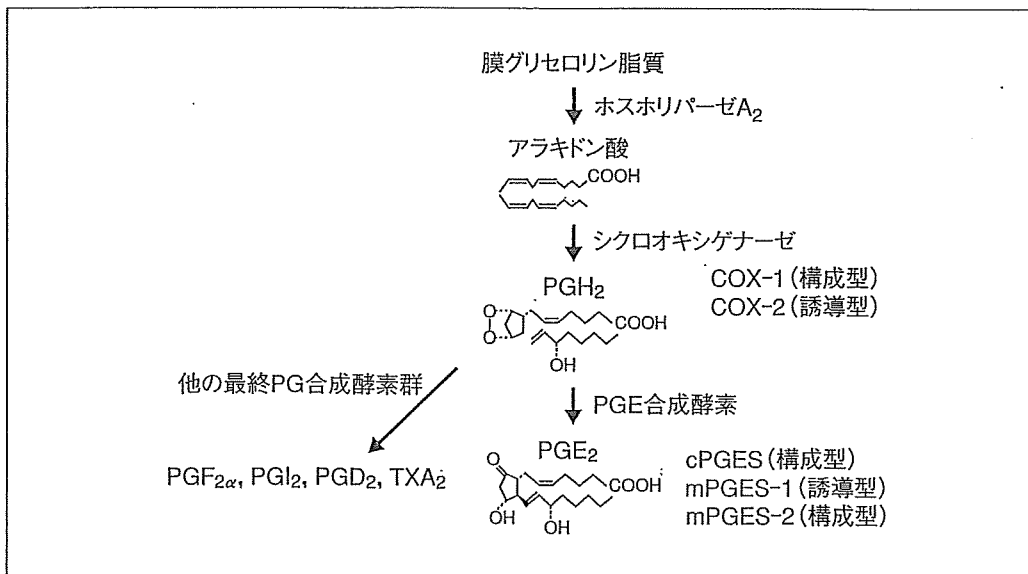


図1 プロスタグランジン (PG) E<sub>2</sub> 生合成経路

ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>によって膜グリセロリン脂質から遊離されたアラキドン酸は COX-1 または COX-2 により代謝中間体 PGH<sub>2</sub> に代謝され、さらに PGE 合成酵素 (PGES) によって PGE<sub>2</sub> に変換されるか、または他の最終 PG 合成酵素群により他のプロスタノイドに代謝される。本文に示すように、mPGES-1 は最も主要な PGES である。

mPGES-1 経路が重要であると考えられる。

### ● 膜結合型 PGES-1 遺伝子欠損 (KO)

マウスを用いて得られた最近の知見

#### 1 疼痛と発熱

著者らは mPGES-1 の末梢組織における炎症性疼痛への関与を明らかにするために、mPGES-1 KO マウスを用いて酢酸ライジング試験を行ったところ、野生型 (WT) マウスと比較して、痛み応答の著しい減少を認めた<sup>7,8)</sup>。なお、この反応は選択的 COX-2 阻害薬の前処理で抑制されることから、炎症性疼痛において COX-2/mPGES-1 経路で合成された PGE<sub>2</sub> が、部分的に疼痛反応を増強している可能性が想定される。一方、神経障害性疼痛への関与については、坐骨神経の部分結紮によるアロディニアモデルにおいて、mPGES-1 KO マウスではアロディニアが生じないことが報告されている<sup>9)</sup>。なお、脳や脊髄では構成的な mPGES-1 の発現も認められており、神経障害性疼痛に対しても本酵素の寄与が想定される。

Engblom らは LPS 腹腔投与における発熱モデルにおいて、mPGES-1 KO マウスでは発熱反

応を認めないことを報告している<sup>10)</sup>。また Saha らによるテレベンチン誘導発熱モデルにおいても、mPGES-1 KO マウスでは発熱反応を認めない<sup>11)</sup>。なお mPGES-1 欠損は、通常飼育下における体温調節機構に影響を与えないことから、外因性および内因性発熱物質による発熱反応に mPGES-1 の寄与が考えられる。

#### 2 関節炎

関節リウマチの主な病態モデルとして、コラーゲン投与による CIA モデルとコラーゲン抗体の投与による CAIA モデルが汎用されている。前者は T 細胞や B 細胞の活性化を介した免疫応答と、内因性コラーゲン抗体による関節の炎症応答の 2 つのフェーズに依存するのに対し、後者は外因性コラーゲン抗体による炎症応答のみに依存する。著者らは CAIA モデルの検討において、mPGES-1 KO マウスでは、関節組織の腫脹、発赤の低下、骨破壊の抑制など、関節炎症状の顕著な緩和を認めた<sup>7)</sup>。また、Trebino らは CIA モデルの検討において、mPGES-1 KO マウスでは、同様の関節炎症状の緩和を報告している<sup>8)</sup>。さらに、小島らによる CIA モデルの検討によれば、KO マウスでは関

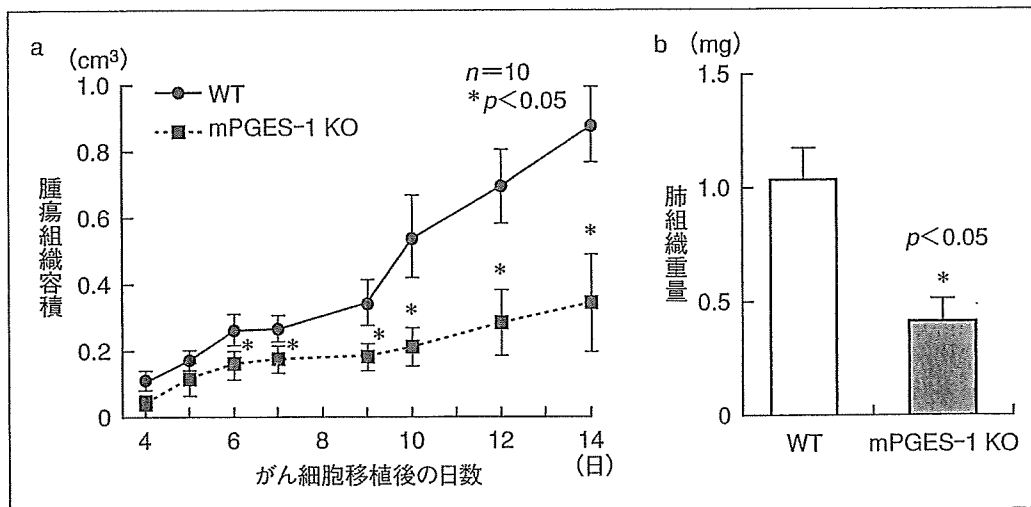


図2 膜結合型 (m) PGES-1 遺伝子欠損マウスにおける移植がん細胞の増殖転移の抑制  
 a : 肺がん細胞株 LLC を野生型 (WT) または mPGES-1 欠損 (KO) マウスの背部皮下に移植し、局部腫瘍の増大を経時的にモニターした。KO マウスでは WT と比べて腫瘍の増大が抑制される。  
 b : LLC を静脈内投与し、肺への血行性転移を肺組織重量により評価した。KO マウスでは WT マウスに比べて肺組織重量の増加 (=がん転移) が抑制される。

節炎症状の緩和に加え、抗コラーゲン抗体の産生量低下も認められており<sup>12)</sup>、患部での炎症応答に加え免疫応答に対する本酵素の寄与も示唆されている。

### 3 アテローム性動脈硬化

動脈硬化症は血管の慢性炎症と考えられ、血栓形成と炎症性細胞の集積が発症に関係している。Wang らは、高脂肪食負荷によるアテローム性動脈硬化モデルの解析で、低密度リポ蛋白質受容体 (LDLR) と mPGES-1 のダブルノックアウトマウスが対照マウスと比較して、アテローム形成の有意な低下と病巣へのマクロファージの遊走低下を認めることを報告している<sup>13)</sup>。なお、病巣において PGI<sub>2</sub> 産生の亢進が認められるのに対し、TXA<sub>2</sub> 産生に変化はない。また炎症性細胞の機能と遊走について、著者らによる腹腔マクロファージの解析では、KO マウス由来の細胞は、WT マウス由来と比較して、炎症刺激による PGE<sub>2</sub> 産生の抑制と、PGI<sub>2</sub> 産生の約 1.5 倍の上昇が認められた<sup>7)</sup>。また KO マウスでは、チオグリコレートやカラゲニンの腹腔内投与による炎症性細胞の遊走の抑制がみられ、さらに炎症性肉芽形成モデルでも、肉芽形成の抑制とともにマクロファージの遊走低下が

観察された<sup>7)</sup>。よって、mPGES-1 が病巣での炎症応答と炎症性細胞遊走の両側面に寄与し、疾患の進行に関与している可能性が考えられる。

### 4 がん

近年の多くの知見から、COX-2 と PGE<sub>2</sub> が、がんの発生や進展に重要な役割を演じていることは間違いなさそうである。著者らはがん細胞のマウス皮下移植モデルや血行性転移モデルで、がんの進展や転移への mPGES-1 の寄与を検討したところ、mPGES-1 KO マウスに移植した場合は、対照マウスと比較して腫瘍増殖の有意な低下と肺転移の抑制を認めた (図 2)。さらに mPGES-1 を過剰発現させたがん細胞株は、細胞の増殖速度、浸潤能の亢進が認められ、逆に siRNA により mPGES-1 の発現を抑制した細胞株では、増殖速度と浸潤能の有意な低下がみられた (投稿中)。

また発がん過程においては、筆者らによる COX-2 と mPGES-1 をともに強制発現させた細胞株が悪性形質転換を獲得する報告<sup>5)</sup>や、大島らの COX-2 と mPGES-1 の消化管粘膜特異的なダブルトランスジェニック (TG) マウスが過形成性胃癌病変を発症する報告<sup>14)</sup>などから、本酵素の発がん過程への関与も示唆される。

一方、肺胞および気道上皮細胞に特異的な mPGES-1 TG マウスは、肺での化学発がん発生率に、対照マウス群との違いを認めない報告<sup>15)</sup>もあり、臓器に特異的な寄与を示す可能性も示唆される。いずれにせよ、がんの多段階発がん過程の各フェーズにおいて、mPGES-1 が増悪因子として機能している可能性が考えられる。

## 5 脳卒中

虚血再灌流モデルやアルツハイマー病発症モデルによる解析から、COX-2 経路の脳神経細胞死への関与が考えられる。松尾らはマウス虚血再灌流モデルにおいて、再灌流後 24 時間までに脳内 PGE<sub>2</sub> 産生がピークに達し、その産生亢進が COX-2 と mPGES-1 に依存することを明らかにしている<sup>16)</sup>。さらに mPGES-1 KO マウスでは、対照マウスと比較して脳梗塞域と脳浮腫の顕著な抑制が認められることから<sup>17)</sup>、COX-2 と mPGES-1 由来の PGE<sub>2</sub> が脳神経細胞死を亢進する可能性が示唆されている。

## ● 膜結合型 PGES-1 阻害薬の有効性と問題点

選択的 COX-2 阻害薬の問題点は、COX-2 依存的な PG 類の一括阻害による副作用である。NSAIDs の投与は一般に妊婦には禁忌であるし、COX-2 阻害による PGI<sub>2</sub> の遮断は心血管系に悪影響を与えることは先述したとおりである。mPGES-1 欠損マウスでは生殖系に異常はみられず<sup>2)</sup>、また心血管系への悪影響も認められていない<sup>18)</sup>。したがって mPGES-1 阻害薬が選択的に PGE<sub>2</sub> の産生を阻害し、他の PG 類に影響を与えないならば、PGE<sub>2</sub> の寄与が大きい病態に対して、副作用の少ない効果的な治療薬として有効であろう。上述した mPGES-1 KO マウスを用いた病態モデルの解析結果は、その実用性を裏付ける重要な証拠である。

一方、問題点として、消化管粘膜保護や恒常性維持に対する mPGES-1 の関与が考えられる。著者らはデキストラン硫酸による潰瘍性大腸炎モデルの解析で、mPGES-1 KO マウスが大腸炎症状の悪化を示すという結果を得ており(投稿準備中)、本酵素の消化管組織保護への関与が示唆される。また、mPGES-1 が構成的に

発現している腎臓では生理的な制御に関与している可能性もあり、実際、高塩分摂取による高血圧モデルの解析において、mPGES-1 KO マウスは、対照マウスと比較して、高血圧を示す報告もある<sup>19)</sup>。もう 1 つの問題点は、mPGES-1 阻害により PG 類の産生バランスが乱れる影響である。本酵素の阻害で他の PG 類の産生が亢進し、その影響で副作用が生じる可能性がある<sup>7,13)</sup>。いずれにせよ、NSAIDs や COX-2 選択的阻害薬が、副作用の問題はあるものの、すでに臨床で有効な治療効果を示しており、副作用が PG 類の一括阻害による影響であるならば、mPGES-1 阻害薬の開発は、PGE<sub>2</sub> 受容体に着目した創薬戦略と並んで、より現実的なものといえるであろう。

## ● おわりに

現在、世界中の研究者や製薬企業から mPGES-1 に着目した研究論文が続々と公表されており、本酵素の基礎研究データは驚くべき勢いで蓄積されている。一方で、臨床的研究報告はまだ少なく、本酵素の阻害薬の開発に向けては、臨床研究分野のさらなる充実が不可欠である。近い将来、mPGES-1 阻害薬が NSAIDs に代わり副作用の少ない新世代の医薬品として臨床応用される日を待ち望んでいる。

## 文献

- 1) Murakami M, Kudo I. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 943-54.
- 2) Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S. *J Immunol* 2002; 168: 5811-6.
- 3) Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, et al. *J Biol Chem* 2002; 277: 28601-8.
- 4) Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, et al. *J Biol Chem* 2000; 275: 32783-92.
- 5) Kamei D, Murakami M, Nakatani Y, Ishikawa Y, Ishii T, Kudo I. *J Biol Chem* 2003; 278: 19396-405.
- 6) Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, et al. *J Biol Chem* 2003; 278: 37937-47.
- 7) Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, et al. *J Biol Chem* 2004; 279: 33684-95.
- 8) Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9044-9.

- 9) Mabuchi T, Kojima H, Abe T, Takagi K, Sakurai M, Ohmiya Y, et al. *Neuroreport* 2004 ; 15 : 1395-8.
- 10) Engblom D, Saha S, Engstrom L, Westman M, Audoly LP, Jakobsson PJ, Blomqvist A. *Nst Neurosci* 2003 ; 6 : 1137-8.
- 11) Saha S, Engström L, Mackerlova L, Jakobsson PJ, Blomqvist A. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 ; 288 : R1100-7.
- 12) Kojima F, Kapoor M, Yang L, Crofford LJ. 10<sup>th</sup> International Conference of Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases 2007.
- 13) Wang M, Zukas AM, Hui Y, Ricciotti E, Pure E, Fitzgerald GA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 14507-12.
- 14) Oshima M, Oshima H, Matsunaga A, Taketo MM. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 9147-51.
- 15) Blaine SA, Meyer AM, Hurteau G, Wick M, Hankin JA, Murphy RC, et al. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 : 209-17.
- 16) Ikeda-Matsuo Y, Ikegaya Y, Matsuki N, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. *J Neurochem* 2005 ; 94 : 1546-58.
- 17) Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 11790-5.
- 18) Cheng Y, Wang M, Yu Y, Lawson J, Funk CD, Fitzgerald GA. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 1391-9.
- 19) Jia Z, Zhang A, Zhang H, Dong Z, Yang T. *Circ Res* 2006 ; 99 : 1243-51.

## suggestion

### 選択的 COX-2 阻害薬について知っておいてよいこと

アスピリンは非ステロイド性消炎鎮痛薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs : NSAIDs) の代表であるとされる。古代には柳 (*Salix alba*) の樹皮を煎じて解熱剤として服用したことから、サリチル酸 (salicylic acid) が基礎となってアセチルサリチル酸、すなわち「アスピリン」が合成されたことはよく知られている。ところが筆者自身が、いわゆるシルクロードを訪ねてみると、確かにオアシスに葉の裏の白いヤナギが群生しているが、これは柳 (*Salix*) ではなく、楊 (*Populus*) であることがわかった。したがって、この話はどこかで混線しているかもしれない。

長らく作用機序の不明であったアスピリンがアラキドン酸に働くシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase : COX) を阻害して、プロスタグランジン (PG) 生合成を抑制することを初めて報告したのはイギリスの John R Vane (1971) のグループである。Vane は故人となったが、今やこの説は十分な根拠を得て確実となった。

COX に 2 つのアイソザイムのあることが明らかになり、選択的 COX-2 阻害薬も開発された。COX-2 はよく知られるように、刺激でいろいろな細胞に誘導されるために、その関与する分野も広い。詳しくは総説<sup>1)</sup>を参照されたい。

主な機能だけをあげると、急性炎症、疼痛、発熱、肉芽形成、血管形成、大腸ポリープ形成、腎内機能などがある。子宮粘膜の周期的増殖の血管

形成にも関与する。厳密な意味では選択的 COX-2 阻害薬ではないが、日本では早くからメロキシカム (モービック®) が発売されている [preferable (好ましい) COX-2 inhibitor といわれる]。COX-2 が誘導されると思われる痛み、特に腰痛、関節痛に対して有効である。心血管障害の有害事象は報告されていない。最近日本で、選択的 COX-2 阻害薬のセレコキシブ (セレコックス®) が発売された。

血小板は細胞核がないので、COX-2 は誘導されない。したがって選択的 COX-2 阻害薬は無効である。胃粘膜の PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> 産生は COX-1 によるので、従来の NSAIDs は胃粘膜傷害を起しやすいため、選択的 COX-2 阻害薬は、長期に服用しても胃粘膜傷害を起さないことが特長である。しかし、粘膜下に及ぶ胃潰瘍が形成されると、治癒機転として肉芽形成が起こるので COX-2 が関与する。したがって選択的 COX-2 阻害薬がまったく胃粘膜傷害を起さないというのは正しくない。

選択的 COX-2 阻害薬が、冠動脈バイパス手術後に障害を起し、心血管障害 (心筋梗塞、脳卒中など) を増悪させるという発表から、米国の製薬会社メルクは 2004 年に rofecoxib を市場から撤退させた。選択的 COX-2 阻害薬が心血管障害を起すことには否定的な発表もあり、2005 年 2 月に米国 FDA (食品医薬品局) が大がかりな討論を行ったが、血管障害に関する長期の臨床試験がな



## Detection of amyloid $\beta$ protein in the urine of Alzheimer's disease patients and healthy individuals

Manabu Takata, Manabu Nakashima, Taro Takehara, Hideyo Baba, Kazuyuki Machida, Yoshiharu Akitake, Kazuhiko Ono, Masato Hosokawa, Mitsuo Takahashi\*

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

Received 10 September 2007; received in revised form 26 January 2008; accepted 12 February 2008

### Abstract

To seek for a new valid biomarker using non-invasive specimens for the diagnosis of Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI), we carried out the detection of amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) protein in urine. Ten-millilitre urine samples were first sedimented with trichloroacetic acid, and the pellets were resuspended for further analysis by Western blotting with anti- $A\beta$  antibody. The detection sensitivity of the method was 40 pg/ml. Rates of subjects positive for monomeric  $A\beta$  according to their clinical dementia rating (CDR) were 11.1% for CDR 0, 62.5% for CDR 0.5, 83.3% for CDR 1, 54.5% for CDR 2 and 0% for CDR 3. A single  $A\beta$  band relative to the CDR score reflects an alteration in the production, solubility and clearance of  $A\beta$  in the brain. Thus, the method could be used as both a diagnostic and monitoring tool in assessing AD and MCI patients during disease-modifying therapies.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Amyloid  $\beta$  protein; Alzheimer's disease; Urine; Western blot; Clinical dementia rating (CDR); Biomarker

The increasing number of patients with cognitive impairments or dementia is becoming an issue of serious concern in countries with aging populations, in part because of the concomitant rise in medical and social costs. The majority of dementia patients suffer from Alzheimer's disease (AD) and their number has increased. AD is characterized clinically by a presenile or senile onset of progressive memory and orientation disturbances with other cortical focal signs such as aphasia, apraxia and agnosia [10,19,41]. The psychiatric symptoms such as delusions or hallucinations are problematic for caregivers. AD is also characterized by such pathological hallmarks as senile plaques composed of aggregated amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ), neurofibrillary tangles (NFTs) and consequent neuronal cell death [4].

The clinical entity of mild cognitive impairment (MCI) has thus been developed in order to identify pre-AD states [26]. MCI patients with abnormal memory episodes (amnestic MCI) have a high risk of developing AD within the next few years [9,15,35].

AD is diagnosed clinically with the aid of various neuropsychological examinations [20,31], neuroimaging [23,25] and other laboratory procedures [2,3]. With the application of efficient biomarkers using cerebrospinal fluid (CSF) and plasma, quantitative analysis of CSF has shown  $A\beta$  or phosphorylated tau alterations in AD patients [34], while that of plasma has not proven useful for identifying susceptible individuals [24]. Although recent studies have clearly shown that the ratio of plasma  $A\beta_{42/40}$  is a useful biomarker for identifying elderly subjects with increased risk for MCI and AD [14,39]. In the case of CSF, the invasive acquisition of samples has limited its use, especially with respect to clinic-based outpatients. Accordingly, we searched for a more convenient and simple method to reflect  $A\beta$  turnover in the brain.  $A\beta$  in circulating plasma is to some degrees filtered into the urine [13]. To validate the method used in this study, we examined the correlation between the  $A\beta$  level in the urine and the severity of AD, and found that the results reflected changes in  $A\beta$  turnover in the brain.

Synthesized  $A\beta_{1-40}$  and  $A\beta_{1-42}$  peptides (AnaSpec, San Jose, CA, USA) were dissolved in 5 ml of MilliQ water and then added to 5 ml of phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), resulting in an  $A\beta_{1-40}$  concentration of 23  $\mu$ M and an  $A\beta_{1-42}$

\* Corresponding author. Tel.: +81 92 871 6631x6645; fax: +81 92 863 0389.  
E-mail address: [takahasi@fukuoka-u.ac.jp](mailto:takahasi@fukuoka-u.ac.jp) (M. Takahashi).

concentration of 22  $\mu\text{M}$ . The A $\beta$  solutions were further diluted with PBS to a 5  $\mu\text{M}$  concentration and were kept at  $-30^\circ\text{C}$  in aliquots of 30  $\mu\text{l}$  until use.

The prepared synthesized A $\beta$  solution was added to 1 ml of normal control urines with A $\beta$  contents ranging from 0.003 to 1.11 ng.

All experimental procedures described below were approved by the Ethics Committee for Medical Care and Trials at Fukuoka University. Urine samples were taken with the informed consent of cognitively impaired patients who were under the care of the medical staff at Fukuoka University Hospital and related medical facilities. Urine samples were also taken from accompanying family members and unrelated normal controls without any neurological disorders. At least 10 mL of urine were collected in the morning and immediately placed in a cooler. All patients met DSM-IV and NINCDS-ADDA diagnostic criteria for Alzheimer's disease. Patients with cognitive impairment were also assigned a severity score according to the Clinical Dementia Rating (CDR), ranging from 0 as normal cognitive function, 0.5 as mild cognitive impairment, 1 as mild dementia, 2 as moderate dementia, to 3 as severe dementia [1].

Within 6 h of sampling, the 10 ml urine samples were transferred from the cooler and kept on ice for 30 min. After centrifugation at 15,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  for 15 min, supernatant fractions were collected, mixed well with 1.5 ml of trichloroacetic acid (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), and left on ice for 1 h. Solutions were centrifuged again at 15,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$  for 15 min, and the pellets were washed three times with 85% acetone kept at  $-20^\circ\text{C}$ . Air-dried pellets were kept at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

Stocked samples and A $\beta$  standards were dissolved in a sample buffer (NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) with 15  $\mu\text{l}$  of a reducing agent (NuPAGE Sample Reducing Agent, Invitrogen Corp.) and were heat-denatured at  $70^\circ\text{C}$  for 10 min. After they were cooled down to room temperature, they were loaded in a vertical mini electrophoresis system (XCell II Blot Model, Invitrogen Corp.) filled with a running buffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer, Invitrogen Corp.). Loaded samples were electrophoresed through a 4–12% gradient bis–tris gel (NuPAGE Novex Bis–Tris Gels, Invitrogen Corp.) for 30 min at 200 V with a molecular weight marker (SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen Corp.).

Electrophoresed proteins in the gel were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) at 30 V for 1 h. Printed PVDF membranes were immersed in PBS, and were subjected to microwave treatment for 3 min. Membranes were then immersed in a blocking solution (Blocking One, Nacalai Tesque) for 1 h.

Membranes were incubated in a primary antibody solution (1:5000, mouse anti-human A $\beta$  monoclonal antibody: 6E10, Signet Laboratories, Dedham, MA) for 1 h at room temperature, or alternatively, overnight at  $4^\circ\text{C}$ . After washing three times for 10 min each with Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20, they were then transferred to a secondary antibody solution (1:40,000, HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) for 1 h at room temperature. Detection was performed with a chemi-luminescence

method using an ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Membranes sealed in detection solution were visualized with FluoroChem 8900 (Alpha Innotech, San Leandro, CA). Images were taken and stored every 30 s for 10 min, allowing for up to 20 images in all. On comparing bands corresponding to A $\beta$  standards (A $\beta$  monomer) at around 4 kDa with bands derived from the urine samples, A $\beta$  protein was assessed as either present or absent.

The difference in the frequency of A $\beta$  positive urine samples between CDR 0 group and CDR 2 group was determined using the chi-square method. A  $p$  value  $<0.05$  was considered to be significant.

The lower limit of detection of synthesized A $\beta$  dissolved in standard urine was around 40 pg/ml (Fig. 1A). Typical Western blots of AD patients and healthy controls were shown in Fig. 1B. The A $\beta$  monomeric form at around 4 kDa was detected and the band might correspond to A $\beta$ 1–40 [13].

Patients with Alzheimer's disease and healthy individuals are shown in Table 1 and typical Western blot from subject samples are illustrated in Fig. 1B. Healthy individuals were classified as CDR 0. Rates of samples positive for an A $\beta$  monomeric band at around 4 kDa were 5/8 (62.5%) for CDR 0.5, 5/6 (83.3%) for CDR 1, 6/11 (54.5%) for CDR 2 and 0/5 (0%) for CDR 3 (Fig. 2). Among individuals rated as CDR 0, the rate was 1/9 (11.1%). The difference in the frequency of A $\beta$ -positive urine samples between CDR 0 group and CDR 2 group was determined using the chi-square method and a statistically significant difference was found ( $p < 0.05$ ).

The level of A $\beta$  in the urine is physiologically correlated with circulating A $\beta$  in the blood; once it leaves the circulation, it is filtered through the glomerulus where it may undergo renal tubular reabsorption. The A $\beta$  level in the blood is further affected by brain parenchymal A $\beta$  passing through the blood–brain barrier (BBB). Whether in urine, blood or brain, the A $\beta$  concentration represents a state of equilibrium between the production or influx of A $\beta$  and its degradation or clearance. In this study, since the source of the detected A $\beta$  was not clear, the A $\beta$  concentration in the urine did not always reflect the turnover of A $\beta$  in the brain.

To apply the results of this study to the development of a diagnostic tool for AD, a correlation must be established between the collected data and the clinical stage. Interestingly, Fig. 2 shows that A $\beta$ -positive rates increased as the disease progressed from a preclinical state ranked as CDR 0.5 to CDR 1 (mild AD) and then decreased as the disease further advanced to CDR 2 and 3. The frequency of A $\beta$ -positive urine samples of CDR 0 group and CDR 2 group was analyzed by the chi-square method and a statistically significant difference was observed ( $p < 0.05$ ). These data strongly suggest that urinary A $\beta$  might reflect the severity of AD and in part the A $\beta$  turnover in the brain.

When we examine A $\beta$  turnover in the brain from disease onset to its early progression, the pattern of enzymatic cleavage seems to be the preferential production of A $\beta$ 1–40 or A $\beta$ 1–42, A $\beta$ 1–43 through the action of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase [21] and this might represent the major pathway of APP processing. Under normal physiological conditions, clearing over-produced A $\beta$  from the brain could be efficiently achieved by activated metabolic processes that insure its removal through the blood

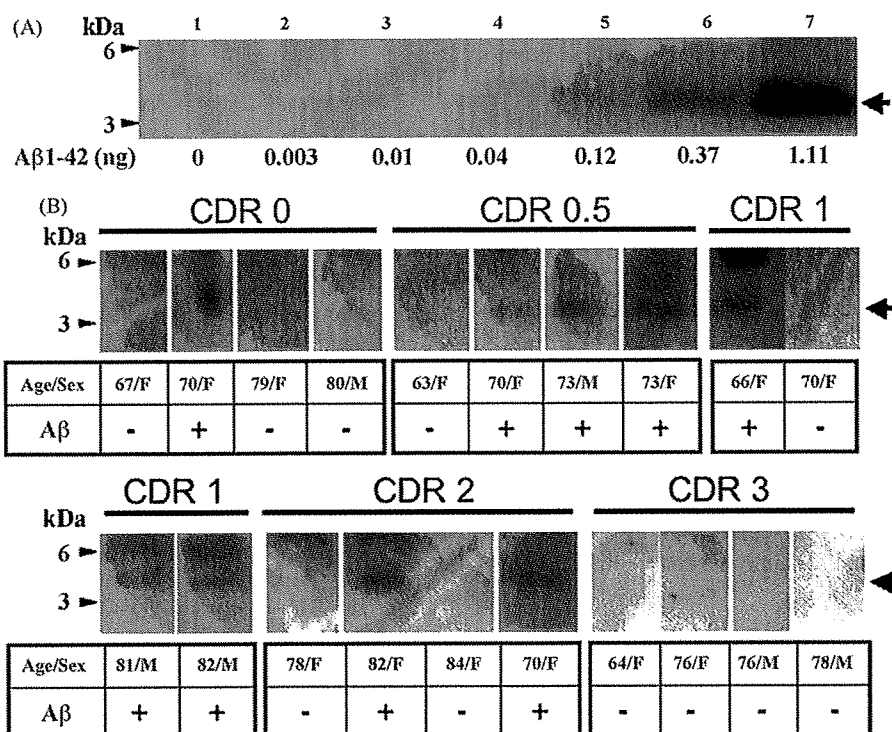


Fig. 1. Western blot analysis: (A) detection limit of synthesized Aβ1–42 in the urine. Synthesized Aβ1–42 was added to 1-ml urine samples in amounts ranging from 0.003 to 1.11 ng and these were placed in lanes 2–7, respectively. (B) Typical Western blot from the subject samples. CDR, Clinical Dementia Rating; F, female; M, male. Arrowheads indicate molecular weight marker positions at 3 and 6 kDa. The arrow indicates the position corresponding to monomeric Aβ.

brain barrier and renal glomeruli. In AD patients, however, Aβ self-assembles to form homo-oligomers or fibrils, and is finally transformed into aggregated plaques that cannot be eliminated by the normal route of clearance. The data obtained with our CDR 1 and 2 samples, in which urine Aβ detection rates again decreased as the disease advanced (CDR 3), might reflect the Aβ turnover mentioned above. Recently, β-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein (APP) was measured in CSF and showed an initial increase followed by a decrease as AD advanced [29], a finding which partly supports our results.

In Down's syndrome with chromosome 21 trisomy, the Aβ-positive rate was as high as 80% (4/5) at any age examined (data not shown), probably owing to the dosage effect of the gene coding for APP. It has been reported that the plasma Aβ level was increased in Down's syndrome patients [37]. Our data presented here matched this observation. Many disease-modifying strategies have also been applied in AD therapy. These include use of APP-processing modifiers such as β-secretase inhibitors [5,18,30] and γ-secretase inhibitors [8,16,38], non-steroidal

anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for β-secretase modification [32,33] and γ-secretase modification [6,11,22,36,40], Aβ vaccination for promoting its clearance from the brain [12,28], and other neurotrophic factors [17,27]. Our method for detecting urine Aβ can be applied to assessing restored Aβ clearance from the brain, or modified Aβ processing in the brains of AD patients receiving such disease-modifying therapies. Therefore, this method could be a useful tool for longitudinal monitoring over the course of treatment.

Recently, several therapeutic strategies have been used in trials aimed at modifying the pathological changes responsible

Table 1  
Clinical features

Classification	Number of samples (male/female)	Age (mean ± S.D.)
CDR 0	9 (5/4)	67–80 (73.3 ± 4.5)
CDR 0.5	8 (2/6)	63–78 (71.8 ± 4.4)
CDR 1	6 (3/3)	66–82 (74.3 ± 6.8)
CDR 2	11 (3/8)	69–86 (76.8 ± 5.9)
CDR 3	5 (2/3)	56–78 (70.0 ± 9.6)

S.D.: standard deviation.

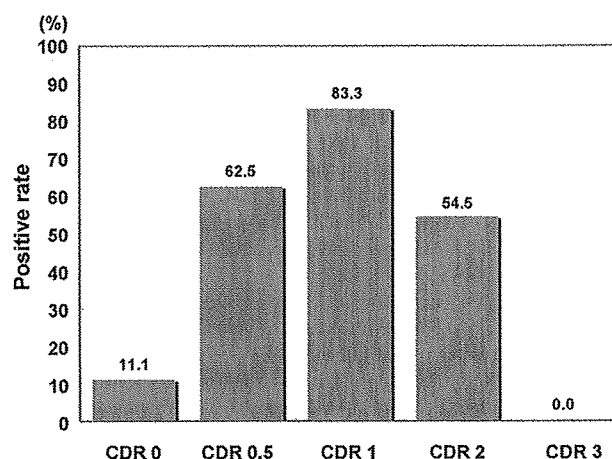


Fig. 2. Rates of subjects positive for monomeric Aβ in the urine, rates of AD patients and healthy controls (CDR 0) with monomeric Aβ in the urine according to their CDR scores are shown as a %.



for AD [7]. Our method with which A $\beta$  is detected in urine could also be employed in estimating the efficacy of these novel therapies. Alterations in the pathological processes of the brain would result in an increase in A $\beta$  degradation or its clearance from this organ. The change could be demonstrated by the second rise in the level of urinary A $\beta$  after introduction of the disease-modifying therapy.

In a future study, we intend to improve our method for quantitative analysis of A $\beta$  in the urine and to extend the range of sampling to clarify the age- and severity-dependent tendencies both in AD patients and healthy individuals.

## Acknowledgements

We are grateful to all patients, their families and to the healthy volunteers who understood the purpose of this study and gave their informed consent for urine sampling. We also thank Dr. William Campbell and Catherine Campbell for English editing of the manuscript.

## References

- [1] American-Psychiatric-Association, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth ed., American Psychiatric Association, Washington, DC, 1994.
- [2] N. Andreasen, K. Blennow, CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease, *Clin. Neurol. Neurosurg.* 107 (2005) 165–173.
- [3] K. Blennow, E. Vanmechelen, H. Hampel, CSF total tau, Abeta42 and phosphorylated tau protein as biomarkers for Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.* 24 (2001) 87–97.
- [4] J. Carter, C.F. Lippa, Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease, *Curr. Mol. Med.* 1 (2001) 733–737.
- [5] J.N. Cumming, U. Iserloh, M.E. Kennedy, Design and development of BACE-1 inhibitors, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 7 (2004) 536–556.
- [6] E. Czirr, S. Weggen, Gamma-secretase modulation with Abeta42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and derived compounds, *Neurodegener. Dis.* 3 (2006) 298–304.
- [7] J.G. Evans, G. Wilcock, J. Birks, Evidence-based pharmacotherapy of Alzheimer's disease, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 7 (2004) 351–369.
- [8] G. Evin, M.F. Sernee, C.L. Masters, Inhibition of gamma-secretase as a therapeutic intervention for Alzheimer's disease: prospects, limitations and strategies, *CNS Drugs* 20 (2006) 351–372.
- [9] P. Fischer, S. Jungwirth, S. Zehetmayer, S. Weissgram, S. Hoenigschnabl, E. Gelpi, W. Krampla, K.H. Tragl, Conversion from subtypes of mild cognitive impairment to Alzheimer dementia, *Neurology* 68 (2007) 288–291.
- [10] M.F. Folstein, P.J. Whitehouse, Cognitive impairment of Alzheimer disease, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 5 (1983) 631–634.
- [11] L. Gasparini, L. Rusconi, H. Xu, P. del Soldato, E. Ongini, Modulation of beta-amyloid metabolism by non-steroidal anti-inflammatory drugs in neuronal cell cultures, *J. Neurochem.* 88 (2004) 337–348.
- [12] D.S. Gelinas, K. DaSilva, D. Fenili, P. St George-Hyslop, J. McLaurin, Immunotherapy for Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (Suppl 2) (2004) 14657–14662.
- [13] J. Ghiso, M. Calero, E. Matsubara, S. Governale, J. Chuba, R. Beavis, T. Wisniewski, B. Frangione, Alzheimer's soluble amyloid beta is a normal component of human urine, *FEBS Lett.* 408 (1997) 105–108.
- [14] N.R. Graff-Radford, J.E. Crook, J. Lucas, B.F. Boeve, D.S. Knopman, R.J. Ivnik, G.E. Smith, L.H. Younkin, R.C. Petersen, S.G. Younkin, Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 64 (2007) 354–362.
- [15] H.R. Griffith, K.L. Netson, L.E. Harrell, E.Y. Zamrini, J.C. Brockington, D.C. Marson, Amnesic mild cognitive impairment: diagnostic outcomes and clinical prediction over a two-year time period, *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 12 (2006) 166–175.
- [16] T. Harrison, I. Churcher, D. Beher, gamma-Secretase as a target for drug intervention in Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 7 (2004) 709–719.
- [17] F. Hefti, Development of effective therapy for Alzheimer's disease based on neurotrophic factors, *Neurobiol. Aging* 15 (Suppl 2) (1994) S193–S194.
- [18] I. Hussain, J. Hawkins, D. Harrison, C. Hille, G. Wayne, L. Cutler, T. Buck, D. Walter, E. Demont, C. Howes, A. Naylor, P. Jeffrey, M.I. Gonzalez, C. Dingwall, A. Michel, S. Redshaw, J.B. Davis, Oral administration of a potent and selective non-peptidic BACE-1 inhibitor decreases beta-cleavage of amyloid precursor protein and amyloid-beta production in vivo, *J. Neurochem.* 100 (2007) 802–809.
- [19] J.H. Kramer, J.M. Duffy, Aphasia, apraxia, and agnosia in the diagnosis of dementia, *Dementia* 7 (1996) 23–26.
- [20] J.H. Kramer, J. Jurik, S.J. Sha, K.P. Rankin, H.J. Rosen, J.K. Johnson, B.L. Miller, Distinctive neuropsychological patterns in frontotemporal dementia, semantic dementia, and Alzheimer disease, *Cogn. Behav. Neurol.* 16 (2003) 211–218.
- [21] Y. Ling, K. Morgan, N. Kalsheker, Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 1505–1535.
- [22] A. Lleo, O. Berezovska, L. Herl, S. Raju, A. Deng, B.J. Bacskai, M.P. Frosch, M. Irizarry, B.T. Hyman, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation, *Nat. Med.* 10 (2004) 1065–1066.
- [23] H. Matsuda, T. Ohnishi, T. Asada, Z.J. Li, H. Kanetaka, E. Imabayashi, F. Tanaka, S. Nakano, Correction for partial-volume effects on brain perfusion SPECT in healthy men, *J. Nucl. Med.* 44 (2003) 1243–1252.
- [24] R. Mayeux, L.S. Honig, M.X. Tang, J. Manly, Y. Stern, N. Schupf, P.D. Mehta, Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk, *Neurology* 61 (2003) 1185–1190.
- [25] S. Minoshima, B. Giordani, S. Berent, K.A. Frey, N.L. Foster, D.E. Kuhl, Metabolic reduction in the posterior cingulate cortex in very early Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 42 (1997) 85–94.
- [26] J.C. Morris, M. Storandt, J.P. Miller, D.W. McKeel, J.L. Price, E.H. Rubin, L. Berg, Mild cognitive impairment represents early-stage Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 58 (2001) 397–405.
- [27] T. Nabeshima, K. Yamada, Neurotrophic factor strategies for the treatment of Alzheimer disease, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 14 (Suppl 1) (2000) S39–S46.
- [28] J.A. Nicoll, D. Wilkinson, C. Holmes, P. Steart, H. Markham, R.O. Weller, Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report, *Nat. Med.* 9 (2003) 448–452.
- [29] A. Olsson, K. Hoglund, M. Sjogren, N. Andreasen, L. Minthon, L. Lannfelt, K. Buerger, H.J. Moller, H. Hampel, P. Davidsson, K. Blennow, Measurement of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients, *Exp. Neurol.* 183 (2003) 74–80.
- [30] H. Potter, D. Dressler, The potential of BACE inhibitors for Alzheimer's therapy, *Nat. Biotechnol.* 18 (2000) 125–126.
- [31] M.R. Powell, G.E. Smith, D.S. Knopman, J.E. Parisi, B.F. Boeve, R.C. Petersen, R.J. Ivnik, Cognitive measures predict pathologic Alzheimer disease, *Arch. Neurol.* 63 (2006) 865–868.
- [32] M. Sastre, I. Dewachter, G.E. Landreth, T.M. Willson, T. Klockgether, F. van Leuven, M.T. Heneka, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9796–9804.
- [33] M. Sastre, I. Dewachter, S. Rossner, N. Bogdanovic, E. Rosen, P. Borghgraef, B.O. Evert, L. Dumitrescu-Ozimek, D.R. Thal, G. Landreth, J. Walter, T. Klockgether, F. van Leuven, M.T. Heneka, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 443–448.
- [34] T. Sunderland, G. Linker, N. Mirza, K.T. Putnam, D.L. Friedman, L.H. Kimmel, J. Bergeson, G.J. Manetti, M. Zimmermann, B. Tang, J.J. Bartko, R.M. Cohen, Decreased beta-amyloid 1–42 and increased tau levels in cere-



- brospinal fluid of patients with Alzheimer disease, *JAMA* 289 (2003) 2094–2103.
- [35] M.H. Tabert, J.J. Manly, X. Liu, G.H. Pelton, S. Rosenblum, M. Jacobs, D. Zamora, M. Goodkind, K. Bell, Y. Stern, D.P. Devanand, Neuropsychological prediction of conversion to Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment, *Arch. Gen. Psychiatry* 63 (2006) 916–924.
- [36] Y. Takahashi, I. Hayashi, Y. Tominari, K. Rikimaru, Y. Morohashi, T. Kan, H. Natsugari, T. Fukuyama, T. Tomita, T. Iwatsubo, Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces Abeta 42 generation, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 18664–18670.
- [37] T. Tokuda, T. Fukushima, S. Ikeda, Y. Sekijima, S. Shoji, N. Yanagisawa, A. Tamaoka, Plasma levels of amyloid beta proteins Abeta1-40 and Abeta1-42(43) are elevated in Down's syndrome, *Ann. Neurol.* 41 (1997) 271–273.
- [38] J.Y. Tsai, M.S. Wolfe, W. Xia, The search for gamma-secretase and development of inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 9 (2002) 1087–1106.
- [39] M. van Oijen, A. Hofman, H.D. Soares, P.J. Koudstaal, M.M. Breteler, Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study, *Lancet Neurol.* 5 (2006) 655–660.
- [40] S. Weggen, J.L. Eriksen, S.A. Sagi, C.U. Pietrzik, V. Ozols, A. Fauq, T.E. Golde, E.H. Koo, Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31831–31837.
- [41] J.A. Yesavage, J.O. Brooks 3rd, J. Taylor, J. Tinklenberg, Development of aphasia, apraxia, and agnosia and decline in Alzheimer's disease, *Am. J. Psychiatry* 150 (1993) 742–747.

# Involvement of Independent Mechanism Upon Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Activation in Methylmercury Cytotoxicity in Rat Cerebellar Granule Cell Culture

Motoharu Sakaue,<sup>1,2\*</sup> Naoko Mori,<sup>2</sup> Maiko Okazaki,<sup>2</sup> Mayuka Ishii,<sup>2</sup> Yayoi Inagaki,<sup>2</sup> Yuka Iino,<sup>2</sup> Kiyomi Miyahara,<sup>2</sup> Mai Yamamoto,<sup>2</sup> Takeshi Kumagai,<sup>3</sup> Shuntaro Hara,<sup>4</sup> Masako Yamamoto,<sup>1</sup> and Kazuyoshi Arishima<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy II, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Kanagawa, Japan

<sup>2</sup>Department of Public Health and Molecular Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo, Japan

<sup>3</sup>Laboratory of Hygienic Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Tokyo, Japan

<sup>4</sup>Department of Health Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, Tokyo, Japan

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation plays a role in repairing injured DNA, while its overactivation is involved in various diseases, including neuronal degradation. In the present study, we investigated the use of a PARP inhibitor, 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)-butoxy]-1(2*H*)-isoquinolinone (DPQ), whether methylmercury-induced cell death in the primary culture of cerebellar granule cells involved PARP activation. DPQ decreased the methylmercury-induced cell death in a dose-dependent manner. Unexpectedly, this protective effect was DPQ specific; none of the other PARP inhibitors—1,5-dihydroxyisoquinoline, 3-aminobenzamide, or PJ34—affected neuronal cell death. Methylmercury-induced cell death involves the decrease of glutathione (GSH) and production of reactive oxygen species. Therefore, to understand the mechanism by which DPQ inhibits cytotoxicity, we first studied the effect of DPQ on buthionine sulfoximine- or diethyl maleate-induced death of primary cultured cells and human neuroblastoma IMR-32 cells, both of which are mediated by GSH depletion. DPQ inhibited the cell death of both cultured cells, but it did not restore the decrease of cellular GSH by buthionine sulfoximine to the control level. Second, we evaluated the antioxidant activity of PARP inhibitors by methods with ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) or DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) used as a radical because antioxidants also efficiently suppress methylmercury-induced cell death. The antioxidant activity of DPQ was the lowest among the tested PARP inhibitors. Taken together, our results indicate that DPQ effectively protects cells against methylmercury- and GSH depletion-induced death. Furthermore, they suggest that DPQ exerts its protective effect through a mechanism other than

PARP inhibition and direct antioxidation, and that PARP activation is not involved in methylmercury-induced neuronal cell death. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** methylmercury; cytotoxicity; cerebellar granule cells; PARP inhibitor; IMR-32

Methylmercury is well known as a potent neurotoxin. Methylmercury causes neuronal cell death by disrupting intracellular homeostasis, changing the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, inhibiting microtubule assembly, reducing intracellular glutathione (GSH) content, and increasing reactive oxygen species (ROS) production (Miura and Imura, 1987; Sarafian and Verity, 1991; Sarafian et al., 1994; Marty and Atchison, 1997; Sakaue et al., 2003). Cerebellar granule cells (CGCs) have provided a good model for the analysis of methylmercury-induced neuronal cell death because the cells are particularly vulnerable to methylmercury-induced cell death *in vivo* and *in vitro* (Nagashima et al., 1996; Sakaue et al., 2005). The results of previous studies have shown that

Contract grant sponsor: Grant-in-Aid for Young Scientists (B), The Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan; Contract grant number: 18790101 (to M.S.); Contract grant sponsor: Kitasato University Research Grant for Young Researchers (to M.S.).

\*Correspondence to: Motoharu Sakaue, Department of Anatomy II, School of Veterinary Medicine, Azabu University 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan. E-mail: sakaue@azabu-u.ac.jp

Received 2 March 2008; Revised 11 April 2008; Accepted 17 April 2008

Published online 14 July 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.21780

methylmercury-induced death of rat CGCs in vitro occurs even at a low concentration of methylmercury via a caspase-independent pathway (Castoldi et al., 2000; Dare et al., 2000, 2001), and antioxidants, including vitamin E, catalase, L-cysteine, and GSH, prevent methylmercury from leading cultured neurons to cell death (Park et al., 1996; Gassó et al., 2001). GSH is the major intracellular antioxidant. Depletion of GSH, a cellular model of oxidative stress, contributes to a time-dependent accumulation of endogenous ROS and subsequent oxidative stress in neurons (Murphy et al., 1989; Kane et al., 1993). Distinct GSH depletion by inhibition of GSH synthesis with buthionine sulfoximine (BSO) or by conjugation of GSH with diethyl maleate (DEM) also causes an increase in ROS and oxidative cell death in neural cell cultures (Kane et al., 1993; Sarafian et al., 1994; Li et al., 2003).

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) plays a physiological role in maintaining genomic integrity, repairing DNA strand breaks (Satoh and Lindahl, 1992) and regulating gene transcription activity (Ju et al., 2006). However, the overactivation of PARP, which has nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) as a substrate, causes a rapid depletion of intracellular energy sources such as NAD<sup>+</sup> and adenosine triphosphate, leading to cell death. Previous reports show that neuronal degeneration in some in vivo and in vitro models is attenuated by PARP inhibitors (Takahashi et al., 1999; Aito et al., 2004; Zhang and Rosenberg, 2004; Besson et al., 2005; Tanaka et al., 2005; Haddad et al., 2006; Fossati et al., 2007). The compound 3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2*H*)-isoquinolinone (DPQ) belongs to the dihydroisoquinolinones that was synthesized and selected as PARP inhibitors (Suto et al., 1991, 1993), which is one of the second-generation PARP inhibitors, because DPQ has a lower 50% inhibitory concentration value than 3-amino-benzamide (3-AB), a widely used PARP inhibitor (Banasik et al., 1992). Not only DPQ and 3-AB, but also N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide, hydrochloride (PJ34), the third-generation PARP inhibitor, and 1,5-dihydroxyisoquinoline are used as PARP inhibitors in some experiments. Overactivation of PARP can be induced by generation of or exposure to ROS or oxidative stress, leading to cell death. Methylmercury-induced cell death of T lymphocytes is prevented by inhibition of PARP (Guo et al., 1998). It remains unclear whether methylmercury-induced death of neurons involves PARP activation, although neurons are the main target of methylmercury.

The purpose of the present study was to elucidate whether PARP activation is involved in methylmercury-induced neuronal death. However, because we found that only DPQ among the PARP inhibitors had a protective effect against cell death, we investigated further, and we found protective effects of DPQ on other cell death models via GSH reducers like methylmercury-, BSO-, or DEM-induced cell death. Our current investigation indicates that the mechanism of methylmercury-induced cell death in neurons can exclude PARP activa-

tion, and that DPQ has a protective effect against methylmercury neurotoxicity by means of some activity other than PARP inhibition.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Cultures and Treatment

Primary cultures of CGCs were prepared from Wistar rats (Jcl:Wistar; Clea Co., Tokyo, Japan) within 24 hr after birth. Cerebella were removed from the pups and incubated in trypsin solution containing DNase for 13 min at room temperature and then were minced by mild trituration with a Pasteur pipette in DNase solution after three washes with Hanks' balanced salt solution (Gibco BRL, Grand Island, NY). CGCs were seeded in Eagle's minimal essential medium (Gibco BRL) containing 1 mg/mL bovine serum albumin, 10 µg/mL bovine insulin, 0.1 nM thyroxin, 0.1 mg/mg human transferrin, 1 µg/mL aprotinin, 30 nM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, 0.25% glucose, 100 U/mL penicillin, and 135 µg/mL streptomycin on poly-L-lysine-coated dishes and cultured for 2 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. All cell culture supplements were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Then the cells were treated with methylmercuric chloride (Tokyo Kasei Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan), BSO, or DEM for 12 to 72 hr with or without DPQ (Sigma), 1,5-dihydroxyisoquinoline (DHIQ, Sigma), Trolox (Sigma), PJ34 (Calbiochem, San Diego, CA), or 3-AB (Sigma).

The neuroblastoma cell line, IMR-32, used in this study was from the American Type Culture Collection (Rockville, MD). IMR-32 cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) with 10% fetal bovine serum (v/v, HyClone, Logan, UT), penicillin (100 U/mL), and streptomycin (100 µg/mL) (Gibco BRL). Cultures were maintained in a humidified incubator at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

The number of viable CGCs and IMR-32 cells was estimated by crystal violet staining. Cells were fixed in 1% glutaraldehyde and stained in 0.2 M 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (pH 6.8, Nacalai) containing 0.1% crystal violet (Wako Pure Chemical Industry, Osaka, Japan) for 10 min. The cells were washed and dried at 60°C after being washed well with distilled water, then incubated in 10% acetic acid to extract the dye that had stained the cells. Optical absorption of the extract was assayed at 595 nm with a Bio-Rad microplate reader model 550 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Dead cells mostly detach from the culture plate bottom, so attached cells were regarded as living cells. Because the crystal violet stains cells that remain attached to the bottom of the culture dish, the concentration of the crystal violet contained in the extract indicates the number of attached cells; thus, we can estimate the ratio of treatment group cells to controls on the basis of the optical density (at 595 nm) of the extract. All experiments were performed in accordance with the Kitasato University Guidelines for Animal Care and Experimentation.

### Fluorescence Microscopy and Counting Nucleus Number

To detect morphological alteration of the nucleus as an index of cytotoxicity, we fixed cells with 4% formalin

(Nacalai) for 10 min at room temperature and then stained them with 0.2 mM Hoechst 33258 (Sigma). The morphology of nuclei was visualized in micrographs made from images taken with a confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). At least 200 nuclei containing condensed, fragmented, and normal nuclei were counted on the three micrographs randomly chosen per culture coverslip, which was independently repeated three times. The data expressed the ratio of morphologically abnormal nuclei against the total number of nuclei.

#### Antioxidant Assay

We used two methods to determine the direct antioxidant activity of compounds. Test compounds in these assays were Torolox, DPQ, DHIQ, PJ34, 3-AB, vitamin E (Wako), (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG, Wako), N-acetyl-L-cysteine (NAC, Sigma), vitamin K<sub>1</sub> (VK<sub>1</sub>, Sigma) and menaquinone-4 (MK4, Sigma). Torolox, vitamin E, EGCG, and NAC were used as a positive control, and VK<sub>1</sub> and MK4 were used as a negative control that does not have direct antioxidant activity in these assays. In the first method, we eliminated the activity of the test compound as a free radical scavenger according to the method reported by Miller et al. (1993) using radical cation formation of 2-2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS<sup>+</sup>). The inhibition of the absorbance of the radical cation was assayed at 665 nm after incubation at 30°C for 4 min in phosphate-buffered saline (pH 7.4) containing 150 μM ABTS (Sigma), metmyoglobin, 75 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the test compounds at the indicated final concentrations. In the second method, we detected the disappearance of the optical absorbance of stable free radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma) after reaction with test compounds at 520 nm (Blois, 1958). Test compounds were incubated in reaction ethanol solution containing 30 μM DPPH as a final concentration at room temperature for 20 min. Then, for evaluation of radical scavenging activity of the test compounds, the optical absorbance of the solution was measured at 520 nm with the model 550 microplate reader.

#### GSH Assay

Primary cultured cells from rat cerebella and IMR-32 cells were collected and washed twice with phosphate-buffered saline. After freezing and thawing the cells twice to burst the cells in 10 mM HCl, the cell suspension was centrifuged at 15,000 rpm for 10 min. The protein concentration in each sample was determined with a Bio-Rad Protein Assay Kit. For protein precipitation, 5-sulfosalicylic acid (final concentration, 5%) was added to the supernatant, and the sample was centrifuged again. Total levels of GSH in each sample were measured by the 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)-GSH reductase recycling method (Kondo, 1994) as follows: a reaction solution was made of the supernatant and reaction mixture, which contained 6.25 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.31 mM EDTA, 0.25 mM NADPH, 0.625 mM DTNB, and 0.75 U/mL GSH reductase at final concentrations, and then the optical absorbance after incubation for 20 min at room temperature was determined at 412 nm with the microplate reader. The content of GSH in the samples

was quantified by comparing absorption with a standard curve constructed with known amounts of GSH and standardized by protein concentration. Data are expressed as percentages of the GSH amount compared with the control group 12 hr after treatment.

#### Statistical Analysis

Statistical differences in the means between the treatment groups were assessed by one-way analysis of variance followed by the post hoc Bonferroni/Dunn test. The differences were considered to be statistically significant at the  $P < 0.05$  level.

## RESULTS

### Protective Effect of DPQ Against Methylmercury-induced Cell Death

The cell viability was investigated in rat CGC culture after treatments to evaluate the effect of DPQ on methylmercury-induced cell death. The methylmercury treatment decreased the cell viability of rat CGCs in a concentration-dependent manner. The cell viabilities at 30, 100, and 300 nM of methylmercury were 71.6% ± 9.9%, 51.4% ± 6.7%, and 36.7% ± 3.3%, respectively. The decrement of cell viability via methylmercury was significantly attenuated to 100% ± 1.0%, 88.8% ± 4.0%, and 58.0% ± 4.6% with 30 μM DPQ cotreatment (Fig. 1A). Further, the protective effect of DPQ was shown to be dose dependent (Fig. 1B). Against the cytotoxicity at 30 and 100 nM of methylmercury, DPQ cotreatment showed almost complete protection. Because DPQ is a PARP inhibitor, we further determined whether other PARP inhibitors, DHIQ, PJ34, and 3-AB, protect cultured cells from the cytotoxicity of methylmercury. Unexpectedly, these compounds did not restore the cell viability decreased through methylmercury treatment (Fig. 1C,D,E). On the other hand, Torolox, a widely used antioxidant and a water-soluble derivative of vitamin E, reversed methylmercury-induced cell death at 50 μM (Fig. 1F).

The effect of DPQ on methylmercury-induced morphological alterations of nuclei was also investigated by means of fluoromicroscopy to reevaluate the result of the cell viability assay because fragmentation and condensation of nuclei were observed in degraded cells. The fluoromicroscopy in the primary cultures of CGCs showed that the morphologically altered nuclei were significantly multiplied in methylmercury-treated cells compared with control cells, while these methylmercury-induced alterations of nuclei were diminished by cotreatment with DPQ, but not by DHIQ, another PARP inhibitor, at 48 hr after treatment (Fig. 2A). As shown in Figure 2B,C, further, there was a significant time-dependent increase in the number of altered nuclei by methylmercury incubation for 48 to 72 hr. DPQ cotreatment significantly reduced the numbers of altered nuclei to the control level in each incubation time, but DHIQ treatment tended to promote rather than inhibit the methylmercury-induced increment in numbers of