

道川 誠 (アルツハイマー病研究部)
脳内脂質代謝変動とアルツハイマー病分子
病態
第5回関西・中部認知症学会、2011年2月
19日、ウインクあいち、名古屋

H. 特許申請
なし

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

(分担)研究報告書

A β 分解酵素活性調節によるアルツハイマー病治療薬の開発

研究分担者: 西道 隆臣 理化学研究所 脳科学総合研究センター

研究要旨

まず、ノックイン戦略を用いて、次世代型 AD モデルマウスを作製した。これは、マウスの A β 配列をヒト化し、スウェーデン変異とバイロイター変異を導入したものである。その結果、A β 42/A β 40 比がワイルドタイプと比較して約 100 倍上昇した。今後、生化学的・神経病理学的・行動遺伝学的解析を行う予定である。化合物評価などにおける有用なツールとなることが期待される。

次に、A β 分解酵素の活性制御機構について検討した。ソマトスタチン受容体サブタイプを培養細胞に発現させ、ソマトスタチンの NEP 活性に対する作用を検討した。さらに、ソマトスタチン受容体タイプ 4 ノックアウトマウスを用いて NEP の発現量を定量した。NEP については、細胞質ドメインに 5 カ所のリン酸化サイトがあるので、リン酸化特異的抗体を作製して、リン酸化・脱リン酸化の影響を検討した。ソマトスタチン受容体 4 が欠損すると NEP の発現が低下した。次に、NEP の細胞質におけるリン酸化反応の少なくとも一部は MAP キナーゼ (MAPK) によってなされ、これは NEP の活性を低下させる。さらに、フォスファターゼ阻害剤を用いた検討により、PP1A が脱リン酸化に関与し NEP 活性を制御することが明らかになった。MAPK は神経成長因子によって活性化されるが、ソマトスタチンの NEP に対する作用も MAPK や PP1A によって制御される可能性は高い。

A. 研究目的

本研究では、新しい次世代型 AD モデルマウスを作製するとともに AD の発症に深く関与する A β の脳内における代謝を制御する神経ペプチド-受容体システムを同定し、さらに、その機構を明らかにする。これにより、脳内 A β レベルを制御することによって、アルツハイマー病の予防と治療に応用することを目的とする。

B. 研究方法

新しいモデルマウスは、相同的組み換えを利用したノックイン戦略にもとづいて作製

した。次に、初代神経培養においてソマトスタチンが NEP 活性を上昇させることがわかっていたので、ソマトスタチン受容体サブタイプを培養細胞に発現させ、ソマトスタチンの NEP 活性に対する作用を検討した。さらに、ソマトスタチン受容体タイプ 4 ノックアウトマウスを用いて NEP の発現量を定量した。NEP については、細胞質ドメインに 5 カ所のリン酸化サイトがあるので、リン酸化特異的抗体を作製して、リン酸化・脱リン酸化の影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。特に動物実験については当研究施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

C. 研究結果と D. 考察

新しい次世代型のモデルマウスでは、A β ₄₂/A β ₄₀の比が100倍程度上昇している。今後、生化学的・神経病理的・行動遺伝学的解析を行う予定である。

ソマトスタチン受容体が存在することによって、ソマトスタチン刺激に対するNEP活性上昇の応答が見られた。これは、海馬や大脳皮質に選択的に存在するタイプ4においても見られた。次に、NEPの細胞質におけるリン酸化反応の少なくとも一部はMAPキナーゼ (MAPK) によってなされ、これはNEPの活性を低下させる。さらに、フォスファターゼ阻害剤を用いた検討により、PP1Aが脱リン酸化に関与しNEP活性を制御することが明らかになった。MAPKは神経成長因子によって活性化されるが、実際にBDNF・NGF・NT3・NT4はNEPのリン酸化を促進し、活性を抑制した。ソマトスタチンとNEPリン酸化の関係は現時点では明確ではないが、ソマトスタチンのNEPに対する作用がMAPKによって制御される可能性は高い。

E. 結論

新しい次世代型モデルは、今後、化合物評価などにおける有用なツールとなることが期待される。

ソマトスタチン受容体タイプ4の活性化がNEP活性上昇を引き起こすことから、この受容体を特異的に活性化する低分子

アゴニストをスクリーニングすることの意義が明らかになった。また、MAPKによるリン酸化がNEP活性を抑制することから、MAPK阻害剤もNEP賦活化に用いることができると期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Kitazume, S., Tachida, Y., Kato, M., Yamaguchi, Y., Honda, T., Hashimoto, Y., Wada, Y., Saito, T., Iwata, N., Saido, T., Taniguchi, N. (2010). Brain endothelial cells produce amyloid β from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form. *J. Biol. Chem.*, 285, 40097-40103

Zhang, G., Thomas, A.L., Marshall, A.L., Kernan, K.A., Su, Y., Zheng, Y., Takano, J., Saido, T.C., Eddy, A.A. (2011) Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 1$ promotes calpain-1 activation and macrophage inflammation in hypercholesterolemic nephropathy. *Lab. Invest.*, 91, 106-123

Attems, J., Yamaguchi, H., Saido T.C., Thal, D.R. (2010). Capillary CAA and perivascular A β -deposition: two distinct features of Alzheimer's disease pathology. *J. Neurol. Sci.* 299, 155-162.

Asai, M., Iwata, N., Tomita, T., Iwatsubo, T., Ishiura, S., Saido, T.C., Maruyama, K. (2010). Efficient four-drug cocktail therapy targeting

amyloid- β peptide for Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 88, 3588–3597.

Thal, D.R., Papassotiropoulos, A., Saido T.C., Griffin, W.S., Mrazek, R.E., Kölsch, H., Trevisan, K.D., Attems, J., Ghebremedhin, E. (2010). Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE epsilon4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 120, 169-183.

2. 学会発表 (海外)

Saido, T.C. N-terminal structure of amyloid β peptide, A β ₁₋₄₂, determines its metabolic fate in brain. PSP2010, Halle(Saale), Germany, 2010, 5

Iwata, N., Higuchi, M., Tsubuki, S., Staufenbiel, M., Saido, T.C. Reactive astrogliosis enhances proGlu-A β formation via up-regulation of glutaminyl cyclase, and reduced neprilysin activity exacerbates this process. ICAD2010, Honolulu, USA, 2010, 7

Saito, T., Suemoto, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Takano, J., Nisson, P., Nishimura, M., Iwata, N., Saido, T.C. A β 43 is potently amyloidogenic in vivo. ICAD2010, Honolulu, USA, 2010, 7

Takano, J., Saido, T.C. Triple knockout mice deficient in calpain 1, calpain 2 and calpastatin: vital role of the

calpain-calpastatin system for life. 2010 FASEB Summer Research Conferences : The Biology of Calpains in Health and Disease. Arizona, USA, 2010, 7

Saido, T.C. Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in pathogenesis of Alzheimer's disease. AD Workshop for Alzheimer's Disease and Other Related Disorders. Hangzhou, China 2010, 10

(国内)

西道 隆臣.

組織普遍型カルパイン-カルパスタチン系の逆遺伝学. 臨床研セミナー 鈴木絃一先生メモリアルシンポジウム～カルパイン研究の今昔～. 東京, 日本, 2010.7.

斉藤 貴志、末元 隆寛、三平 尚美、松葉 由紀夫、Per Nilsson、高野 二郎、西村 正樹、岩田 修永、西道 隆臣.

アルツハイマー病病態形成における A β 43 の役割. 第 29 回日本認知症学会学術集会, 名古屋, 2010 年 11 月

岩田 修永、津吹 聡、Matthias Staufenbiel, 樋口 真人、西道 隆臣.

ネプリライシン活性低下によるアミロイド病形成メカニズム: 炎症反応と ApoE 産生の増強およびピログルタミル型 A β 産生・蓄積との関連性.

第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸, 2010 年 12 月

垣矢 直雅、斉藤 貴志、津吹 聡、西道
隆臣.

A β 分解酵素ネプリライシンの活性制御メ
カニズムの解析

第 33 回日本分子生物学会年会・第
83 回日本生化学学会大会合同大会,
神戸, 2010 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

US Patent: US 7,745,688 B2, Model Mouse
of Alzheimer's Disease Expressing FAD
APP716 and Use of Thereof.

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

分担研究報告書

神経変性予防法(免疫療法)の開発

研究分担者: 松原悦朗 弘前大学大学院医学研究科

研究要旨

Aβ重合体はアルツハイマー病の発症病態の分子基盤であるが、その神経変性誘導機序は不明である。本年度の研究から、神経細胞外 Aβ重合体が神経細胞内に取り込まれ蓄積し神経細胞死を惹起すること、インビボでも細胞内 Aβ重合体蓄積が阻害され、神経変性を予防できることが明らかとなった。さらに、アルツハイマー病患者脳でも細胞内 Aβ重合体蓄積が神経細胞変性を惹起していることも確認され、Aβ重合体が神経細胞変性を惹起し、記憶障害の分子基盤であることが実証された。

A. 研究目的: これまでの研究から神経細胞外の Aβ重合体が細胞内へと蓄積し、神経変性を誘導する発症メカニズムの存在が示唆された。本年度は、まず培養細胞にて直接的な検証を行った後、ヒト脳と Aβ重合体特異的抗体を静脈投与にて記憶障害発症予防効果の得られたアルツハイマー病モデルマウス脳(Tg-2576)においてこの神経変性発症機序を検討した。

B. 研究方法

①神経芽細胞腫(SH-SY5Y 細胞)に Fluor™ 488 標識 Aβ1-42 単量体、Fluor™ 488 標識 Aβ1-42 重合体、蛍光のみ(Fluor™ 488)に暴露させ、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞内取り込みを 10 分、30 分、180 分間観察した。Fluor™ 488 標識 Aβ1-42 重合体暴露後、10 分、30 分、180 分、360 分と 24 時間で、Fluor™ 488 標識 Aβ1-42 単量体と Fluor™ 488 標識 Aβ42-1 単量体暴露 24 時間後、LDH assay を用いて神経細胞死を評価した。

②4 ヶ月齢アルツハイマー病モデルマウス(Tg2576)に 0.4mg/Kg/週の Aβ重合体特異的抗体(1A9 or 2C3)もしくは PBS を 36 週間静脈投与し、記憶障害予防効果が確認された 13 ヶ月齢で病理解析を行った。

③アルツハイマー病患者脳 4 例、健常高齢者脳 3 例の病理解析を行った。病理解析は共焦点レーザー顕微鏡もしくは免疫組織化学的を用いて行った。使用抗体は A11 (ポリクローナル, 1:500, Biosource), DAPI (1:300, 核染色, Invitrogen), 1A9 or 2C3 (モノクローナル)である。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。特に動物実験については当施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

C. 研究結果と D. 考察

①Aβ重合体神経細胞取り込み試験:
Fluor™ 488 標識 Aβ1-42 単量体、Fluor™

488 標識 A β 1-42 重合体、蛍光のみ(Fluor™ 488)をそれぞれ神経芽細胞腫(SH-SY5Y 細胞)とインキュベートした際、蛍光標識 A β 重合体のみが細胞内に取り込まれ顆粒状蓄積を呈した。24 時間後施行した LDH assay では Fluor™ 488 標識 A β 1-42 重合体のみ神経細胞死が観察され、Fluor™ 488 標識 A β 1-42 単量体と Fluor™ 488 標識 A β 42-1 単量体では神経細胞死は認められなかった。

②抗体治療マウス脳病理解析結果：

A β 重合体特異的抗体(1A9 or 2C3)投与群では PBS 投与群に比較して、A11 陽性 A β 重合体の神経細胞内蓄積が予防され、かつ神経細胞変性 (Fluoro Jade-B 陽性) も確実に抑制されていることが明らかとなった。

③ヒト脳病理解析結果：

ヒト脳内での A β 重合体局在は神経細胞内主体で、細胞外は瀰漫性老人斑にのみわずかに観察された。細胞内分布はアルツハイマー病患者では細胞底部と同部から分岐する樹状突起近位部に顆粒状蓄積を、健常者脳神経細胞では細胞質全体に瀰漫性分布を呈していた。前者では Fluoro Jade-B 陽性で細胞核が巨大化した変性像が観察された。

E. 結論

- 1) A β 重合体は神経細胞に取り込まれ、細胞内に蓄積し、遅発性の神経細胞死を誘導することが明らかとなった。
- 2) *in vivo* で細胞外 A β 重合体を選択的に抗体療法で制御すると、神経細胞内 A β 重合体蓄積が抑制され、神経変性予防と記憶障害発症予防効果が得られることが明らかとなった。

3)アルツハイマー病患者脳の神経細胞内では、粗大顆粒状の A β 重合体が蓄積し、神経細胞変性を呈していることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, Michikawa M, Matsubara E: Extracellular and intraneuronal HMW-A β Os represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse. *Mol Neurodegener* 6:20, 2011.

Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, Michikawa M, Matsubara E: Dissociation of β -amyloid from Lipoprotein in Cerebrospinal Fluid from Alzheimer's Disease accelerates β -amyloid-42 assembly. *J Neurosci Res* (in press).

Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Kurata T, Murakami T, Abe K, Yamada K, Wakabayashi K, Sasaki A, Westaway D, Hyslop PS, Matsubara E, Shoji M: Factors responsible for neurofibrillary tangles and neuronal cell losses in tauopathy. *J Neurosci Res*. 2011 (in press).

Seino Y, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Takamura A, Yamamoto-Watanabe Y, Kurata T, Abe K, Ikeda M, Westaway D, Murakami T, St. George-Hyslop P, Matsubara E, Shoji M: A β amyloid accelerates phosphorylation of tau and NFT formation in APP and tau double transgenic mice model. J Neurosci Res. 2010 Dec;88(16):3547-54.

2. 学会発表

Ayumi Takamura, Takeshi Kawarabayashi, Tomoko Matsubara, Mikio Shoji, Etsuro Matsubara: Alzheimer Neuronal Degeneration: Extracellular vs. Intracellular A β oligomers. International Conference on Alzheimer's Disease - ICAD 2010. Honolulu, July 10-15

松原悦朗. 日本内科学会東北地方会
第 57 回生涯教育講演会 認知症治療
の最前線 仙台国際センター, 2010,
2月19日

松原悦朗, 高村歩美, 若佐谷保仁, 渡
辺有希子, 中畑直子, 渡辺光法, 瓦林
毅, 東海林幹夫, A β オリゴマー特異
的受動免疫予防法の開発. 第 51 回日
本神経学会総会 (2010年5月20-22日,
東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金(認知症対策総合研究事業)

(分担)研究報告書

A β 産生分子機構の解明と特異的制御による治療法の開発

研究分担者: 富田泰輔 東京大学大学院薬学系研究科

研究要旨

β および γ セクレターゼは、脳における A β 産生を担う酵素であり、その活性の特異的制御は AD の根本治療法となることが期待されている。申請者は特に両セクレターゼが膜結合型プロテアーゼであることに注目し、その酵素活性と膜脂質との関連を解明し、「脂質環境の変化によるセクレターゼ活性制御」という新たなコンセプトに基づいた AD 創薬標的候補分子群の同定と活性制御法の開発を行った。 γ セクレターゼについては、Notch シグナル遮断による副作用を回避する可能性を持つ γ セクレターゼモジュレーターとして、新たにスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 受容体アゴニスト/機能的アンタゴニストである FTY720 を見出した。一方、昨年度までに神経細胞内の S1P が β セクレターゼである BACE1 活性と関連していることを見出していたが、BACE1 の膜貫通領域に S1P が直接相互作用することを見出した。また AD 患者脳において S1P 産生酵素 Sphk2 活性が上昇していることを見出し、アミロイドによる神経細胞ストレスが Sphk 活性上昇を惹起し、さらなる A β 産生上昇を導く Vicious Cycle の存在を確認した。

A. 研究目的: 本研究では、セクレターゼ活性阻害による脳内 A β 量の制御により、副作用のないアルツハイマー病の予防・治療法の確立を目指す。本年度は、具体的に以下の2点について解明を進めた。1) γ セクレターゼモジュレーターの同定と構造活性相関解析、2) S1P による β セクレターゼ活性の制御機構解明

B. 研究方法

1) 有機化学研究者らによって作出されたオリジナルライブラリーに含まれる化合物および公知の化合物の γ セクレターゼ活性制御効果について、培養細胞および *in vitro* アッセイ系を用いて検討した。

2) 昨年度に確立した Sphk 活性測定系により、AD 患者脳での Sphk 活性変化を検出した。

3) 固相化 S1P を用いて BACE1 蛋白との結合について検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。AD 患者脳についてはペンシルバニア大学神経変性疾患センターにおいて遺族の承諾を得て、同意書が得られている試料を検討した。一方匿名性保護の観点から、個人情報 は 予め 消滅 されているもの 供与 を 受けた。また 提供者 の 尊厳 並びに 冒険 組織 の 特殊性 について 十分 注意 を はら っ て 研究 を 進めた。動物実験については当

施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

C. 研究結果と D. 考察

①脳内移行性を考慮し、脂質をリガンドとする核内受容体や GPCR に注目し、これらのアゴニスト・アンタゴニストおよび誘導体を含んだフォーカストライブラリーを用いて検討した。その結果 Notch 切断を保ちながら A β 産生を低下させる各種 γ セクレターゼモジュレーターとして、S1P 受容体アゴニスト/機能的アンタゴニストである FTY720 (Fingolimod) を同定した。

②昨年度に確立した、蛍光 Sphingosine を用いた *in vitro* SphK assay を利用し、各種サンプルについて検討を行った。AD 患者及びコントロール患者脳について検討を行い、AD 患者脳においては単位神経細胞あたりの SphK2 活性が上昇していることを見出した。

③神経細胞由来膜画分に直接 S1P を付加することで BACE1 活性の上昇を確認した。さらに S1P を含めた各種脂質を固相化したビーズを用いた沈降実験により、BACE1 の膜貫通領域が S1P と直接相互作用することを見出した。

E. 結論

- 1) ごく最近多発性硬化症の治療薬として認可された Fingolimod が新規 GSM として機能することを見出した。中枢神経系での S1P シグナリングが γ セクレターゼ活性にも影響していると考えられる。
- 2) 神経細胞に存在する Sphk 活性が AD 患者脳において上昇していることが明らかとなった。

3) S1P は BACE1 に直接結合し、その活性を上昇させることが示された。

4) 以上の結果から、神経細胞特異的な脂質環境を利用したセクレターゼ活性制御システムの理解により、副作用の軽減された治療薬開発が見込めることを提案する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomita T, Wong PC: Selectivity to APP cleavage provides hope against Alzheimer's. *Alzheimer's Research & Therapy* in press
- 2) Asai M, Iwata N, Tomita T, Iwatsubo T, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K: Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- β peptide for Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 88:3588-3597, 2010
- 3) Takagi S, Tominaga A, Tomita T*, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. *J Neurosci* 30:15943-15050, 2010
- 4) Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, Tomita T, Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M: A

- noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates A β pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 30:11157-11166, 2010
- 5) Kurosumi M, Nishio Y, Osawa S, Kobayashi H, Iwatsubo T, Tomita T, Miyachi H: Novel Notch-sparing γ -secretase inhibitors derived from a peroxisome proliferator-activated receptor agonist library. *Bioorg Med Chem Lett* 20:5282-5285, 2010
 - 6) Watanabe N, Takagi S, Tominaga A, Tomita T, Iwatsubo T: Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1: PARTICIPATION OF TRANSMEMBRANE DOMAINS 2 AND 6 IN THE FORMATION OF INITIAL SUBSTRATE-BINDING SITE OF γ -SECRETASE. *J Biol Chem* 285:19738-19746, 2010
2. 学会発表
<海外>
- 1) Hayashi Y, Tomita T, Kopan R, Iwatsubo T: Notch ligands expressed in nonneuronal cells increase synaptic vesicle proteins in glutamatergic neurons. Keystone Symposium "Synapses: Formation, Function and Misfunction (Z3)". April 12, 2010 Salt Lake City, Utah
 - 2) Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Koyama R, Matsuki N, Tomita T, Iwatsubo T: Proteolytic processing of neuroligin 1. Keystone Symposium "Synapses: Formation, Function and Misfunction (Z3)". April 13, 2010 Salt Lake City, Utah
 - 3) Tomita T: Molecular mechanism of action of γ -secretase inhibitors and modulators. July 12, 2010, AAICAD2010, Honolulu, Hawaii, USA
 - 4) Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of γ -secretase cofactors to the formation of catalytic pore of presenilin 1. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting. November 13-17, 2010, San Diego
 - 5) Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: γ -secretase modulator GSM-1 directly target to N-terminal fragment of Presenilin 1. Society for Neuroscience 40th Annual Meeting. November 13-17, 2010, San Diego
 - 6) Tomita T, Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Iwatsubo T: Structure and function relationship analysis of γ -secretase modulator GSM-1. Society for

Neuroscience 40th Annual Meeting.
November 13-17, 2010, San Diego

March 9-13, 2011, Barcelona, Spain

7) Tomita T: Alzheimer Drug Mechanisms. November 18, 2010, 2010 FIP Pharmaceutical Science World Congress (PSWC)/AAPS, New Orleans, Louisiana, USA, USA

8) Morohashi Y, Hayashi I, Takatori S, Osawa S, Kodama T, Hamakubo T, Tomita T, Iwatsubo T: Neutralization of γ -secretase activity by monoclonal antibody against extracellular domain of nicastrin. The 10th International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases. March 9-13, 2011, Barcelona, Spain

9) Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Presenilin 1 Is a molecular target of phenylpiperidine-type γ -secretase modulators. The 10th International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases. March 9-13, 2011, Barcelona, Spain

10) Tomita T, Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Osawa S, Fukuyama T, Iwatsubo: γ -Secretase modulator GSM-1 directly targets the N-terminal fragment of presenilin 1. The 10th International Congress on Alzheimer's & Parkinson's Diseases.

<国内>

1) 富田泰輔:化合物を基点としたケミカルバイオロジーによるアルツハイマー病治療薬開発 2010年7月30日 平成22年度「包括脳ネットワーク」夏のワークショップ 札幌

2) 富田泰輔:セクレターゼ阻害薬 スタディグループ「次世代の対認知症戦略ー診断から予防までー」 2010年9月18日 第20回日本臨床精神神経薬理学会・第40回日本神経精神薬理学会 合同年会 仙台

3) 豊川圭祐、渡邊直登、大沢智子、富田泰輔、岩坪威: Presenilin 単独での γ セクレターゼ活性の再構成の試み 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

4) 富永綾、高木穂香、富田泰輔、岩坪威: γ -secretase 活性中心サブユニット Presenilin1 の第4膜貫通領域の構造解析 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

5) 佐々木朝輝、高杉展正、大沢智子、富田泰輔、岩坪威: APP 分子内に存在する新規 γ -secretase 活性制御領域の同定と解析 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

6) 福田磨育子、高鳥翔、林幾雄、大沢智子、諸橋雄一、富田泰輔、岩坪威: 抗ニカストリン一本鎖抗体の性状解析 2010年11月

5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋

学研究の推進に向けて” 東京

- 7) 富田泰輔、大木優、横島聡、肥後拓也、島田尚明、大沢智子、福山透、岩坪威: γ セクレターゼモジュレーターGSM-1はプレセニリンN末端断片を標的とする 2010年11月5-7日 第29回日本認知症学会 名古屋
- 8) Ohki Y, Yokoshima S, Higo T, Shimada N, Koizumi H, Osawa S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: γ -Secretase modulator directly targets N-terminal fragment of presenilin-1. 2010年11月27-28日 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. ”基礎研究と応用研究の融合による医療薬学研究の推進に向けて” 東京
- 9) Takeo K, Watanabe N, Tomita T, Iwatsubo T: Contribution of γ -secretase cofactors to the formation of the catalytic pore of presenilin 1. 2010年11月27-28日 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. ”基礎研究と応用研究の融合による医療薬学研究の推進に向けて” 東京
- 10) Sasaki T, Takasugi N, Oosawa S, Tomita T, Iwatsubo T: Identification and analysis of a novel domain modulating γ -secretase-mediated cleavage within amyloid precursor protein. 2010年11月27-28日 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. ”基礎研究と応用研究の融合による医療薬
- 11) Takagi S, Tominaga A, Tomita T, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase. 2010年12月7-10日 BMB2010 神戸
- 12) Tomita T: Structure and function relationships of γ -secretase complex. 2010年12月9日 BMB2010 神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III.研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Takamura A, Okamoto Y, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Mouri A, Nabeshima T, Sun H, Abe K, Shoji M, Yanagisawa K, <u>Michikawa M</u> , Matsubara E	Extracellular and intraneuronal HMW-A β oligomers represent a molecular basis of memory loss in Alzheimer's disease model mouse	Mol. Neurodegener	6	20	2011
Takamura A, Kawarabayashi T, Yokoseki T, Shibata M, Morishima-Kawashima M, Saito Y, Murayama S, Ihara Y, Abe K, Shoji M, <u>Michikawa M</u> , Matsubara E.	The dissociation of A β from lipoprotein in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease accelerates A β 42 assembly.	J Neurosci Res		In press	2011
Nishitsuji K, Hosono T, Uchimura K, and <u>Michikawa M</u>	Lipoprotein lipase is a novel A β -binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of A β in astrocytes	J. Biol. Chem.	286	6393-6401	2011
Akatsu H, Ogawa N, Kanetsuka T, Hori A, Yamamoto T, Matsukawa N, <u>Michikawa M</u> .	Higher activity of peripheral blood angiotensin-converting enzyme is associated with later-onset of Alzheimer's disease.	J. Neurol. Sci.	300	67-73	2011
Minagawa H, Watanabe A, Akatsu H, Adachi K, Ohtsuka C, Terayama Y, Hosono T, Takahashi S, Wakita H, Jung C-G, Komano H, and <u>Michikawa M</u> .	Homocysteine, another risk factor for Alzheimer's disease, impairs apolipoprotein E3 function	J Biol Chem	285	38382-38388	2010
Jung C-G, Horike H, Cha B-Y, Uhm K-O, Yamauchi R, Yamaguchi T, Hosono T, Iida K, Woo J-T, <u>Michikawa M</u> .	Honokiol increases ABCA1 expression level by activating retinoid X receptor β .	Biol. Pharm. Bull,	33	1105-1111	2010

Wakasaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Yamamoto-Watanabe Y, Takamura A, Kurata T, Murakami T, Abe K, Yamada K, Wakabayashi K, Sasaki A, Westaway D, Hyslop PS, <u>Matsubara E</u> , Shoji M	Factors responsible for neurofibrillary tangles and neuronal cell losses in tauopathy.	J Neurosci Res.		In press	2011
Seino Y, Kawarabayashi T, Wakasaya Y, Watanabe M, Takamura, A, Yamamoto-Watanabe Y, Kurata T, Abe K, Ikeda M, Westaway D, Murakami T, St.George-Hyslop P, <u>Matsubara E</u> , Shoji M	A β amyloid accelerates phosphorylation of tau and NFT formation in APP and tau double transgenic mice model	Neurosci Res.	88	3547- 3554	2010
Kitazume, S., Tachida, Y., Kato, M., Yamaguchi, Y., Honda, T., Hashimoto, Y., Wada, Y., Saito, T., Iwata, N., <u>Saido, T.</u> , Taniguchi, N	Brain endothelial cells produce amyloid β from amyloid precursor protein 770 and preferentially secrete the O-glycosylated form	J. Biol. Chem	285	40097- 40103	2010
Zhang, G., Thomas, A.L., Marshall, A.L., Kernan, K.A., Su, Y., Zheng, Y., Takano, J., <u>Saido, T.C.</u> , Eddy, A.A	Nicotinic acetylcholine receptor 1 promotes calpain-1 activation and macrophage inflammation in hypercholesterolemic nephropathy	Lab. Inves	91,	106- 123	2010
Attems, J., Yamaguchi, H., <u>Saido T.C.</u> , Thal, D.R	Capillary CAA and perivascular A β -deposition: two distinct features of Alzheimer's disease pathology	J. Neurol. Sci.	299	155- 162	2010
Asai, M., Iwata, N., Tomita, T., Iwatsubo, T., Ishiura, S., <u>Saido, T.C.</u> , Maruyama, K.	Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- β peptide for Alzheimer's disease.	J. Neurosci. Res	88	3588- 3597	2010
Thal, D.R., Papassotiropoulos, A., <u>Saido T.C.</u> , Griffin, W.S., Mrak, R.E., Kölsch, H., Tredici, K.D., Attems, J., Ghebremedhin, E	Capillary cerebral amyloid angiopathy identifies a distinct APOE epsilon4-associated subtype of sporadic Alzheimer's disease	Acta Neuropathol	120	169- 183	2010
Watanabe N, Takagi S, <u>Tomita T</u> , Iwatsubo T	Functional analysis of the transmembrane domains of presenilin 1:	J Biol Chem	285	19738- 19746	2010

Kurosumi M, Nishio Y, Osawa S, Kobayashi H, Iwatsubo T, <u>Tomita T</u> , Miyachi H	Novel Notch-sparing γ -secretase inhibitors derived from a peroxisome proliferator-activated receptor agonist library.	Bioorg Med Chem Lett	20	5282-5285	2010
Fukumoto H, Takahashi H, Tarui N, Matsui J, <u>Tomita T</u> , Hirode M, Sagayama M, Maeda R, Kawamoto M, Hirai K, Terauchi J, Sakura Y, Kakihana M, Kato K, Iwatsubo T, Miyamoto M	A noncompetitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates A β pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease.	J Neurosci	30	11157-11166	2010
Takagi S, Tominaga A, <u>Tomita T</u> , Iwatsubo T	Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the γ -secretase.	J Neurosci	30	15943-15950	2010
Asai M, Iwata N, <u>Tomita T</u> , Iwatsubo T, Ishiura S, Saido TC, Maruyama K	Efficient four-drug cocktail therapy targeting amyloid- β peptide for Alzheimer's disease.	J Neurosci Res	88	3588-3597	2010

IV.研究成果の刊行物・別刷

Homocysteine, Another Risk Factor for Alzheimer Disease, Impairs Apolipoprotein E3 Function^{*[S]}

Received for publication, May 19, 2010, and in revised form, September 23, 2010. Published, JBC Papers in Press, October 1, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.146258

Hirohisa Minagawa[‡], Atsushi Watanabe[§], Hiroyasu Akatsu[¶], Kayo Adachi[§], Chigumi Ohtsuka^{||}, Yasuo Terayama^{||}, Takashi Hosono[‡], Satoshi Takahashi^{||}, Hideaki Wakita[§], Cha-Gyun Jung[‡], Hiroto Komano^{**}, and Makoto Michikawa^{†1}

From the Departments of [‡]Alzheimer Disease Research and [§]Cognitive Brain Science, National Center for Geriatrics and Gerontology, 35 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8511, Japan, [¶]Choju Medical Institute, Fukushima Hospital, Toyohashi 441-8124, Japan, the ^{||}Department of Neurology and Gerontology, School of Medicine, and the ^{**}Department of Neuroscience, School of Pharmacy, Iwate Medical University, Yahaba, Shiwa, Iwate 028-3694, Japan

Apolipoprotein E (apoE) $\epsilon 4$ and hyperhomocysteinemia are risk factors for Alzheimer disease (AD). The dimerization of apoE3 by disulfide bonds between cysteine residues enhances apoE3 function to generate HDL. Because homocysteine (Hcy) harbors a thiol group, we examined whether Hcy interferes with the dimerization of apoE3 and thereby impairs apoE3 function. We found that Hcy inhibits the dimerization of apoE3 and reduces apoE3-mediated HDL generation to a level similar to that by apoE4, whereas Hcy does not affect apoE4 function. Western blot analysis of cerebrospinal fluid showed that the ratio of apoE3 dimers was significantly lower in the samples from the patients with hyperhomocysteinemia than in those that from control subjects. Hyperhomocysteinemia induced by subcutaneous injection of Hcy to apoE3 knock-in mice decreased the level of the apoE3 dimer in the brain homogenate. Because apoE-HDL plays a role in amyloid β -protein clearance, these results suggest that two different risk factors, apoE4 and hyperhomocysteinemia, may share a common mechanism that accelerates the pathogenesis of AD in terms of reduced HDL generation.

It has been shown that the possession of the apolipoprotein E (apoE) $\epsilon 4$ allele is a major risk factor for Alzheimer disease (AD)² (1). In the central nervous system, apoE is one of the major lipid acceptors to remove cholesterol from cells and generate HDL particles. Previous studies have shown that apoE isoforms do not affect apoE binding to ABCA1, that apoE-mediated ABCA1-dependent cholesterol efflux is not affected by apoE isoforms in fibroblasts (2), and that there is no apoE-isoform-dependence on apoE-mediated lipid efflux from mouse astrocytes (3). Other lines of evidence have shown that apoE

induces lipid efflux from macrophages and neural cells in an isoform-dependent manner; apoE3 induces a greater lipid efflux than apoE4 (4–9). It has been shown that two major factors cause this apoE-isoform-dependent generation of HDL. Namely, intramolecular domain interaction occurring in apoE4 attenuates apoE4 ability to generate HDL and intermolecular dimerization by disulfide bonds between cysteines in apoE3 enhances apoE3 ability to generate HDL in neural cells (10).

Recent studies have shown other functions of apoE as well, including an intracellular function of apoE (11, 12) and a function of apoE in clearance and degradation of A β . It has been demonstrated that apoE isoforms differentially regulate A β clearance from the brain (13), and that an increased level of lipidated apoE, namely, apoE-HDL, stimulates A β degradation (14). These lines of evidence suggest that the lower ability of apoE4 than apoE3 to generate HDL would result in an enhanced A β deposition in the brain owing to the lower A β degradation/clearance from the brain. Similarly, apoE-isoform-dependent HDL generation results in a lower HDL-cholesterol level in serum in those who possess apoE $\epsilon 4$ allele, which is a risk factor for atherosclerosis (15) and cerebral infarction (16).

In light of these findings, it is interesting to note that similar to the apoE $\epsilon 4$ allele, hyperhomocysteinemia is a risk factor not only for atherosclerosis (17), cerebral infarction (18), and vascular dementia (19), but also for AD (20–23), and that homocysteine (Hcy) level has been reported to increase in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with AD compared with that of control subjects (24). Hcy is generated from the metabolism of methionine, the sulfur-containing amino acid. Previous studies have shown that Hcy generates oxidative stress, leading to cell damage (25), impairs blood-brain barrier function (26), and increases brain A β levels (27, 28). However, the molecular mechanism underlying hyperhomocysteinemia-mediated AD development has not yet been fully understood. Because Hcy is a molecule harboring a thiol, it is possible that the thiol of Hcy associates with the thiol of cysteine residues in apoE3, and this disulfide bonds interferes with apoE3 dimerization. Because the dimerization of apoE3 enhances its ability to generate HDL (7, 10), Hcy bound to cysteine residues of apoE3 deteriorates apoE3 HDL generation. In this study, we found that Hcy interferes with apoE3 dimerization by forming disulfide bonds with cysteine residues of apoE3 and impairs apoE3 ability to generate HDL to a level similar to that of apoE4. This is also the case

* This work was supported by Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan Comprehensive Research on Aging and Health Grant H20-007, the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), and Grant-in-aid for Scientific Research on Priority Areas 20023040 (Research on Pathomechanisms of Brain Disorders) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Methods, Table 1, and Figs. 1–3.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-562-46-2311; Fax: 81-562-46-8569; E-mail: michi@ncgg.go.jp.

² The abbreviations used are: AD, Alzheimer disease; DTT, dithiothreitol; PC, phosphatidylcholine; CSF, cerebrospinal fluid; Hcy, homocysteine.

for human CSF obtained from patients with hyperhomocysteinemia and for brain of apoE3 knock-in mice subcutaneously injected with Hcy. These results suggest that two different risk factors for AD, namely, apoE4 and hyperhomocysteinemia, may share a common mechanism; that is, apoE4 has a lower ability to generate HDL than apoE3 and the Hcy modification of apoE3 impairs the ability of apoE3 to generate HDL to a level similar to that of apoE4.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals—ApoE knock-out mice (B6.129P2-ApoE^{tm1Unc/J}) were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). Mice expressing human apoE3 in place of mouse apoE (apoE3 knock-in mice) (29) were kindly provided by the Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences.

Cell Culture—All experiments were performed in compliance with existing laws and institutional guidelines. Highly astrocyte- and neuron-rich cultures were prepared in accordance with a method described previously (30). The astrocyte-rich cultures were maintained in DMEM containing 10% FBS until use.

ApoE Preparation and Hcy Treatment—Five hundred micrograms of apoE3 or apoE4, purchased from Wako (Osaka, Japan), was dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 6 M urea to obtain 1 ml of an apoE-containing solution, dialyzed against PBS overnight at 4 °C, and stocked in aliquots at -80 °C as described previously (10). Hcy was dissolved in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) to make a stock solution at a concentration of 100 mM, and the Hcy stock solution was divided into aliquots and kept at -80 °C until use. For Hcy treatment, 7.5 μ l of 100 mM Hcy was added to 500 μ l of an apoE-containing solution. The apoE solutions with or without Hcy were incubated overnight at room temperature. The samples were then dialyzed against PBS overnight at 4 °C. The protein concentration of each sample was determined using a BCA protein assay kit (Pierce) and used for experiments to determine lipid efflux. For dithiothreitol (DTT) treatment, 5 mM DTT was incubated with an apoE stock solution overnight at room temperature. The samples were then dialyzed against PBS overnight at 4 °C. The protein concentration of each sample was determined using a BCA protein assay kit and used for experiments to determine lipid efflux.

Determination of Levels of Cholesterol and Phosphatidylcholine (PC) Released from Astrocytes Labeled with [¹⁴C]Acetate—Astrocytes plated in 12-well dishes were cultured in DMEM containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin solution for 72 h. The cultures were then treated with 37 kBq/ml [¹⁴C]acetate (Moravek Biochemicals, Inc., Brea, CA) for 48 h. The astrocytes were washed in DMEM twice and treated with apoE in DMEM. The culture medium was quickly removed, and the astrocytes were dried at room temperature, and the levels of cholesterol and PC released were determined as described previously (7). The levels of [¹⁴C]cholesterol and [¹⁴C]PC efflux were calculated using the following formula: % efflux = media \times 100/(media + cell).

Reverse-phase High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry—A synthetic peptide, LGADMEDVCGR or LGADMEDVC(Hcy)GR, or recombinant apoE3 was

dissolved in PBS, to a concentration of 1 mM or 15 μ M, respectively. Synthetic peptide LGADMEDVCGR or ApoE3 was mixed with or without 10-fold molar concentration of Hcy at 4 °C for 1 day using a vortex mixer. ApoE3 incubated with or without Hcy was digested with trypsin (1 μ g/ml; Trypsin Gold, Promega) at an enzyme/substrate ratio of 1:100 (w/w) at 37 °C overnight. Incubated synthetic peptides or apoE3 tryptic peptides were separated by reverse-phase HPLC (model 1100 Series; Agilent Technology, Waldbronn, Germany) on a C18 column (2 \times 30 mm; Cadenza CD-C18, Imtakt, Kyoto, Japan) with a linear gradient of 0–64% acetonitrile in 0.1% TFA for 64 min at a flow rate of 0.2 ml/min. The fractionated peptides were subjected to mass spectrometry (AXIMA-CFR, Shimadzu, Kyoto, Japan). Mass spectrometric analysis was performed by MALDI-TOF MS. Samples were prepared by mixing with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix.

Sampling of Human Plasma and CSF—Human plasma and CSF were obtained from patients in Fukushima Hospital (Toyohashi, Japan). The plasma and CSF were frozen immediately in liquid nitrogen at lumbar tap and then stored at -80 °C until use. Experiments using human CSF were performed after obtaining informed consent from the patients' guardians for diagnosis and research for biochemical, molecular biological, and genomic analysis.

Determination of Levels of Hcy in Plasma and CSF—The Hcy concentrations in human plasma and CSF were determined by HPLC as demonstrated previously (24). The apoE genotype was also determined and the samples from apoE3/3 patients were used for this study.

Western Blot Analysis—For the determination of apoE3 dimers, the conditioned media or human CSF were dissolved in a sampling buffer consisting of 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10% glycerol, 4% SDS, and 0.01% bromophenol blue and analyzed by 12.5% Tris/Tricine SDS-PAGE under nonreducing conditions. Blots were probed for 4 h at room temperature with a goat anti-apoE polyclonal antibody, AB947 (1: 2,000; Chemicon, Temecula, CA). Band detection was carried out using an ECL kit (GE Healthcare). The signals corresponding to apoE of each sample in the immunoblot membrane were quantified by densitometry with NIH ImageJ software, with varying concentrations of recombinant apoE protein (Wako, Tokyo, Japan) as standards. Standard signals were demonstrated to be linear in the range of apoE protein amounts from 0 to 2 μ g per lane. The apoE concentrations in the conditioned culture media within this range were used for analysis.

Chemically Induced Hyperhomocysteinemia—Mice expressing human apoE3 in place of mouse apoE (apoE3 knock-in mice) (29) at 40–42 weeks of age were subcutaneously injected with Hcy. PBS (100 μ l) containing Hcy at a concentration of 13 μ mol/ μ l (0.6 μ mol/g body weight) was injected into the mice twice a day (in the morning and evening) for 6 days. For control mice, 100 μ l of PBS was injected. In the morning of the seventh day, the animals were deeply anesthetized with isoflurane. Through an incision of the skin covering the occipital bone and the cervical dorsum, the atlanto-occipital membrane was exposed and incised under an operating microscope. The animals were perfused transcardially with PBS, and the brains were removed. Peripheral blood (0.5–1.0 ml) was collected from the