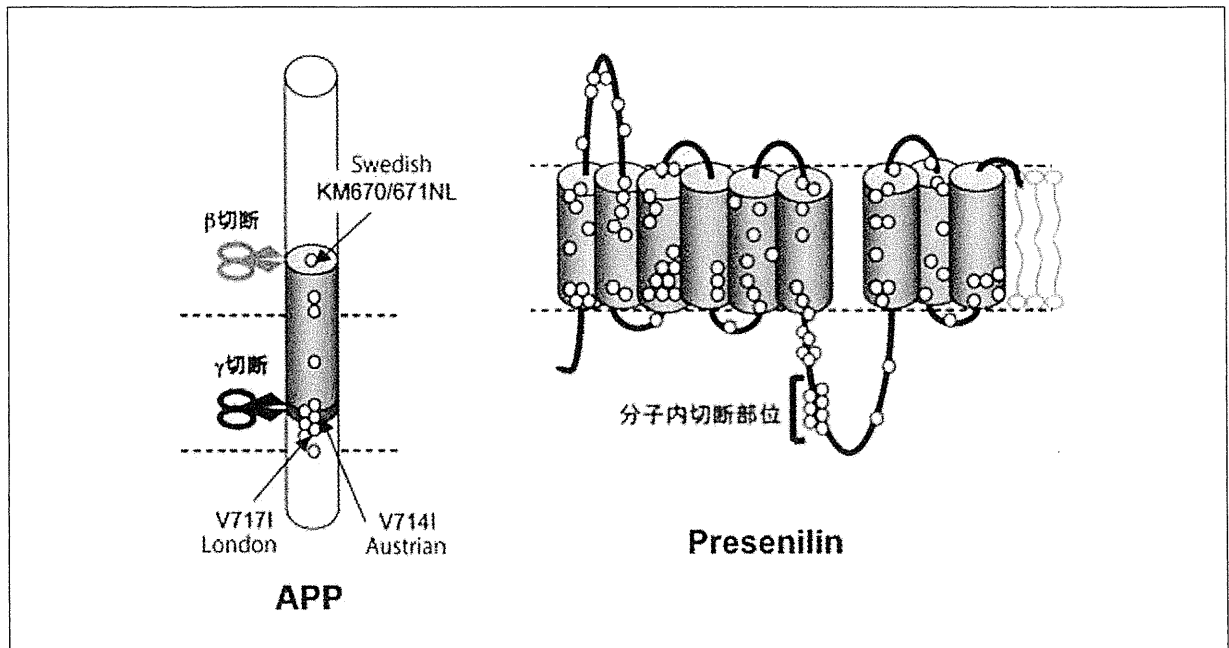


図3 APP (左) とプレセニリン (右) のタンパク質構造



APP は  $\beta$  セクレターゼにより細胞外で切断を受けた後、膜内 (点線で示す) において  $\gamma$  セクレターゼによる切断を受け  $A\beta$  (着色部) を形成する。プレセニリンは 9 回膜貫通構造をとり、活性化に伴い第 6, 7 膜貫通部位間で細胞質側に配向した親水性ループ構造において分子内切断 (endoproteolysis) を受け、N 末端と C 末端の 2 断片に分かれる。家族性 AD に連鎖する APP, PS1/2 の主な変異アミノ酸の位置を  $\circ$  で示す。

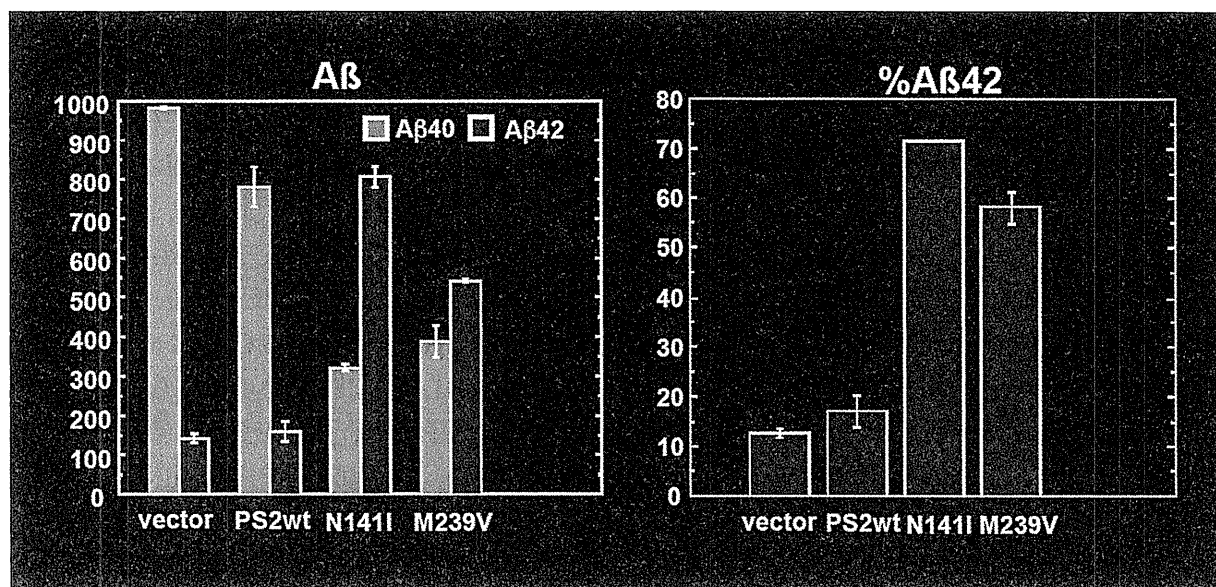
て London 型変異の効果を検証し、予想通り  $A\beta_{42}$  の分泌比率が  $A\beta_{40}$  に比して上昇すること、即ち凝集しやすい  $A\beta_{42}$  の産生亢進を見出した<sup>10)</sup>。同じ予測を抱いた我々も、 $A\beta_{40, 42}$  C 末端特異抗体を用いた免疫組織化学により、本邦の London 型変異 FAD 剖検例においても  $A\beta_{42}$  の蓄積比率が上昇することを確認した<sup>7)</sup>。これらの結果から、APP 変異の AD 発症効果は、 $A\beta$  産生の異常、ことに凝集しやすい  $A\beta_{42}$  分子種の産生増大という現象に収斂することが明らかとなった。後に  $A\beta$  内部配列に変異を有する Tottori 型 (アスパラギン酸 7  $\rightarrow$  アスパラギン)、Arctic 型 (グルタミン酸 22  $\rightarrow$  グリシン) など、FAD 変異には  $A\beta$  の産生ではなく凝集過程を亢進させるものも見出され<sup>17)</sup>、 $A\beta$  の凝集と AD 発症の間のさらに強い因果関係が示された。

しかし、21 番染色体上に位置する APP は、FAD 病因遺伝子の 10% 未満を占めるに過ぎないのに対し、より頻度の高い主要な FAD 遺伝子は 14 番染色体に存在することが示され、

この遺伝子の同定が焦点となった。1995 年、St. George-Hyslop らは presenilin 1 (PS1) 遺伝子を同定<sup>18)</sup>、同年 Schellenberg らは 1 番染色体に相同な PS2 遺伝子を同定した (図 3 右)<sup>19)</sup>。PS1 は 467 アミノ酸、PS2 は 448 アミノ酸からなる 9 回膜貫通タンパク質をコードするが、当初その正常機能は不明であった。我々は、ヨーロッパ由来の Volga German 家系で見出されたアスパラギン 141  $\rightarrow$  イソロイシン変異型 PS2 などを培養細胞に発現し、分泌される  $A\beta_{40, 42}$  を定量したところ、 $A\beta_{42}$  の分泌量・比率の著増を見出した (図 4)<sup>20)</sup>。同時期に FAD 変異型 PS1 の効果を調べた 3 グループも全く同じ効果を報告し、PS1, 2 の変異も APP 変異と同じく、凝集性の高い  $A\beta_{42}$  の産生増大効果を有することが明らかになった<sup>21-23)</sup>。

PS1, 2 の正常機能はその後数年にわたり不明であり、議論が続いた。De Strooper ら<sup>24)</sup>、我々を含む Sisodia ら<sup>25)</sup> のグループは、PS1 ノックアウト細胞では  $\gamma$  セクレターゼ活性が高度に低下し、 $A\beta$  産生が消失することを示した。

図4 FAD 変異型 PS2 を発現した N2a 細胞における A $\beta$ 40 (緑), A $\beta$ 42 (赤) の分泌量 (左) と A $\beta$ 42 分泌比率 (右) (文献<sup>30</sup>より改変引用)



Vector, 野生型 PS2 (PS2wt) 導入細胞では A $\beta$ 42 の比率は 10~20% と不変であるが, FAD 変異 (N141I, M239V) PS2 導入細胞では A $\beta$ 42 の分泌比率は著明に増大する。

また Wolfe らは, PS1 の第 6, 7 膜貫通部位の中央部にはそれぞれ 1 個ずつのアスパラギン酸残基が存在し, いずれか 1 個を別のアミノ酸に置換すると, その変異型 PS1 を発現した細胞は  $\gamma$  セクレターゼ活性を失うことを示し, PS1 が非定型的なアスパラギン酸性プロテアーゼである可能性を示唆した<sup>26)</sup>. しかしこれらの知見は, PS1, 2 が  $\gamma$  セクレターゼそのものであるとの直接の証拠を欠いていた. 2000 年, メルク社の Li らは, 強い  $\gamma$  セクレターゼ阻害作用を示し, 理論的にアスパラギン酸性プロテアーゼの活性中心に結合する遷移状態模倣型プロテアーゼ阻害薬を創製し, 本阻害薬の光親和性プローブが PS1 を標的とすることを見出した<sup>27)</sup>. これにより, PS1 が  $\gamma$  セクレターゼの活性サブユニットであることに決着がついたのである.

我々は, Li たちが直接の証拠を示すまで, PS1 が  $\gamma$  セクレターゼの本体であることには終始懐疑的であった. その主たる理由が「膜内に活性中心のあるプロテアーゼには前例がないため, 信じがたい」という浅薄な先入感であったことは今も悔やまれる. しかし, Li らの導入したケミカルバイオロジー的手法は, 第 6 節

で後述するように, その後の我々の研究ストラテジーに大きな影響を与えることになった.

#### $\gamma$ セクレターゼ複合体の本態と形成過程

PS1/PS2 (以下 PS と総称) が  $\gamma$  セクレターゼの活性中心サブユニットと同定されたが, PS 単独では  $\gamma$  セクレターゼ活性を有さないことも明らかになった. PS を含む 250kDa 以上の分子量を有する複合体が活性を有し, 界面活性剤処理により複合体を解離させると活性が消失し, PS のみを過剰発現しても  $\gamma$  セクレターゼ活性は上昇しないことから,  $\gamma$  セクレターゼは PS 以外のタンパク質性構成因子 (cofactor) を含む高分子量の複合体を形成し, 活性を発揮すると予想された.

$\gamma$  セクレターゼの第 1 の cofactor は, 生化学的解析から同定された. St. George-Hyslop らは,  $\gamma$  セクレターゼ複合体のタンパク質化学的分析より, アミノ酸数 676 個からなる 1 回膜貫通型糖タンパク質 Nicastrin (NCT) を同定した<sup>28)</sup>. Nct 遺伝子の RNAi による発現抑制により  $\gamma$  セクレターゼ活性が低下したことから, NCT は活性に必須な cofactor の 1 つと考えら

れた。しかし、PS と NCT の共発現のみでは活性上昇が見られないため、cofactor はそれ以外にも存在すると考えられた。第2、第3のcofactor は遺伝学を応用したスクリーニングから同定された。PS1 のノックアウト動物は高度の発生異常を呈して胎生致死となるが、これは発生の重要因子 Notch の機能不全によるものであり、 $\gamma$  セクレターゼが Notch の切断を介してその活性化に必須の役割を果たすことが、AD 研究と並行して明らかになっていた。Goutte らは、Notch 機能喪失表現型である咽頭部発生異常を示す変異型線虫の解析から、7 回膜貫通タンパク質をコードする *aph-1* 遺伝子を同定した<sup>29)</sup>。2002 年 Exelixis 社の Curtis らは、線虫の Notch 表現型の増強、抑制を指標とする系統的な遺伝子スクリーニングを行い、PS による  $\gamma$  セクレターゼ機能を活性化する遺伝子 (PS enhancer) として 2 回膜貫通タンパク質をコードする新規遺伝子 *pen-2* を同定した<sup>30)</sup>。ショウジョウバエ S2 細胞において内因性の *aph-1*, *pen-2* を RNAi でノックダウンすると、同時に発現した APP C 末端断片からの  $A\beta$  産生が抑制されるとともに、断片型ショウジョウバエ PS (Psn) も消失することから、両者は  $\gamma$  セクレターゼ複合体の必須因子と考えられた。PS は、ハエ・哺乳類を問わず、活性化過程において分子内切断を受け、断片型 PS は活性型  $\gamma$  セクレターゼに対応する<sup>31)</sup>。しかしこの時点で、NCT, APH-1, PEN-2 の各 cofactor タンパク質が  $\gamma$  セクレターゼ複合体の形成と活性化に果たす個別の役割は不明であり、また PS を含むこれらの 4 因子が  $\gamma$  セクレターゼ活性の発揮に十分か否かも明らかではなかった。

我々は S2 細胞を用いて、 $\gamma$  セクレターゼ複合体の形成・活性化過程を検討した (図5)<sup>32)</sup>。まず、ショウジョウバエ NCT (dNCT) を恒常発現しただけでは内因性に存在する Psn の代謝に変化は生じないが、ショウジョウバエ APH-1 (dAPH-1) を発現した場合、断片型 Psn の量は変わらないのに対し、全長型 Psn が増量した。dAPH-1 と dNCT を共発現した場合、

全長型 Psn はさらに増量した (図5 A)。この全長型 Psn は断片型と同様 250kDa 以上の高分子量複合体を形成しており、高度に安定化されていたが、この両者の共発現のみでは  $\gamma$  セクレターゼ活性は全く増大しなかった (図5 B)。次に我々は、ショウジョウバエ PEN-2 (dPEN-2) を RNAi でノックダウンすると、断片型 Psn が消失すると同時に、dNCT や dAPH-1 を抑制した場合と異なり、全長型 Psn が蓄積してくることに気づいた (図5 C)。この全長型 Psn は、dAPH-1, dNCT 共発現で見られたものと同様に高分子量複合体を形成し、高度に安定化されていた。そして dAPH-1, dNCT に加えて dPEN-2 の三者を共発現することにより、断片型 Psn の増加と  $\gamma$  セクレターゼ活性の増大が確認された (図5 A, B)。これらの結果から、我々は次の結論を導いた (図5 D)。

(1) APH-1 は  $\gamma$  セクレターゼ複合体の主要な安定化因子として作用する。

(2) PEN-2 は  $\gamma$  セクレターゼ複合体の成熟と活性化の最終段階を担い、安定化した PS に  $\gamma$  セクレターゼ活性を与えるとともに、PS の断片化を促す。

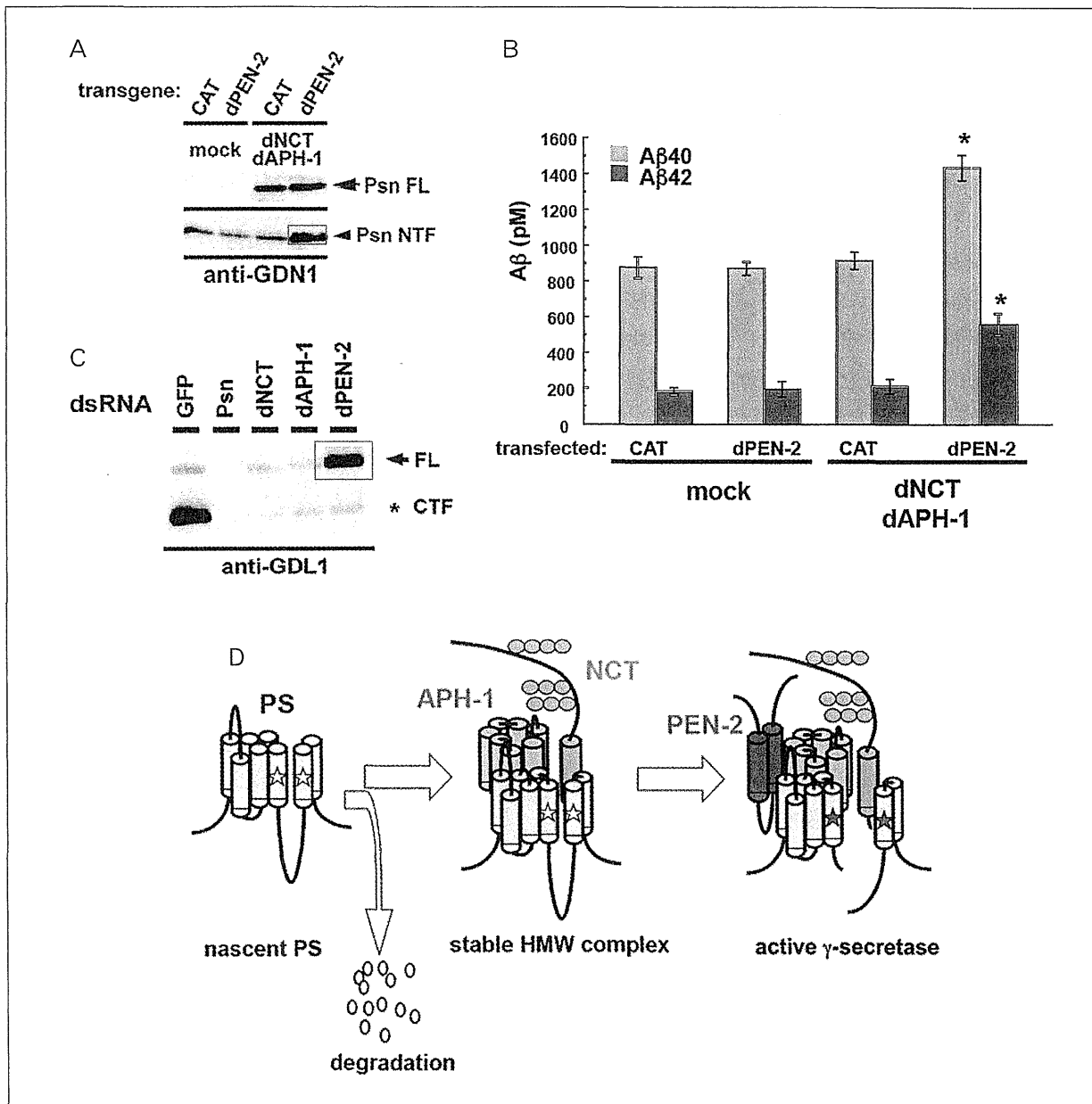
(3) PS, NCT, APH-1, PEN-2 は、 $\gamma$  セクレターゼ複合体の基本骨格を構成する主要な構成因子であり、その活性発揮に十分である。

これらの結果は、その後哺乳類細胞においても確認され、 $\gamma$  セクレターゼは膜内タンパク質複合体を形成し、膜内において加水分解を行う、新しいクラスのプロテアーゼとしても注目を浴びるに至った。

### $\gamma$ セクレターゼ複合体の構造・機能解析

$\gamma$  セクレターゼをはじめとする膜プロテアーゼが脂質二重膜内で基質の膜内配列を加水分解する「膜内タンパク質分解」(intramembrane proteolysis) の理解にあたって、「いかにして疎水性である筈の脂質環境に水分子を持ち込むのか」という根源的な問題が残る。そのメカニズムの解明を可能とする構造情報は、AD 治療薬としての  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬の開発に必

図5  $\gamma$ セクレターゼ複合体の形成過程と活性化



A, B: dAPH-1 と dNCT を恒常的に共発現するショウジョウバエ S2 細胞には全長 Psn (FL) の蓄積が生じる (A: 右から 2 レーン目) が,  $\gamma$  セクレターゼ活性は変化しない (B: 右から 2 組目のカラム). ここに dPEN-2 を発現させると断片型 Psn が増加し (A: 赤囲み),  $\gamma$  セクレターゼ活性も増大する (B: 右端のカラム).

C: ショウジョウバエ S2 細胞に内因性に存在する PS (Psn) および cofactor タンパク質を RNAi でノックダウンすると, いずれの場合にも断片型 Psn (CTF) が消失するが, dPEN-2 ノックダウンの場合のみ全長型 Psn (FL) が蓄積する (赤囲み).

D:  $\gamma$  セクレターゼ複合体の形成過程. 生合成された PS の一部は APH-1 および NCT と結合し, 高度に安定化された高分子量の複合体を形成するが, この時点では PS は断片化を受けていない全長タンパク質の状態が存在し,  $\gamma$  セクレターゼ活性もない (白星で非活性型の Asp 残基を表示). 引き続き PEN-2 が結合することにより  $\gamma$  セクレターゼの活性化が生じ (赤星で活性型の Asp 残基を表示), PS の断片化も生じる (文献<sup>32)</sup>より改変引用).

須である。しかし前節でも論じた通り、 $\gamma$  セクレターゼは複数の膜タンパク質から構成される巨大な膜タンパク質複合体であるため、結晶構造解析などのスタンダードな方法の適用は極めて困難であった。

2006年、我々は $\gamma$  セクレターゼの活性中心サブユニットである PS1 タンパク質について、システインケミストリーを用いた substituted cysteine accessibility method (SCAM 法) により機能・構造解析を行い、PS1 の活性中心アスパラギン酸残基を含む第 6, 7 膜貫通部位が脂質二重膜内に親水性の「活性中心ポア」構造を形成していることを明らかにした (図 6 A)<sup>33)</sup>。まず、PS1 の内因性のシステインを全てセリンに置換した変異体を作製し、これを鋳型に、1 ヶ所だけをシステインに変えた変異体を第 6, 7 膜貫通部位の全アミノ酸配列について作製した。これらを発現する PS1/2 ダブルノックアウトマウス由来の線維芽細胞を樹立し、発現したシステイン変異型 PS1 タンパク質を、チオール基に特異的に反応する MTS 試薬と反応させた。MTS 試薬は親水性環境のみにおいてチオール基と反応するので、システイン導入部位の親水性環境の有無が評価可能となる。このような検討を当該部位の全アミノ酸について進めた結果、脂質二重膜に埋まり、疎水性環境にあると考えられてきた第 6 膜貫通部位の細胞外側、ならびに第 7 膜貫通部位の細胞質側に、それぞれ周期性、連続性を持った親水環境の存在を明らかにすることができた。すなわち、 $\gamma$  セクレターゼは活性サブユニット PS1 の内部に、水分子が通過可能なチャネル様の活性中心ポアを有することが明らかになった (図 6 A)。

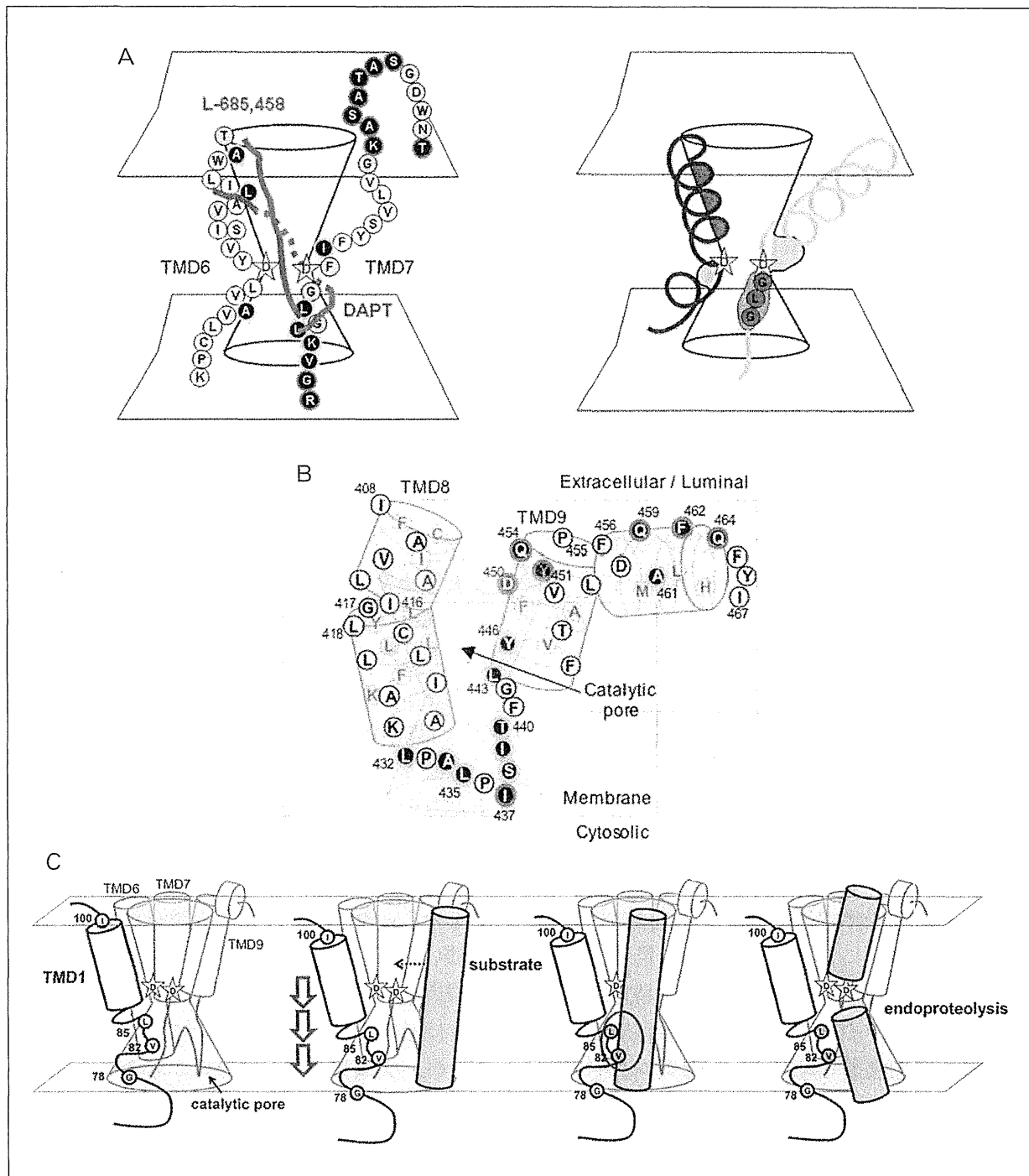
我々は引き続き、PS1 の第 8 膜貫通部位から C 末端までに SCAM 法を適用し、まず PS1 の第 8 膜貫通部位は疎水性環境にあること、それに引き続く PAL モチーフ周辺が親水性環境に存在することを明らかにした。また、第 9 膜貫通部位にシステインを置換した変異体の幾つかが MTS 試薬と反応し、陽性を示す位置が周期性を示したことから、第 9 膜貫通部位は  $\alpha$

ヘリックスを形成し、その一面が活性中心ポアに面していると推定された。次に、各膜貫通部位の間の距離を明らかにするため、PS1 の 2 つの膜貫通部位にそれぞれ 1 個のシステインを置換した変異体を作製し、MTS を両端に持つ架橋剤を用いたクロスリンク実験を行うと、PAL モチーフならびに第 9 膜貫通部位のそれぞれが、活性中心アスパラギン酸を含む第 6 膜貫通部位と近接していることが示された。以上の結果から、PAL モチーフと第 9 膜貫通部位が活性中心ポアの形成に加わるものと考えられた (図 6 B)。

通常、酵素分子内では触媒作用部位と基質結合部位は一致する。しかし従来の酵素学的検討から、 $\gamma$  セクレターゼには基質結合部位と触媒部位が別個に存在し、基質は前者から後者に向かって移動すると予想されてきた。それぞれの部位を阻害すると想定される  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬の存在下で MTS 試薬の結合実験を行った結果、遷移状態模倣型  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬が PAL モチーフと第 9 膜貫通部位の一部に結合し、これらが触媒部位を構成することが示された。また基質模倣型  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬を用いた競合実験から、第 9 膜貫通部位の一部が、側方から基質タンパク質と相互作用しその進入をみちびく「ラテラルゲート」を構成すると想定された。以上の結果から、 $\gamma$  セクレターゼの基質はまず PS1 の第 9 膜貫通部位に結合し、その後 PAL モチーフと第 9 膜貫通部位の一部を含む活性中心ポアに移動し、切断されるというメカニズムが推定された (図 6 B)<sup>34)</sup>。

次に我々は、PS1 の N 末端側の TMD1 を解析した<sup>35)</sup>。SCAM 解析の結果、TMD1 内の幾つかのアミノ酸が、膜内の親水性環境に面していることが分かった。また、様々な長さのクロスリンカーを用いることにより、TMD1 内のアミノ酸と活性中心ポア内のアミノ酸との距離を数 Å レベルで検出したところ、TMD1 は活性中心ポア構造に直接面することが明らかになった。さらに、各種  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬を利用した解析により機能ドメインの同定を試み

図6 SCAM 法によるプレセニン1 活性中心部位の構造解析



A : PS1 第 6, 7 膜貫通部位の SCAM 解析 (左). 親水性を示したアミノ酸残基を黒抜きで表示. 漏斗状の親水性環境である「活性中心ポア」が活性アスパラギン酸残基 (黄色の星 "D" で表示) の周囲に形成される. 右図は第 6 (左: 紫), 第 7 (右: 桃色) 膜貫通部位の模式図. 図下方が細胞質側 (文献<sup>33)</sup> より改変引用).

B : PS1 の第 9 膜貫通部位, 第 8 ~ 9 膜貫通部位間の PAL モチーフにより形成される活性中心ポアに接したラテラルゲート構造の模式図 (文献<sup>34)</sup> より改変引用).

C : PS1 の第 1 膜貫通部位の SCAM 解析により証明された活性中心ポア構造への関与と, 阻害薬を利用した解析から示唆された切断過程におけるピストン様の上下運動.  $\gamma$  セクレターゼ作用中のダイナミックな構造変化が初めて示唆された (文献<sup>35)</sup> より改変引用).

た結果、活性中心ポアに面している TMD1 内のアミノ酸は、活性中心のサブサイト（触媒部位とは異なる基質の結合部位）として機能していることが分かった。興味深いことに、基質切断過程において TMD1 がピストン様の上下運動を営むことが示唆され、 $\gamma$  セクレターゼのダイナミックな構造変化が初めて示された（図 6 C）。

我々が行った PS1 の SCAM 解析の一連の結果は、 $\gamma$  セクレターゼの構造およびその切断様式についての理解を格段に深めた。将来的に  $\gamma$  セクレターゼの結晶構造解析が実現した暁にも、SCAM から推定された構造情報は、脂質二重膜を可溶化しない native な状態で、活性を保った  $\gamma$  セクレターゼの *in situ* の構造を反映する、重要な意義を有すると考えられる。残る第 2～5 膜貫通部位に関する解析を推進し、PS1 の分子全体に関する機能構造情報を取得することを目指してさらに研究を進めている。

#### $\gamma$ セクレターゼの阻害・活性修飾薬による $A\beta$ 降下療法の原理解明

$\gamma$  セクレターゼは、AD の病因タンパク質である  $A\beta$  の産生酵素として、AD のメカニズムに即した疾患修飾療法のよい標的と目された。事実、第 3 節後半で述べたように、 $\gamma$  セクレターゼの本態解明に先立って、製薬企業による低分子スクリーニングが 90 年代より精力的に進められ、活性中心に結合して直接阻害する遷移状態模倣型阻害薬をはじめ、 $\gamma$  セクレターゼ活性を強力に阻害する多数の阻害薬が創出された。しかし第 3 節で述べたように、 $\gamma$  セクレターゼを全般的（非特異的）に抑制した場合、 $A\beta$  産生のみならず、その生理的な基質である Notch の活性化障害が生じ、これは消化管粘膜障害、リンパ球減少、皮膚ガンの発生などの副作用を招くことが、動物実験や近年のヒト臨床治験でも示されている。そのため、 $A\beta$  を抑制し、Notch など他の基質のプロセッシングを障害しない「選択的抑制薬」の開発が待望されてきた。

2001 年 Koo らは、非ステロイド系抗炎症薬

(NSAIDs) が、このような薬理作用を有する「 $\gamma$  セクレターゼ修飾薬」(modulator) として作用することを見出した<sup>30)</sup>。ロツテルダムで行われた疫学研究から、NSAIDs を 24 ヶ月以上服用している場合、AD の相対的発症リスクが 1/5 に低下することが示されていた<sup>37)</sup>。AD 脳では、ミクログリアの活性化、サイトカイン産生の亢進などが慢性的に生じており、「特殊な慢性炎症状態」にあるとの解釈も広く支持されてきた。このため、当初 NSAIDs の抗炎症作用が AD 予防効果の主体と解釈されていた。Koo らは、インドメタシン、スリダクなどの NSAIDs を培養細胞に投与すると、 $A\beta_{42}$  の選択的低下と、これに呼応する形で  $A\beta_{38}$  の分泌亢進が生じ、 $A\beta_{40}$  や Notch の産生には変化が生じないことを見出した<sup>30)</sup>。このような作用を有する薬物は、 $\gamma$  セクレターゼ活性の総体には増減を生じないため、 $\gamma$  セクレターゼ修飾薬 (modulator) と命名された。

しかしながら、NSAIDs の modulator 作用が  $\gamma$  セクレターゼそのものに対する作用か、それとも細胞内における  $\gamma$  セクレターゼやその基質の局在・輸送などに影響を与えるものかは不明であった。我々はこの点を明らかにするため、 $\gamma$  セクレターゼの *in vitro* 再構成系を樹立した。 $\gamma$  セクレターゼ複合体は、先述のように強い界面活性剤で可溶化すると解離し、活性を失うが、0.25% CHAPSO などの温和な条件下では活性を維持したまま可溶化が可能である。ここに、大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として調製した APP C99 ( $\beta$  セクレターゼによる切断後の長さを有し、 $\gamma$  セクレターゼの直接の基質となる断片) を、可溶化条件に注意しながら各種阻害薬と co-incubate することにより、*in vitro* で  $\gamma$  セクレターゼに対する直接作用を検証することが可能である。その結果、スリダクなどの NSAIDs は *in vitro* アッセイによっても細胞レベルと全く同様に、 $A\beta_{42}$  の選択的低下、 $A\beta_{38}$  上昇、 $A\beta_{40}$  産生および Notch 切断は不変という活性修飾プロファイルを呈し、 $\gamma$  セクレターゼ複合体に直接作用し

てその切断選択性に影響を与えることを実証できた<sup>38)</sup>。

次に、 $\gamma$  セクレターゼ修飾薬が何を標的にするのか大きな問題となった。Kukar, Goldeらは、NSAIDsの光感応性誘導体プローブが、 $\gamma$  セクレターゼ複合体の構成因子ではなく、APPのC末端断片 ( $\gamma$  セクレターゼの直接の基質となる C99) を標的として直接結合すると発表した<sup>39)</sup>。もしこれが事実であれば、NSAIDsなどの $\gamma$  セクレターゼ修飾薬が APP/ $A\beta$ 42 に特異的に作用し、Notch など他の基質に影響しない選択性が明快に説明可能となる。しかし NSAIDs およびその誘導体の有効濃度は極めて高く、一方 APP C末端断片中で標的部位と目される膜貫通部位は疎水性が高いことから、これらの結合の特異性には疑問も持たれた。

我々は、代表的な  $\gamma$  セクレターゼ修飾薬 GSM-1 の標的構造の同定に着手した (図7)。GSM-1 はメルク社により開発された  $\gamma$  セクレターゼ修飾薬であり、NSAIDs と共通したカルボキシル基と、フェニルピペリジン構造を有し、培養細胞レベルで IC<sub>50</sub> 300nM 前後の  $A\beta$ 42 抑制作用を示す。我々は東大薬学部天然物合成化学教室の福山・横島らとの共同研究により、GSM-1 に光感応基であるベンゾフェノンと、リンカー構造を介してビオチンを結合した光親和性プローブ GSM-1-BpB を合成した。 $\gamma$  セクレターゼ複合体と反応後、光架橋反応を行い標的分子のラベリングを行った結果、 $\gamma$  セクレターゼ複合体構成成分のうち PS1 のN末端断片が特異的に標識され、APP C末端断片は標識されなかった。また、結合部位同定のためにトロンビン切断配列を膜貫通部位間に挿入した PS1 変異体を用いたラベリング実験により、GSM-1 の結合部位は PS1 のN末端に位置する第1膜貫通部位の細胞外側寄りの部分に存在し、GSM-1 の結合により、それに連続する細胞質寄りの部分にアロステリックな構造変化が生じることにより、 $A\beta$ 42 低下などの修飾作用を及ぼすことが明らかになった<sup>40)</sup>。このように、ケミカルバイオロジー的手法を駆使するこ

とにより、 $\gamma$  セクレターゼの構造と、阻害・修飾薬のメカニズムについて多くの新知見を得つつあり、さらに詳細な検討を進めている。

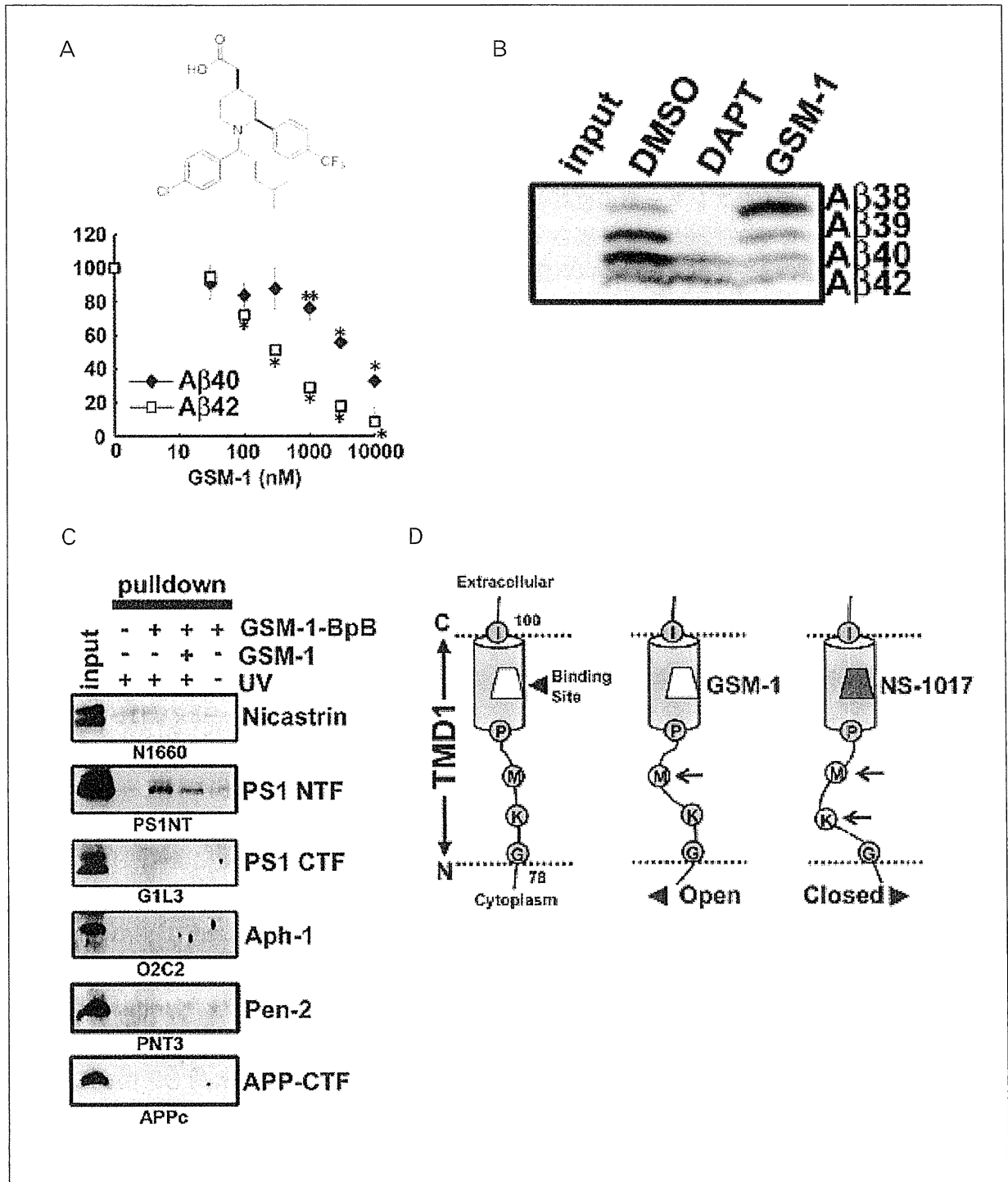
### $\beta$ セクレターゼ (BACE1) を 標的とする治療的アプローチ —低分子による機能調節—

AD に対する  $A\beta$  産生抑制療法の標的としては、 $\gamma$  セクレターゼが先行した。その1つの理由は、低分子化合物のスクリーニングにあたり  $\gamma$  セクレターゼは、膜内のタンパク質複合体が活性中心を有するという複雑な構造にもかかわらず、極めて多くの hit 化合物が得られるのに対し、 $\beta$  セクレターゼは hit が極めて少ないことにあった。APP の膜外部分を切断し、 $A\beta$  のN末端を形成する  $\beta$  セクレターゼは、1999年、遺伝子スクリーニング、生化学的精製など幾つかの方法により、膜結合型アスパラギン酸性プロテアーゼ BACE1 ( $\beta$ -site APP cleaving enzyme-1) として同定された<sup>41)</sup>。BACE1 は1回膜貫通構造を有するが、その細胞外部分に触媒部位を持つ。細胞外部分の結晶構造解析により、触媒ポケットが広く浅い構造を有することが示され、これが低分子スクリーニングにおいて fit する化合物が少ないことの一因と解釈された。BACE1 は  $A\beta$  産生の律速段階となる最初の切断を担うこと、また  $\gamma$  セクレターゼ構成因子のノックアウトはいずれも Notch 表現型による高度の発生異常を示し胎生致死である (即ち  $\gamma$  セクレターゼの高度の抑制は分化障害の副作用を免れない) のに対し、BACE1 のノックアウトマウスは軽度のミエリン異常など以外には顕著な表現型を示さず生存することからも、BACE1 は  $A\beta$  降下療法のよい標的と考えられた。

我々は、 $A\beta$  産生に影響を与える遺伝子の RNAi スクリーニングから、スフィンゴ脂質の1つスフィンゴシン1リン酸 (S1P) が  $\beta$  セクレターゼの活性化因子として働くことを見出した (図8A)<sup>42)</sup>。S1P は、スフィンゴシンリン酸化酵素1 (sphingosine kinase : SphK1) も



図7  $\gamma$  セクレターゼ修飾薬 GSM-1 の標的特定と作用機序解析



A : GSM-1 の構造と Aβ42 優位の Aβ 分泌抑制。  
 B : GSM-1 の Aβ42 低下, Aβ38 上昇性  $\gamma$  セクレターゼ修飾薬作用 (urea-SDS gel を用いたイムノプロットによる超高感度分離)。  
 C : GSM-1 光親和性プローブを用いた標的分子探索。PS1 N末端断片 (NTF) のみに特異的ラベリングが観察され, ラベリングは非標識 GSM-1 の存在により顕著に減弱する。基質である APP-CTF にはラベリングは生じない。  
 D : GSM-1 結合サイトは PS1 第1膜貫通部位の細胞外寄りに存在し, GSM-1 の結合により細胞内寄りの部分がアロステリックに構造変化を生じ, モジュレータ作用を発揮するものと考えられる。

しくは SphK2 が、セラミドの代謝物であるスフィンゴシンをリン酸化することにより産生される。SphK の RNAi ノックダウン、あるいは低分子阻害薬である SKI-II の適用により、 $\beta$  セクレターゼ活性ならびに  $A\beta$  産生は低下し、逆に S1P 分解酵素のノックダウン、薬物による阻害は  $\beta$  セクレターゼ活性と  $A\beta$  産生を上昇させた。S1P は G タンパク質結合型受容体を介してシグナル伝達に関与する以外に、細胞膜や細胞質において直接作用することも知られている。細胞外から S1P を投与した場合には  $\beta$  セクレターゼに対する作用は観察されないことから、この作用は後者のメカニズムによるものと推定された。また、S1P は触媒サブユニットを有する BACE1 の細胞外部分のリコンビナントタンパク質の  $\beta$  セクレターゼ活性には影響を与えないこと、膜貫通部位を有する全長 BACE1 に対し *in vitro* で結合し活性抑制作用を示すことから、膜貫通部位に作用してアロステリックな機序により BACE1 の酵素活性を亢進させるものと考えられた。S1P 関連化合物には、S1P 受容体アンタゴニスト FTY720 のように免疫調整薬として臨床応用が検討されているものもあり、新機軸の AD 治療標的として注目される。

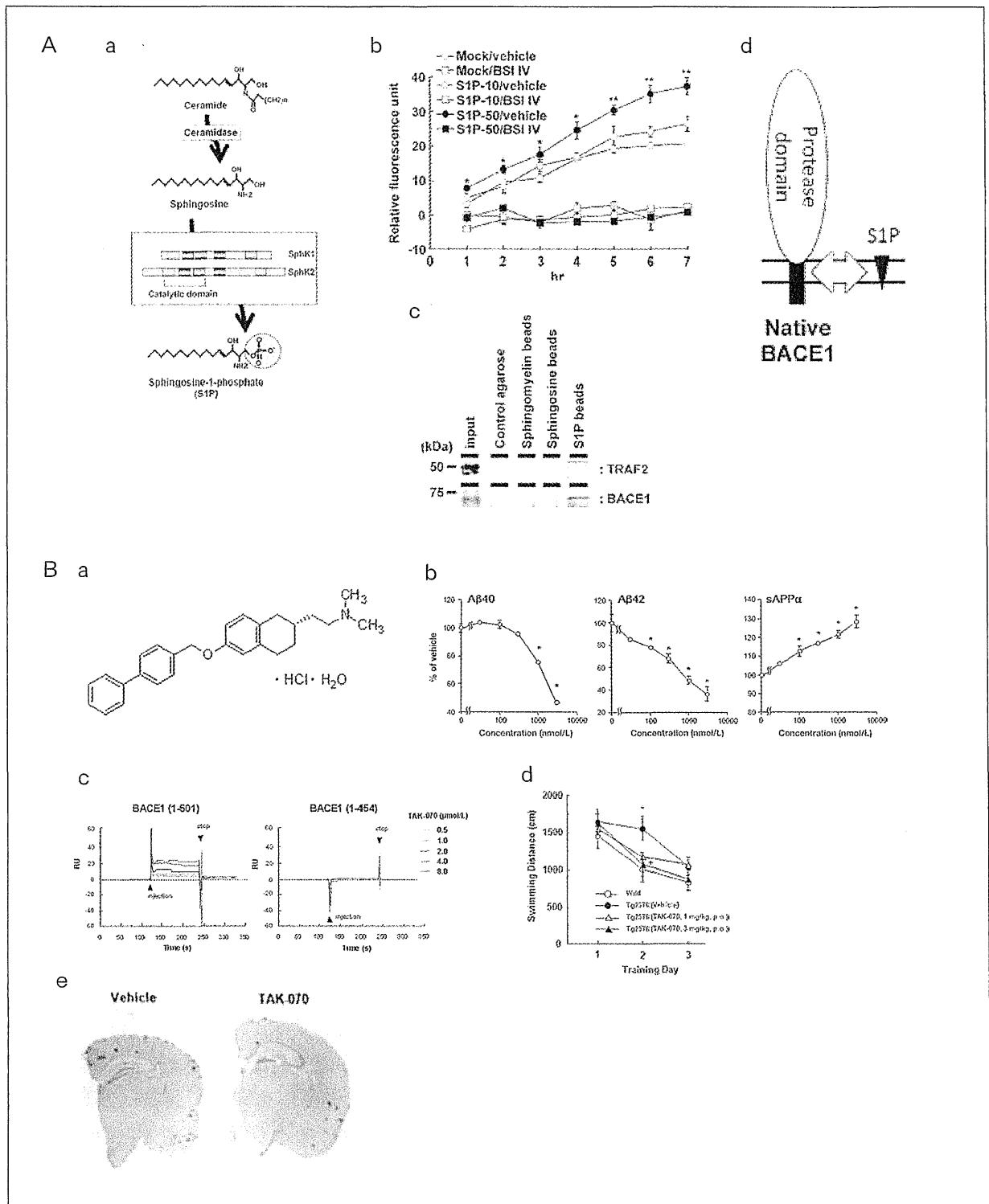
一方、低分子化合物のスクリーニングからも、類縁の機序の想定されるユニークな BACE1 阻害薬が開発された。武田薬品工業の福元らは我々との共同研究により、非競合型の BACE1 阻害能を示す低分子化合物 TAK-070 を創出した (図 8 B)<sup>43)</sup>。TAK-070 は、培養細胞を用いた  $A\beta$  分泌を指標とするスクリーニングにより同定され、細胞レベルで submicromolar の濃度で 30% 前後の  $A\beta$  降下作用を有する。In vivo での脳到達性も高く、げっ歯類 AD モデル動物への経口投与によっても同等の  $A\beta$  産生抑制が得られ、長期投与では脳内  $A\beta$  蓄積に 60% 前後の抑制が得られる。TAK-070 も、BACE1 の細胞外部分の有する  $\beta$  セクレターゼ活性には影響を与えず、膜貫通部分を有する全長分子の酵素活性を抑制すること、ならびに表面プラ

スモン反応を用いた結合部位解析の結果から、膜貫通部位に作用して、アロステリックな機序により BACE1 活性を抑制するものと考えられた。近年、BACE1 の触媒部位に直接作用する、薬理作用の強い BACE1 阻害薬が開発されつつあるが、TAK-070 はげっ歯類 AD モデル [APP トランスジェニック (Tg) マウス、老齢ラット] において行動改善作用を示すことから、ユニークな AD 治療薬としてその臨床応用に期待が持たれる。

### $A\beta$ 免疫療法のメカニズム — シンク仮説の検証 —

$\beta$ ,  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬が  $A\beta$  を産生レベルで抑制するのに対し、 $A\beta$  の脳実質からの除去 (クリアランス) 促進を介して、産生・蓄積後の  $A\beta$  を制御しようとするのが  $A\beta$  免疫療法である。 $A\beta$  免疫療法の嚆矢は、1999 年 Elan 社の Schenk らによる  $A\beta$  ワクチン療法の開発に遡る<sup>44)</sup>。彼らは、APP を神経細胞に過剰発現する Tg マウスの皮下に  $A\beta$  (1-42) ペプチドをアジュバントとともに能動免疫することにより、血中抗  $A\beta$  抗体の産生を介して脳における  $A\beta$  の蓄積を劇的に減少させることに成功した。ただちにヒトで  $A\beta$  ワクチン療法の臨床治験が行われたが、一部に Th1 刺激に起因する自己免疫性脳炎が生じたため、開発戦略は治療効果を有したと考えられる抗  $A\beta$  抗体の末梢投与 (受動免疫) に移行した。Schenk たちの能動免疫では、 $A\beta$  の N 末端に対する抗体が生じ、抗体の一部が脳内に進入し蓄積  $A\beta$  に結合、Fc 受容体を介して貪食除去を促進すると考えられている。これに対し、DeMattos, Holtzman らは、抗  $A\beta$  抗体は主として血中で作用し、脳実質から  $A\beta$  を「引き抜く」ことにより脳  $A\beta$  蓄積を減少させ、治療効果を有するとの仮説 (シンク仮説) を提唱した<sup>45)</sup>。その根拠となったのは、可溶性  $A\beta$  の中間部分を認識するモノクローナル抗体 266 を APP Tg マウスに全身投与した場合に観察される次の変化であった。急性投与に引き続いて、① 血中  $A\beta$  が

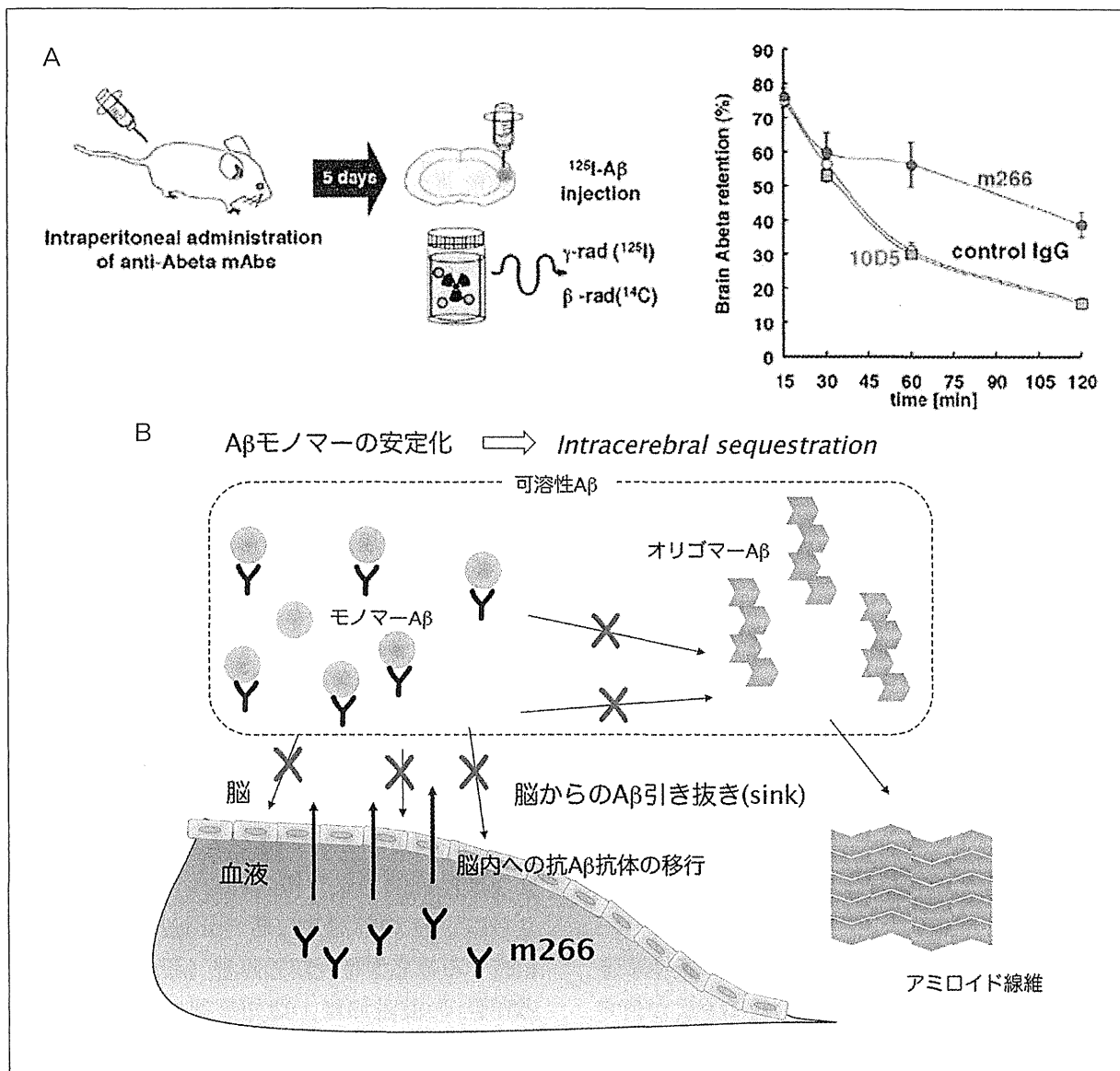
図8 BACE1 活性の修飾薬, 阻害薬の機能解析



A: スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の BACE1 に対する作用. a: S1P の生合成過程. b: S1P は濃度依存性に BACE1 活性を亢進させる. authentic な BACE1 阻害薬 BSI IV により S1P の BACE1 活性亢進作用は遮断される. c: S1P は BACE1 を特異的に結合するが, スフィンゴシン, スフィンゴミエリンは結合しない. d: S1P は恐らく膜内で BACE1 の活性部位以外の部分と結合する (文献<sup>42)</sup> より引用).

B: BACE1 阻害薬 TAK-070 (a は構造) の薬効. b: IMR32 細胞における Aβ 分泌抑制. c: ピアコア解析により BACE1 結合部位は膜貫通部位と示唆. Tg2576 マウスにおける Morris 水迷路試験の改善 (d) とアミロイド蓄積の改善 (e) (文献<sup>43)</sup> より引用).

図9 Aβ免疫療法の作用機序に関する解析



A: A $\beta$ 免疫療法のメカニズム. マウス脳内に注入された  $^{125}\text{I}$  放射標識 A $\beta$ (1-40) は, 半減期約 30 分で急速に脳外に排出される (control IgG). 予めモノクローナル抗体 266 を腹腔内に投与しておく, シンク効果で予測される動きとは逆に, この排出過程は顕著に遅延する (赤丸).

B: モノクローナル抗体 266 の作用機序. 本抗体は“シンク仮説”で仮想されたメカニズムとは異なり, 血液中で作用するのではなく, 脳実質に移行し, モノマー A $\beta$  を結合, 安定化することにより, オリゴマーやアミロイド線維形成から隔離し, 治療効果を発揮するものと考えられる (文献<sup>47)</sup>より改変引用).

数千倍に急速に上昇し, ② 24 時間以内に行動障害が改善, ③ 慢性投与により脳 A $\beta$  蓄積が減少する. また, 細胞表面に存在するマルチリガンド受容体である LRP-1 を介して, 脳内に投与した  $^{125}\text{I}$  標識 A $\beta$  が血液中に急速に排出されるとの Zlokovic らの説も, シンク仮説を支持するものであった<sup>46)</sup>.

我々は, 抗 A $\beta$  抗体を用いた受動免疫により

シンク効果, 即ち, 脳からの A $\beta$  の排出速度の急性上昇が生じるか否かを検証し, 結果的に, シンク効果を生じると考えられてきた代表的なモノクローナル抗体 266 が, 実は脳内に進入して治療効果を生じていることを証明した (図 9)<sup>47)</sup>. その根拠となった結果は次のとおりである.

(1) マウス脳内に注入された  $^{125}\text{I}$  放射標識

A $\beta$ (1-40) は半減期約 30 分で急速に脳外に排出される。

(2) 予めモノクローナル抗体 266 を腹腔内に投与しておく、シンク効果で予測される動きとは逆に、この排出過程は顕著に遅延する。

(3) このとき抗体に結合した A $\beta$  が脳内で増加していることから、266 抗体が脳内に進入し A $\beta$  に結合、排出を遅延させたものと考えられる。

(4) 脳内に A $\beta$  が大量に産生される APP Tg マウスの腹腔内に 266 抗体を投与すると、脳内の総 A $\beta$  量は変化しないが、可溶・単量体型の A $\beta$  に抗体が結合した複合体が選択的に増加する。AD 脳では、可溶・単量体型で産生された A $\beta$  が、障害性の高いオリゴマーを経てアミロイドとして蓄積するものと考えられている。我々の結果は、266 抗体は従来考えられてきたとは異なり、末梢血液中で作用するのではなく、脳内に進入して可溶・単量体型の A $\beta$  に結合、これをオリゴマーやアミロイド等の多量体の形成過程から隔離し、阻害するという新規の作用メカニズムにより治療効果を発揮することを強く示唆した。現在、ヒト化された 266 抗体は solanezumab として、イーライ・リリー社によりグローバル第Ⅲ相臨床試験の最中にある。血中のイムノグロブリンの約 0.1% が何らかの機序により脳内に移行するものと認識されるようになり、A $\beta$  以外に BACE1 なども抗体治療の標的と目されるようになった<sup>49)</sup>。今後、脳内への抗体の delivery を様々な手法により改善することにより、AD をはじめとする神経変性疾患における脳内異常タンパク質凝集を防止する治療法がさらに refine されてゆくものと期待される。

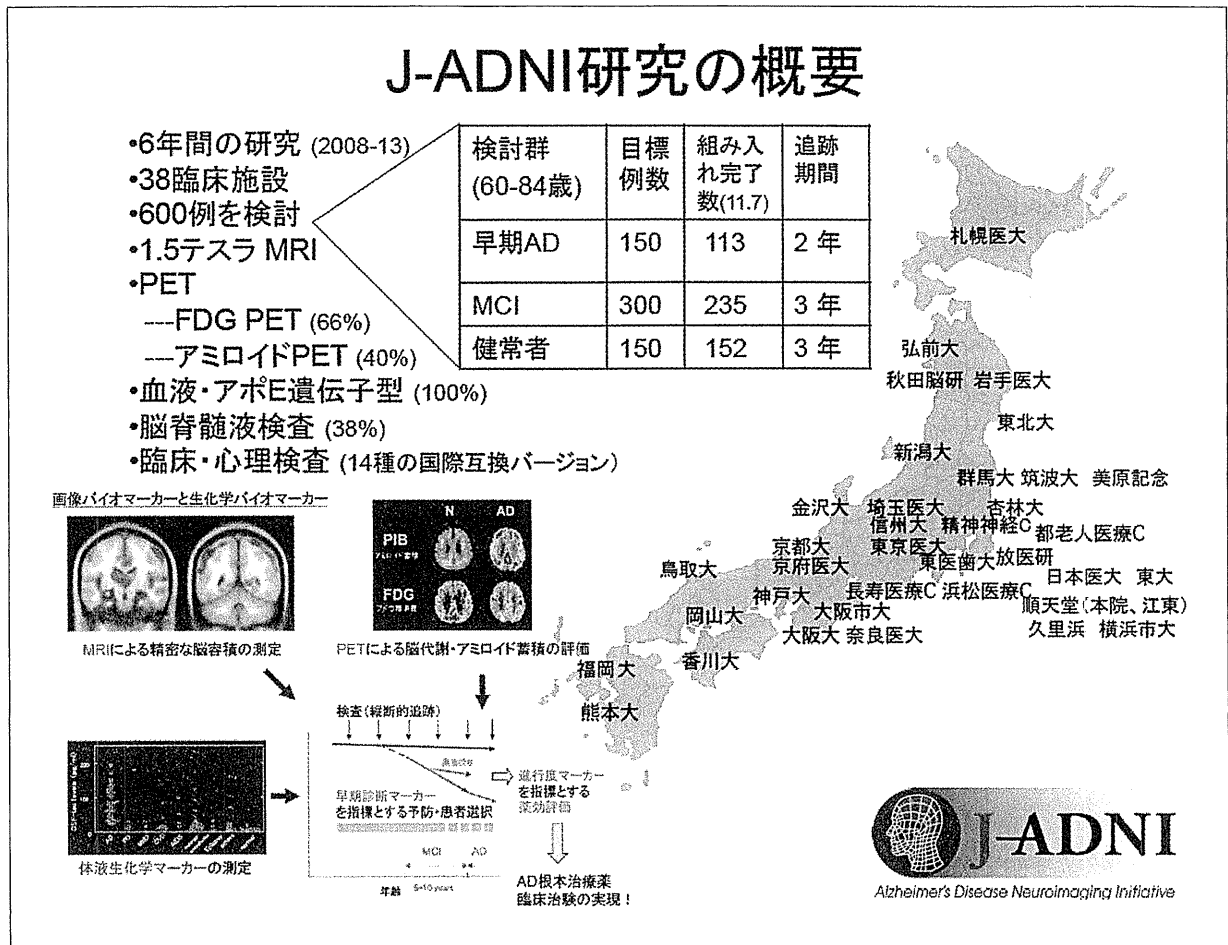
#### AD 疾患修飾療法実用化への道程 —ADNI/J-ADNI 臨床研究による 画像・バイオマーカーの開発—

前節までに述べたように、過去四半世紀の間に AD の発症メカニズムが詳細に解明され、特に A $\beta$  を標的とする治療法についてはグロー

バル臨床試験も開始されている。しかし現時点では、AD の臨床試験は臨床症候・認知機能をエンドポイントとして、認知症の発症後（臨床的 AD 期）に施行する以外の方策はない。このような従来型方式の試験により開発された疾患修飾薬の代表は、第 1 世代  $\gamma$  セクレターゼ阻害薬 semagacestat である。しかし本薬はエンドポイントを満たさず、2010 年夏に試験が中止になったことは記憶に新しい<sup>49)</sup>。疾患修飾薬は症候改善薬とは異なり、変性過程=神経細胞死の進行速度を軽減することがその主要効果であるため、症候改善は遅れて出現し、最長 2 年内外の試験期間中に効果を見極められないおそれもある。また、認知機能検査の結果は様々な要因により検査・個人ごとに大きな動揺を示すため、薬効の統計学的有意性を検証するためには試験のサイズは歴大にならざるを得ない。また疾患修飾薬が AD の試験において有効性を現しにくい一因として、既に認知症を発症した段階では、細胞死、タウ蓄積などの神経細胞病変が相当度に進展しているため、AD 病理の上流で原因因子として働く A $\beta$  を抑制しても十分な進展抑制効果が得られない可能性もある。さらに AD の前認知症期 (prodromal AD) に相当する健忘型軽度認知障害 (amnestic MCI: aMCI) の段階では、認知症期に比して進行速度が緩徐であるため、早期段階ほど改善をとらせることは困難となる。このような状況で、aMCI や、それに先行する“preclinical AD”期の進行抑制効果を的確に検出するには、初期臨床症状の鋭敏な検査法とともに、進行度マーカー、発症予測マーカーとして利用可能な画像・体液バイオマーカーを確立することが急務である。

この目的をもって、米国 (2005 年)<sup>50)</sup>において開始された大規模臨床観察研究が、AD Neuroimaging Initiative (ADNI) である。ついで筆者を主任研究者として、2007 年 Japanese (J-) ADNI が開始された<sup>51)</sup>。J-ADNI では、全国 38 の代表的 AD 臨床施設が、全 600 例の aMCI (300 例)、早期 AD (150 例)、対照健常

図10 J-ADNI の概要



J-ADNI のプロトコル, コンセプトと参加サイトの一覧を示す。

高齢者 (150 例) をリクルートする。6~12 ヶ月ごとに 1.5 テスラ構造的 MRI による脳容積, フルオロデオキシグルコース PET による脳代謝, アミロイド PET による脳アミロイド病理, 脳脊髄液の  $A\beta(1-42)$  とタウを検査すると同時に, 14 種の国際標準化された臨床・認知機能検査を行うとともに, apoE 遺伝子などの遺伝学的検討も行う (図 10)。これにより, AD の進行過程における臨床的な認知症の発症前後の時期の natural history を詳細に記載するとともに, MCI から認知症 (臨床的 AD) への進展 (コンバージョン) を予測する指標, ならびに脳病理進行速度の指標などを見出すことを目的としている。J-ADNI は 2011 年 11 月現在 526 例の組み入れを完了し, 現在も縦断観察研究を続行中であるが, 興味深い中間的結果が得られつつある。平成 23 年 11 月の日本認

知症学会シンポジウム「J-ADNI の現況」において, 筆者および専門コア PI より報告された概要を述べる。

(1) aMCI の認知症への年間コンバート率は二十数パーセントに達する見込みである。この数値は米国 ADNI の 16.1%/年に比してやや高い。原因としては, J-ADNI でリクルートされた aMCI が AD 背景病理を有する率が高く, 進行の速い症例を多く含む可能性, 日米の臨床家による認知症コンバージョンの臨床判定に微妙な違いが存在する可能性などが想定される。

(2) アミロイド PET 陽性率は AD 93%, MCI 67%, 健常高齢者 24%。この数値は脳脊髄液  $A\beta(1-42)$  の低値から推定される脳アミロイド蓄積 (AD 94%, MCI 70%, 健常高齢者 23%) とよく一致しており, 両検査がともに行われた 45 例においては, PIB と  $A\beta(1-42)$  の

動きはほぼ完全に一致した。

(3) ADの発症リスク多型である apoE 遺伝子の  $\epsilon 4$  アレル頻度は AD で 63.7% (米国 ADNI 65.6%, 以下同様), MCI で 52.7% (53.5%), 健常群 24.7% (26.6%) と, 米国とはほぼ同等である。 $\epsilon 4$  アレル陽性, 陰性群における  $^{11}\text{C}$ -PIB アミロイド PET 陽性率は AD では 100% ( $\epsilon 4$  陽性), 80% ( $\epsilon 4$  陰性, 以下同様), MCI では 100%, 50%, 健常群では 60%, 7% であり,  $\epsilon 4$  アレルはアミロイド蓄積の強力なリスク因子となっている。これらの結果は, aMCI が prodromal AD 例を多く含むこと, 健常高齢者の 20% 強がアミロイド陽性の “preclinical AD”<sup>52)</sup> に該当することなど, 本邦と欧米の間で極めて高い共通性が存在することを実証するものである。今後の日米 ADNI 研究の進展により, 画像・バイオマーカーを臨床指標と組み合わせた精密な疾患修飾薬の治験が可能となり, その実用化が促進されるものと期待される。

## 結 語

### —AD の先制医療を目指して—

本論文においては, 我々の AD 分子病態研究の歩みを, 主に  $A\beta$  の産生系に焦点をあてて概観したのち, 病態メカニズムに根ざした AD 疾患修飾療法の開発と, 画像・バイオマーカーを用いた臨床研究により治験の成功を目指す ADNI/J-ADNI の活動についても言及した。今後の AD 治療のスペクトラムは, MCI (prodromal AD) における進行遅延, さらにアミロイド陽性無症候者 (preclinical AD)<sup>52)</sup> における発症・進展防止を主眼とする真の意味での「先制医療」まで, 急速に広がりつつある。このような「超早期治療」を近未来に実行する場合, 従来の概念では健常者に属する被験者に, 安全性と効能が完全に証明されていない新薬を長期投与するという障壁が生じる。これを可能とするためには, 長期投与における安全性と, メカニズムに基づく優れた薬効が保証された薬剤を, 製薬企業とアカデミック, そして社会が一体となって育てる体制が必要となろう。

生活習慣病の治療が心・脳血管イベントの発症率を下げることが実証され, 先制医療の魁として内科療法の主流の位置を占めるに至ったように, AD においても  $A\beta$  をはじめとする病因因子を無症候段階より制御することが可能となり, 認知症の発症回避により健康長寿が達成される日の遠からぬことを心より祈念しつつ, 擲筆いたします。

## 謝 辞

本論文において記述した AD の分子病態に関する基礎研究の成果の全ては, 東京大学大学院薬学系研究科臨床薬学教室, 同 大学院医学系研究科神経病理学分野のスタッフ・大学院生・学生の皆さんとの共同研究によるものであり, 各員に深く感謝致します。特に SCAM 法による  $\gamma$  セクレターゼの構造解析は佐藤千尋博士, 高木穂香修士,  $\gamma$  セクレターゼ修飾薬の作用標的に関する研究は大木 優修士ならびに低分子プローブの合成を行って頂いた福山 透教授, 横島 聡准教授, S1P と BACE1 に関する研究は高杉展正博士, TAK-070 に関する研究は福元宏明博士, そして  $A\beta$  免疫療法に関する研究は橋本唯史博士, 山田 薫博士, 矢吹千織修士のそれぞれ多大な尽力によるものであり, 改めて御礼申し上げます。J-ADNI 臨床研究は現在も進行中ですが, その推進に多大な精力を傾注されている臨床コアの朝田 隆教授, 荒井啓行教授, 心理コアの杉下守弘教授, MRI コアの松田博史教授, PET コアの伊藤健吾部長, 千田道雄副所長, 石井賢二先生, 生化学コアの桑野良三教授, 病理学コアの村山繁雄博士, 全国 38 臨床サイトの医師, コーディネータ, 心理士, 技師, そして献身的にご参加下さっている被験者の皆さまに, 心より感謝を申し上げます。

## 文 献

- 1) Alzheimer A: Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg Z Psychiat Psych-Gerichtl Med 64: 146-148, 1907.
- 2) Iwatsubo T: Amyloid deposits and plaque formation. Neurodegenerative Dementias (Edited

- by Christopher M. Clark and John Q. Trojanowski, p147–156. McGraw–Hill, 2000.
- 3) Hardy J, Selkoe DJ: The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297: 353–356, 2002.
  - 4) Glenner GG, Wong CW: Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun* 120: 885–890, 1984.
  - 5) Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K: Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 4245–4249, 1985.
  - 6) Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr: The carboxy terminus of the  $\beta$  amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32: 4693–4697, 1993.
  - 7) Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y: Visualization of  $A\beta_{42(43)}$  and  $A\beta_{40}$  in senile plaques with end-specific  $A\beta$ -monoclonals: Evidence that an initially deposited species is  $A\beta_{42(43)}$ . *Neuron* 13: 45–53, 1994.
  - 8) Iwatsubo T, Mann DMA, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y: Amyloid  $\beta$  protein ( $A\beta$ ) deposition:  $A\beta_{42(43)}$  precedes  $A\beta_{40}$  in Down syndrome. *Ann Neurol* 37: 294–299, 1995.
  - 9) Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Ihara Y, Shimada H, Kawashima S: Dominant and differential deposition of distinct  $\beta$ -amyloid peptide species,  $A\beta_{N3}$  (pE), in senile plaques. *Neuron* 14: 457–466, 1995.
  - 10) Iwatsubo T, Saido TC, Mann DMA, Lee VM-Y, Trojanowski JQ: Full-length amyloid- $\beta$  (1–42(43)) as well as amino-terminally modified and truncated amyloid- $\beta_{42(43)}$  deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol* 149: 1823–1830, 1996.
  - 11) Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B: The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325: 733–736, 1987.
  - 12) Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L: Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349: 704–706, 1991.
  - 13) Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L: A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of  $\beta$ -amyloid. *Nat Genet* 1: 345–347, 1992.
  - 14) Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ: Mutation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases  $\beta$ -protein production. *Nature* 360: 672–674, 1992.
  - 15) Cai XD, Golde TE, Younkin SG: Release of excess amyloid  $\beta$  protein from a mutant amyloid  $\beta$  protein precursor. *Science* 259: 514–516, 1993.
  - 16) Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG: An increased percentage of long amyloid  $\beta$  protein secreted by familial amyloid  $\beta$  protein precursor ( $\beta$ APP717) mutants. *Science* 264: 1336–1340, 1994.
  - 17) Hori Y, Hashimoto T, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K, Condrón MM, Tsubuki S, Saido TC, Teplow DB, Iwatsubo T: The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer's disease mutations accelerate  $A\beta$  fibril formation without increasing protofibril formation. *J Biol Chem* 282: 4916–4923, 2007.
  - 18) Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin J-F, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St



- George-Hyslop PH: Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375: 754-760, 1995.
- 19) Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K: Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 269: 973-977, 1995.
  - 20) Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhira S, Capell A, Walter J, Gruenberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K: The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid  $\beta$  protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2025-2030, 1997.
  - 21) Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S: Increased amyloid- $\beta$ 42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383: 710-713, 1996.
  - 22) Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yager D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS: Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate A $\beta$ 1-42/1-40 ratio *in vitro* and *in vivo*. *Neuron* 17: 1005-1013, 1996.
  - 23) Citron M, Westaway D, Xia W, Carlson G, Diehl T, Levesque G, Johnson-Wood K, Lee M, Seubert P, Davis A, Kholodenko D, Motter R, Sherrington R, Perry B, Yao H, Strome R, Lieberburg I, Rommens J, Kim S, Schenk D, Fraser P, St George Hyslop P, Selkoe DJ: Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid  $\beta$ -protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med* 3: 67-72, 1997.
  - 24) De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F: Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391: 387-390, 1998.
  - 25) Naruse S, Thinakaran G, Luo J-J, Kusiak JW, Tomita T, Iwatsubo T, Qian X, Ginty, DD, Price, DL, Borchelt DR, Wong PC, Sisodia SS: Effects of PS1 deficiency on membrane protein trafficking in neurons. *Neuron* 17: 1213-1221, 1998.
  - 26) Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ: Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* 398: 513-517, 1999.
  - 27) Li YM, Xu M, Lai MT, Huang Q, Castro JL, DiMuzio-Mower J, Harrison T, Lellis C, Nadin A, Neduvetil JG, Register RB, Sardana MK, Shearman MS, Smith AL, Shi XP, Yin KC, Shafer JA, Gardell SJ: Photoactivated  $\gamma$ -secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* 405: 689-694, 2000.
  - 28) Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L, Tandon A, Song YQ, Rogaeva E, Chen F, Kawarai T, Supala A, Levesque L, Yu H, Yang DS, Holmes E, Milman P, Liang Y, Zhang DM, Xu DH, Sato C, Rogaev E, Smith M, Janus C, Zhang Y, Aebersold R, Farrer LS, Sorbi S, Bruni A, Fraser P, St George-Hyslop P: Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and  $\beta$ APP processing. *Nature* 407: 48-54, 2000.
  - 29) Gouette C, Tsunozaki M, Hale VA, Priess JR: APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 775-779, 2002.
  - 30) Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M, Apfeld J, Nicoll M, Maxwell M, Hai B, Ellis MC, Parks AL, Xu W, Li J, Gurney M, Myers RL, Himes CS, Hiesch R, Ruble C, Nye JS, Curtis D: Aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling,  $\gamma$ -secretase cleavage of  $\beta$ APP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3: 85-97, 2002.
  - 31) Takasugi N, Takahashi Y, Morohashi Y, Tomita T, Iwatsubo T: The mechanism of  $\gamma$ -secretase

- activities through high molecular weight complex formation of presenilins is conserved in *Drosophila melanogaster* and mammals. *J Biol Chem* 277: 50198–50205, 2002.
- 32) Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran, G, Iwatsubo T: The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex. *Nature* 422: 438–441, 2003.
- 33) Sato C, Morohashi Y, Tomita T, Iwatsubo T: Structure of the catalytic pore of  $\gamma$ -secretase probed by the accessibility of substituted cysteines. *J Neurosci* 26: 12081–12088, 2006.
- 34) Sato C, Takagi S, Tomita T, Iwatsubo T: The C-terminal PAL motif and transmembrane domain 9 of presenilin 1 are involved in the formation of the catalytic pore of the  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci* 28: 6264–6271, 2008.
- 35) Takagi S, Tominaga A, Sato C, Tomita T, Iwatsubo T: Participation of transmembrane domain 1 of presenilin 1 in the catalytic pore structure of the  $\gamma$ -secretase. *J Neurosci* 30: 15943–15950, 2010.
- 36) Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH: A subset of NSAIDs lower amyloidogenic  $A\beta_{42}$  independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414: 212–216, 2001.
- 37) in t’Veld BA, Ruitenbergh A, Hofman A, Launer LJ, van Duijn CM, Stijnen T, Breteler MM, Stricker BH: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer’s disease. *N Engl J Med* 345: 1515–1521, 2001.
- 38) Takahashi Y, Hayashi I, Tominari Y, Rikimaru K, Morohashi Y, Kan T, Natsugari H, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Sulindac sulfide is a non-competitive  $\gamma$ -secretase inhibitor that preferentially reduces  $A\beta_{42}$  generation. *J Biol Chem* 278: 18664–18670, 2003.
- 39) Kukar TL, Ladd TB, Bann MA, Fraering PC, Narlawar R, Maharvi GM, Healy B, Chapman R, Welzel AT, Price RW, Moore B, Rangachari V, Cusack B, Eriksen J, Jansen-West K, Verbeeck C, Yager D, Eckman C, Ye W, Sagi S, Cottrell BA, Torpey J, Rosenberry TL, Fauq A, Wolfe MS, Schmidt B, Walsh DM, Koo EH, Golde TE: Substrate-targeting  $\gamma$ -secretasemodulators. *Nature* 453: 925–929, 2008.
- 40) Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T: Phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J* 30: 4815–4824, 2011.
- 41) Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M:  $\beta$ -secretase cleavage of Alzheimer’s amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735–741, 1999.
- 42) Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VM, Trojanowski JQ, Tomita T, Iwatsubo T: BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci* 31: 6850–6857, 2011.
- 43) 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 non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 ameliorates  $A\beta$  pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer’s disease. *J Neurosci* 30: 11157–11166, 2010.
- 44) Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandever C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P: Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400: 173–177, 1999.
- 45) DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM: Peripheral anti-

- $A\beta$  antibody alters CNS and plasma  $A\beta$  clearance and decreases brain  $A\beta$  burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8850-8855, 2001.
- 46) Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B, Holtzman DM, Miller CA, Strickland DK, Ghiso J, Zlokovic BV: Clearance of Alzheimer's amyloid- $\beta$  (1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106: 1489-1499, 2000.
- 47) Yamada K, Yabuki C, Seubert P, Schenk D, Hori Y, Ohtsuki S, Terasaki T, Hashimoto T, Iwatsubo T:  $A\beta$  immunotherapy: intracerebral sequestration of  $A\beta$  by an anti- $A\beta$  monoclonal antibody 266 with high affinity to soluble  $A\beta$ . *J Neurosci* 29: 11393-11398, 2009.
- 48) Atwal JK, Chen Y, Chiu C, Mortensen DL, Meilandt WJ, Liu Y, Heise CE, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Peng K, Wu P, Rouge L, Zhang Y, Lazarus RA, Scarce-Levie K, Wang W, Wu Y, Tessier-Lavigne M, Watts RJ: A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid- $\beta$  production *in vivo*. *Sci Transl Med* 3: 84ra43, 2011.
- 49) Schor NF: What the halted phase III  $\gamma$ -secretase inhibitor trial may (or may not) be telling us. *Ann Neurol* 69: 237-239, 2011.
- 50) Mueller SG, Weiner MW, Thal LJ, Petersen RC, Jack CR, Jagust W, Trojanowski JQ, Toga AW, Beckett L: Ways toward an early diagnosis in Alzheimer's disease: The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). *Alzheimers Dement* 1: 55-66, 2005.
- 51) Iwatsubo T: Japanese ADNI: present status and future. *Alzheimers Dement* 6: 297-299, 2010.
- 52) Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR Jr, Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 280-292, 2011.

---

### Alzheimer's Disease: Molecular Pathology of $\beta$ -amyloid and Perspectives Towards Pre-emptive Medicine

Takeshi Iwatsubo<sup>1</sup>, Taisuke Tomita<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Neuropathology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

<sup>2</sup> Department of Neuropathology and Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Science, University of Tokyo

