

Table 1 Description of the patients

Case number	Age at death (year)	Age at onset (year)	Sex	Family history	Brain weight (g)	Clinical diagnosis	Region
ALS							
1	62	61	M	N	1150	ALS	Prec, L and other regions ^a
2	72	71	F	N	1390	ALS	Prec and L
3	42	40	F	N	1140	ALS	Prec, L and other regions ^a
4	76	75	F	N	NA	ALS	Prec and L
5	62	54	M	N	1230	ALS	Prec and other regions ^a
6	77	76	F	N	NA	ALS	Prec
7	67	65	M	N	1414	ALS	Fr
8	55	53	M	Y(mC9ORF72)	1250	ALS	Fr
FTLD-TDP type A							
9	58	49	M	Y(mC9ORF72)	1050	FTD	Fr
10	67	54	F	Y(mGRN)	NA	FTD	Fr
11	71	63	F	Y(mGRN)	863	PNFA	Fr
12	66	56	F	Y(mGRN)	1100	FTD	Fr
13	68	60	M	Y(mGRN)	1210	FTD + MND	Fr
FTLD-TDP type B							
14	45	43	M	N	1260	FTD + MND	Fr
15	59	57	M	Y(mC9ORF72)	1210	FTD + MND	Fr
16	67	65	M	N	1280	FTD + MND	Fr
17	76	74	M	N	1215	FTD + MND	Fr
18	69	58	M	N	1166	FTD + MND	Fr
19	52	50	F	Y(mC9ORF72)	1050	FTD + MND	Fr
20	65	61	M	N	1530	FTD + MND	Fr
21	68	64	M	N	1213	FTD + MND	Fr
FTLD-TDP type C							
22	82	NA	M	N	1200	SD	Fr, Te and other regions ^b
23	67	65	M	N	NA	SD	Fr
24	59	53	M	N	NA	SD	Fr
25	63	58	M	N	NA	SD	Fr
26	66	55	F	N	1035	SD	Fr
27	75	60	M	N	1174	SD	Fr
AD							
28	65	56	F	N	1165	AD	Fr
29	70	NA	F	N	1126	AD	Fr

AD = Alzheimer's disease; Fr = frontal cortex; FTD = frontotemporal dementia; L = lumbar part of spinal cord; mC9ORF72 = mutation of chromosome 9 open-reading frame 72 gene; mGRN = mutation of progranulin gene; MND = motor neuron disease; NA = not available; PNFA = progressive non-fluent aphasia; Prec = precentral gyrus; SD = semantic dementia; Y = yes; N = no.

a Other regions contained striatum, thalamus, hippocampus dentate gyrus, substantia nigra, pons, medulla and cerebellum cortex. In these cases, the grey and white matter of precentral gyrus were separated from each other macroscopically and examined.

b Other regions contain striatum, thalamus, hippocampus dentate gyrus, substantia nigra, pons, medulla and cerebellum cortex. FTLD-TDP type B without MND and type D are not analysed in this study.

The samples were loaded on 15% SDS-PAGE gels. Proteins in the gel were then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). After blocking with 3% gelatine in 0.01 M PBS (pH 7.4), membranes were incubated overnight with phosphorylation dependent anti-TDP-43 rabbit polyclonal antibody (pS409/410, 1:1000; Hasegawa *et al.*, 2008), phosphorylation independent TDP-43 polyclonal antibody 10782-1-AP (TDP-43 pAb, 1:3000) and TDP-43 monoclonal antibody, 60019-2-Ig (TDP-43 mAb, 1:3000) (ProteinTech Group). After incubation with the appropriate biotinylated secondary antibody, immunolabelling was detected using the VECTASTAIN[®] ABC system (Vector Laboratories) coupled with a 3,3'-diaminobenzidine reaction intensified with nickel chloride. The blot membranes were digitally analysed, and densitometric analyses were performed with ImageJ version 1.44p (NIH, [http://](http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html)

rsbweb.nih.gov/ij/index.html). The densitometry data were averaged for all cases in each group to illustrate the different patterns.

Immunohistochemistry

After cryoprotection in 15% sucrose in 0.01 M PBS (pH 7.4), paraformaldehyde-fixed tissue blocks were cut on a freezing microtome at 30- μ m thickness. The free-floating sections were immunostained with phosphorylation-dependent TDP-43 monoclonal antibody (pS409/410, 1:10 000) (Inukai *et al.*, 2008) for 72 h in the cold. After treatment with mouse secondary antibody, immunolabelling was detected using the VECTASTAIN[®] ABC system coupled with a 3,3'-diaminobenzidine reaction to yield a brown precipitate. Sections were lightly counterstained with heamatoxylin.

Protease treatment of phosphorylated TDP-43

Sarkosyl-insoluble fractions extracted from the neocortical regions of patients with ALS or FTLD-TDP were treated with final concentration of 100 µg/ml trypsin (Promega) or 10 µg/ml chymotrypsin (Sigma-Aldrich) at 37°C for 30 min. The reaction was stopped by boiling for 5 min. After centrifuging at 15 000 rpm for 1 min, the samples were analysed by immunoblotting as described earlier.

Mass spectrometry

Sarkosyl-insoluble, trypsin-resistant fractions were loaded on 15% SDS-PAGE gels. The pS409/410-positive ~16 kDa bands were dissected and digested in-gel with chymotrypsin. The digests were applied to the Paradigm MS4 high-performance liquid chromatography system (Microm BioResources). A reversed phase capillary column (Develosil ODS-HG5, 0.075 × 150 mm, Nomura Chemical) was used at a flow rate of 300 nl/min with a 4–80% linear gradient of acetonitrile in 0.1% formic acid. Eluted peptides were directly detected with an ion trap mass spectrometer, LXQ (Thermo Fisher Scientific). The obtained spectra were analysed with Mascot (Matrix Science).

Statistical analysis

The *P*-values for the description of the statistical significance of differences were calculated by means of the paired, two-tailed *t*-test using Prism 5.04 software (GraphPad Software, Inc).

Results

Banding patterns of phosphorylated C-terminal TDP-43 in ALS and FTLD with TDP-43 pathology

Immunoblot analysis using an antibody specific for abnormal TDP-43, pS409/410, showed high-molecular-weight smearing substances, phosphorylated full-length TDP-43 at 45 kDa and several C-terminal fragments at 18–26 kDa to be present in affected brain regions in all cases (Fig. 1). Three major bands at 23, 24 and 26 kDa, and two minor bands at 18 and 19 kDa were seen in the precentral gyrus and frontal cortex of cases with ALS, with the 24 kDa band being the most intense (Fig. 1A and F). In the lumbar spinal cord, the two minor bands at 18 and 19 kDa were barely present, but the banding pattern of the three major bands at 23, 24 and 26 kDa was similar to that in the cerebral cortex (Fig. 1A). No such pS409/410-positive TDP-43 bands were detected in control cases with Alzheimer's disease with no TDP-43 pathology (Fig. 1B). In the FTLD-TDP cases, the banding pattern could be distinguished into three types according to the FTLD-TDP histological subtype (Fig. 1C–E). In FTLD-TDP type A, three major bands at 23, 24 and 26 kDa, and two minor bands at 18 and 19 kDa were detected, with the 23 kDa band being the most intense (Fig. 1C and F). In FTLD-type B cases, the banding pattern was the same as that in the ALS cases (Fig. 1D and F). In FTLD-TDP type C cases, two major bands at 23 and 24 kDa, and two minor

bands at 18 and 19 kDa were detected, with the 24 kDa band being the most intense, and the band at 26 kDa being hardly detectable (Fig. 1E and F). Densitometric analyses of the immunoblots for all cases are shown in Supplementary Fig. 1. Each component of the C-terminal fragments was significantly different (Fig. 1F).

Immunoblot analysis using phosphorylation independent TDP-43 polyclonal and monoclonal antibodies detected phosphorylated full-length TDP-43 at 45 kDa, two bands ~25 kDa and high-molecular-weight smears, in addition to the normal TDP-43 band at 43 kDa in ALS and various subtypes of FTLD-TDP. The banding patterns between ALS and various subtypes of FTLD-TDP could not be distinguished with these antibodies. In the cases with Alzheimer's disease, the normal TDP-43 band at 43 kDa was detected, but neither the phosphorylated 45 kDa band nor the ~25 kDa fragments were observed (Supplementary Fig. 2). Immunoblot analysis of α -tubulin in Tris saline-soluble fractions from cases with types A, B and C pathology showed no correlation between the banding pattern of α -tubulin and that of TDP-43 (Supplementary Fig. 3), indicating that the differences in the banding patterns are not because of protein degradation caused by a long post-mortem interval or unfavourable agonal status.

Immunohistochemistry and immunoblot analyses of phosphorylated TDP-43 in multiple regions of ALS and FTLD with TDP-43 pathology

In ALS cases, the neuronal cytoplasmic pathology, which included skein-like inclusions, irregularly shaped TDP-immunoreactive neuronal cytoplasmic inclusions and densely staining granules, was confirmed in multiple regions by immunohistochemistry analysis using pS409/410 (Fig. 2A–G). Glial cytoplasmic inclusions were also present in many regions. Glial cytoplasmic inclusions were more frequent in the white matter than in the grey matter (Fig. 2H). A few neuronal cytoplasmic inclusions were found in the cerebellar cortex granule cells (Fig. 2G). In FTLD-TDP type C, dystrophic neurites were seen in multiple regions except for the cerebellar cortex (Fig. 2I–O), whereas neuronal cytoplasmic inclusions were also present in the striatum and hippocampus dentate gyrus granule cells (Fig. 2J and L). No abnormal structures were found in the cerebellar cortex (data not shown). These observations show that pathological TDP-43 is present throughout many CNS areas in ALS, suggesting that ALS does not selectively affect only the motor system, but it is rather a multisystem neurodegenerative TDP-43 proteinopathy.

Immunoblot analyses of three ALS cases confirmed that phosphorylated TDP-43 and the C-terminal fragments are deposited in multiple brain regions in ALS (Fig. 3A). Relatively strong immunoreactivities were detected in the striatum (in Cases 3 and 5) and substantia nigra (in Cases 1 and 5), although this varied between cases (Fig. 3A). Importantly, the banding pattern for the TDP-43 C-terminal fragments in these three cases was basically the same in all brain regions examined (Fig. 3A). In FTLD-TDP type C, a C-terminal banding pattern, clearly distinct from that

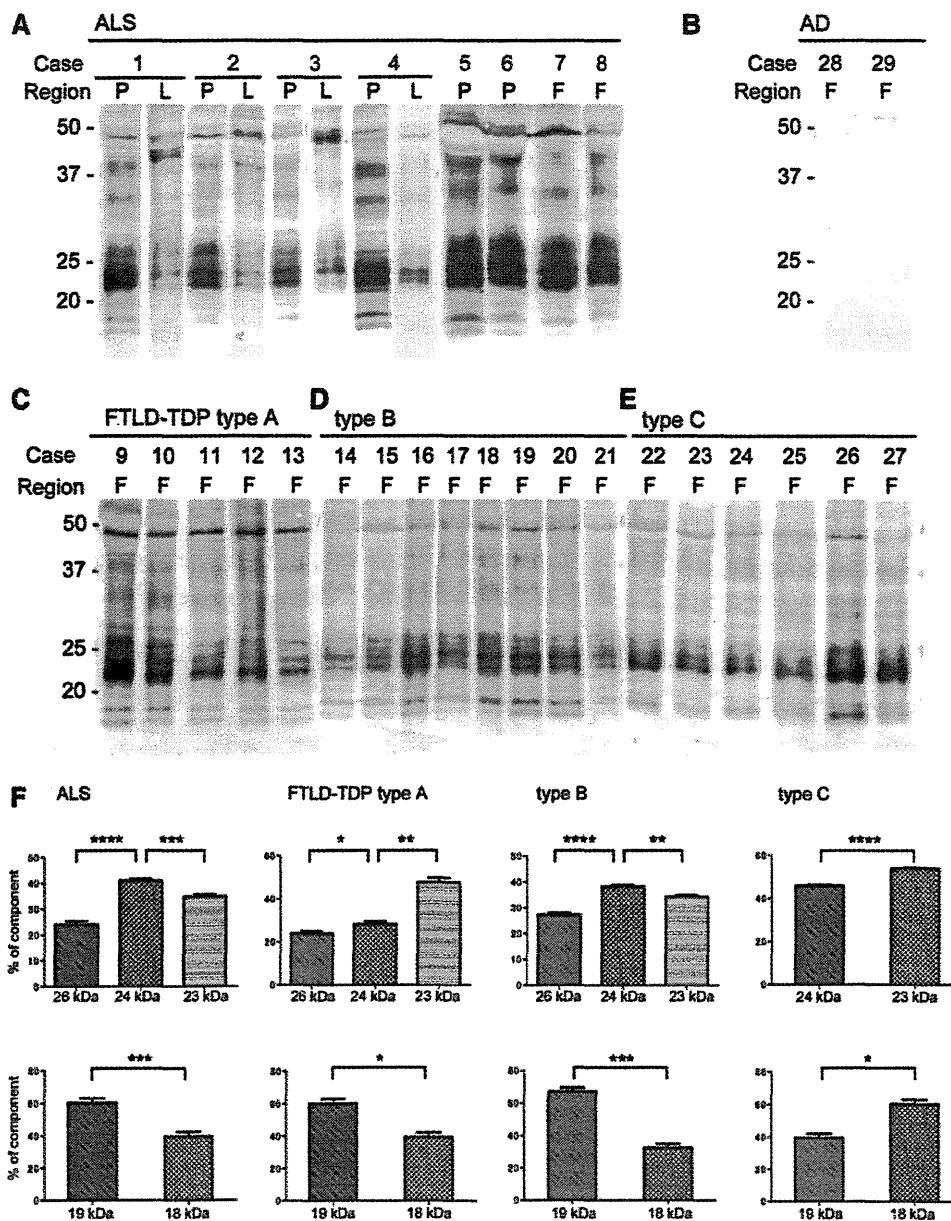


Figure 1 Immunoblot analyses of sarkosyl-insoluble TDP-43 in the brains or spinal cords of ALS (Cases 1–8) (A), Alzheimer's disease (Cases 28–29) (B), FTLD-TDP type A (Cases 9–13) (C), FTLD-TDP type B (Cases 14–21) (D) and FTLD-TDP type C (Cases 22–27) (E), using a phosphorylation-dependent anti-TDP-43 antibody (pS409/410). In all cases, high-molecular-weight smearing substances, phosphorylated full-length TDP-43 at 45 kDa and several C-terminal fragments at 18–26 kDa are detected. In ALS (A) and FTLD-TDP type B (D) cases, three major bands at 23, 24 and 26 kDa and two minor bands at 18 and 19 kDa are detected, whereas in the FTLD-TDP Type C (E) cases, two major bands at 23 and 24 and two minor bands at 18 and 19 kDa. A 24 kDa band is the most intense in ALS (A) and FTLD-TDP type B (E), whereas a 23 kDa band is the most intense in FTLD-TDP type C (D). The band pattern of the cases with type A (C) is an intermediate between FTLD-TDP type B (D) and FTLD-TDP type C (E). In spinal cords of cases with ALS, the 18 and 19 kDa bands are hardly detectable, but the same banding pattern of the 23–26 kDa bands as in precentral gyrus is detected. No such TDP-43 fragments are detected in brains of patients with Alzheimer's disease (AD) (B). The intensity of each C-terminal band was analysed using the ImageJ software and each component was statistically analysed by Student's *t*-test (F). Data indicate mean (SEM). **** $P < 0.0001$, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. F = frontal cortex; L = lumbar part of spinal cord; P = precentral cortex.

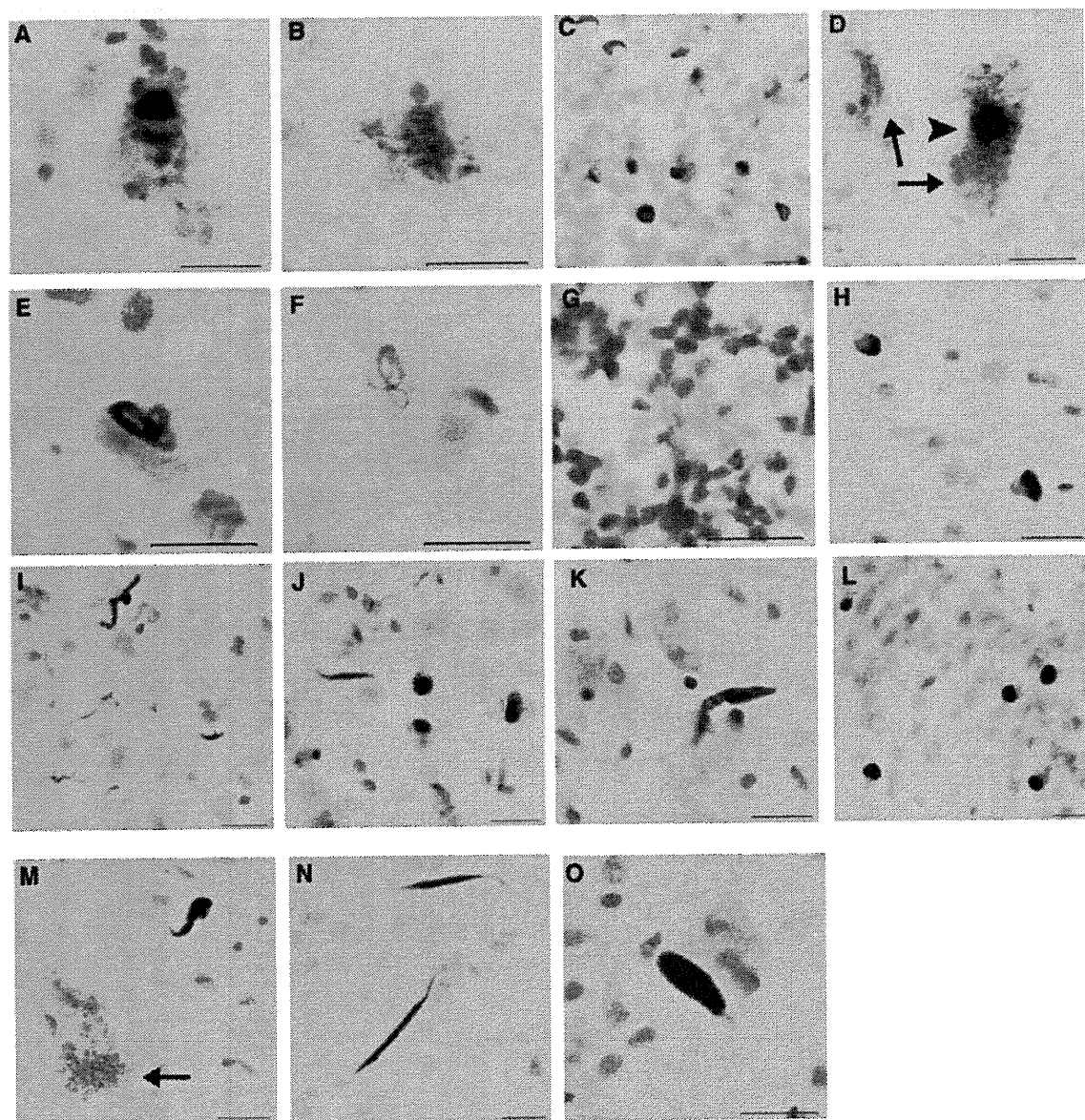


Figure 2 Phosphorylated TDP-43-positive structures observed in different brain regions and spinal cords of ALS (A–H) and FTLD-type C (I–O) using a phosphorylation-dependent anti-TDP-43 antibody (pS409/410). (A) Lewy body-like inclusion in the striatum neuron. (B) Cytoplasmic granular staining in the thalamus. (C) Neuronal cytoplasmic inclusions in the granular cells of hippocampus. (D) Irregularly shaped TDP-immunoreactive neuronal cytoplasmic inclusion in the substantia nigra (arrowhead). The arrows denote neuromelanin granules. (E) Skein-like inclusion in the motor nucleus of trigeminal nerve of pons. (F) Skein-like inclusion in the inferior olivary nucleus of medulla. (G) Neuronal cytoplasmic inclusion in the granular cells of cerebellar cortex. (H) Glial cytoplasmic inclusions in the white matter of precentral cortex. (I) Dystrophic neurites in the temporal cortex, (J) dystrophic neurites and neuronal cytoplasmic inclusions in the striatum. (K) Dystrophic neurites in the thalamus. (L) Neuronal cytoplasmic inclusions in the granular cells of hippocampus. (M) Dystrophic neurites in the substantia nigra. The arrow denotes neuromelanin granules. (N) Dystrophic neurites in the pons. (O) Dystrophic neurites in the medullary reticular formation. Scale bars = 20 μ m.

of ALS, was detected in the temporal cortex, striatum and hippocampus, but was barely detected in the thalamus, substantia nigra, pons and medulla, and not at all in the cerebellar cortex (Fig. 3B). The banding pattern observed in these brain regions was indistinguishable (Fig. 3B). These results suggest that the same abnormal

TDP-43 molecular species is deposited in different brain regions and different cell types, although the morphology of the TDP-43 inclusions may be different in the brain regions. Densitometric analyses of the immunoblots for all cases are shown in Supplementary Fig. 4.

Protease-resistant TDP-43 in ALS and FTLD with frontotemporal dementia-43 pathology

These different banding patterns in TDP-43 proteinopathies may represent different conformations of abnormal TDP-43 or their aggregates. To test this hypothesis, we subjected the abnormal TDP-43 recovered in the sarkosyl-insoluble pellets to protease treatment and analysed the protease-resistant bands. Proteins can be easily cleaved by proteases if they are denatured or

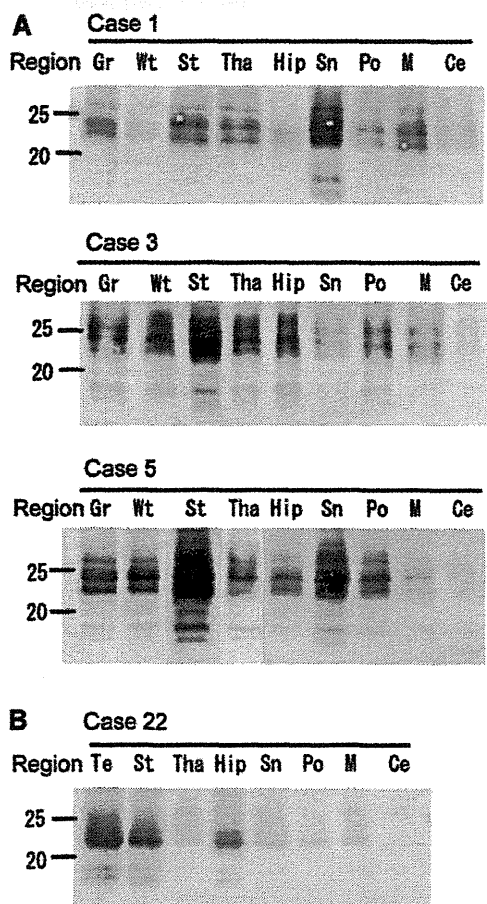


Figure 3 Immunoblot analyses of the C-terminal fragments of phosphorylated TDP-43 in the different brain regions of cases with ALS (Cases 1, 3 and 5, as shown in Fig. 1) (A) and FTLD-type C (Case 22, as shown in Fig. 1) (B). (A) Immunoblots of insoluble TDP-43 in the grey or white matter of precentral cortex, striatum, thalamus, hippocampus, substantia nigra, pons and medulla of ALS cases. (B) Immunoblot of TDP-43 in temporal cortex, striatum, hippocampus, thalamus, substantia nigra, pons and cerebellar cortex of the case with FTLD-TDP type C. Ce = Cerebellar cortex; Gr = grey matter of precentral gyrus; Hip = hippocampus; M = medulla; Po = pons; Sn = substantia nigra; St = striatum; Tha = thalamus; Te = temporal cortex; Wt = white matter of precentral gyrus. Immunoblots of spinal cords of cases with ALS are shown in Fig. 1.

unstructured, but domains that have rigid structures, such as a β -sheet conformation or that are structurally buried or interacting with other molecules, are highly resistant to proteases. On trypsin or chymotrypsin treatment, the full-length 45-kDa band and the smearing substance of TDP-43 disappeared, leaving protease-resistant fragments at 16–25 kDa (Figs 4 and 5). As expected, the protease-resistant banding patterns were different and distinguishable into three patterns (Figs 4 and 5). In ALS, trypsin-resistant doublet bands at 16 and 15 kDa, and two minor bands at \sim 24 kDa were detected, whereas a single band at 16 kDa and some additional bands at \sim 24 kDa were detected in FTLD-TDP type A (Fig. 4A, Lanes 1 and 2). In FTLD-TDP type B, the same banding pattern as that in ALS was observed (Fig. 4A, Lane 3). In FTLD-TDP type C, a broad single band at 16 kDa and some additional bands at \sim 24 kDa were detected (Fig. 4A, Lane 4). No such bands were detected in Alzheimer's disease (Fig. 4A, Lane 5).

Similarly, on chymotrypsin treatment, multiple protease-resistant bands were detected at 16–25 kDa and the chymotrypsin-resistant band patterns were also different between the three disease subtypes (Fig. 4B). Doublet bands were seen in ALS and FTLD-TDP type B, but only a single band in FTLD-TDP type C was detected at \sim 16 kDa (Fig. 4B). In FTLD-TDP type A, the lower band (15 kDa) of the \sim 16 kDa doublet was more intense than the upper one (16 kDa).

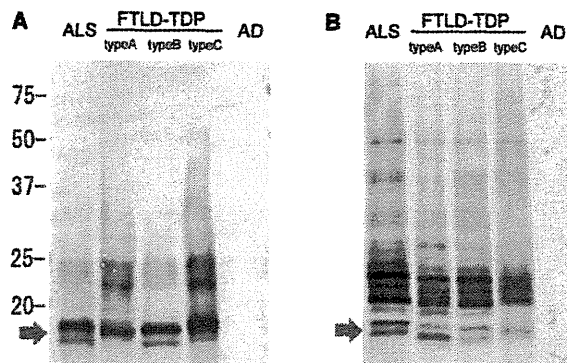


Figure 4 Immunoblot analysis of phosphorylated TDP-43 from representative ALS and FTLD-TDP cases after protease treatment. (A) Immunoblot of insoluble TDP-43 from cases with ALS, FTLD-TDP type A, type B, type C and Alzheimer's disease (AD) after trypsin treatment. Doublet bands at \sim 16 kDa (arrow) and some minor 23–24 kDa bands are detected in ALS and FTLD-TDP type B, whereas a single band at \sim 16 kDa and several bands at 23 and 24 kDa are detected in FTLD-TDP type A and type C. No such bands are detected in the Alzheimer's disease case. (B) Immunoblot of insoluble TDP-43 from cases with ALS, FTLD-TDP type A, type B, type C and Alzheimer's disease after chymotrypsin treatment. Multiple protease-resistant TDP-43 bands are detected at 16–25 kDa. Doublet bands at \sim 16 kDa (arrow) are detected in ALS and FTLD-TDP type A and B, whereas a single band at \sim 16 kDa (arrow) is detected in the case with FTLD-TDP type C. In FTLD-TDP type A, the lower band of the doublet at 16 kDa is more intense. No such bands are detected in the Alzheimer's disease case.

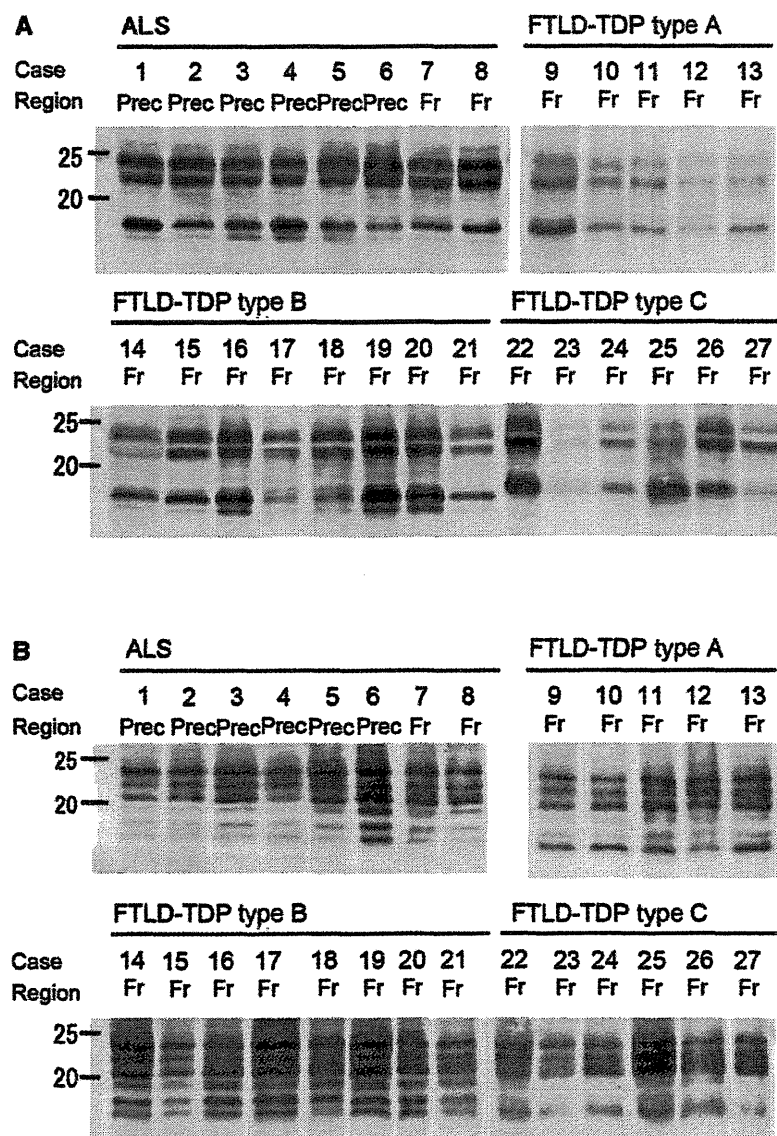


Figure 5 Comparison of the protease-resistant TDP-43 banding patterns in ALS and FTLT-TDP. Immunoblot analyses of trypsin-resistant (A) and chymotrypsin-resistant (B) fragments of TDP-43 from all cases examined. The banding patterns of ALS and FTLT-TDP type B cases are indistinguishable. Fr = frontal cortex; Prec = precentral gyrus.

In all cases examined, the trypsin-resistant banding patterns were clearly distinguishable between the disease subtypes in accordance with the three different types of banding pattern of TDP-43 C-terminal fragments, although it is difficult to distinguish the trypsin band pattern of type A from that of type C (Figs 5A, 6A and Supplementary Fig. 5). The chymotrypsin-resistant banding patterns were distinguishable and could be differentiated into three types (Figs 5B, 6B and Supplementary Fig. 6), also in accordance with the banding pattern of the TDP-43 C-terminal fragment. The banding patterns of ALS and FTLT-TDP type B were the same, whereas the banding pattern of FTLT-TDP type A was distinguishable from those of type C and type B (Figs 4 and 5). The combination analyses of trypsin and chymotrypsin-resistant

banding patterns confirmed that TDP-43 proteinopathies can also be biochemically distinguishable into three types according to TDP-43 subtypes. These results strongly suggest that the different C-terminal banding patterns represent different conformations of TDP-43 aggregates and that the distinct types of TDP-43 are deposited in association with distinct pathological phenotypes of TDP-43 proteinopathies.

Immunoblot analysis using phosphorylation independent TDP-43 polyclonal and monoclonal antibodies detected some TDP-43 fragments in the ALS and FTLT-TDP cases after trypsin or chymotrypsin treatment, although no clear difference was observed in the banding patterns between ALS and other subtypes of FTLT-TDP (Supplementary Fig. 7). The distinctive

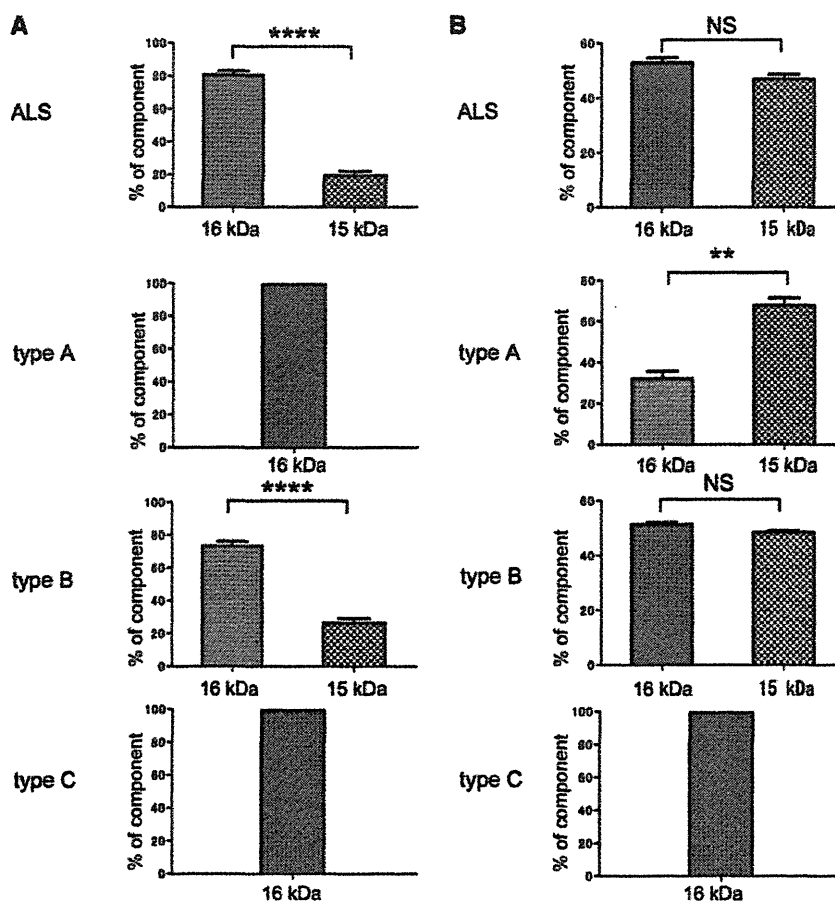


Figure 6 Quantitative analysis of protease-resistant ~16 kDa band. (A) The intensity of trypsin-resistant ~16 kDa band of each case was quantitated with ImageJ and statistically analysed. (B) The intensity of chymotrypsin-resistant ~16 kDa band of each case was quantitated with ImageJ and statistically analysed. Data indicate mean (SEM). **** $P < 0.0001$, ** $P < 0.01$, NS = not significant.

protease-resistant bands at ~16 kDa of ALS were not detected with both phosphorylation independent antibodies (Supplementary Fig. 8).

We also analysed the banding pattern of phosphorylated TDP-43 in another series of five sporadic cases with TDP-43 pathology (Alzheimer's disease, Alzheimer's disease/dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease/argyrophilic grain disease) (Supplementary Table 1). The banding pattern of the C-terminal fragments, and trypsin- or chymotrypsin-resistant fragments, in these were same as those of FTLD-TDP type A with *GRN* mutation (Supplementary Fig. 9).

Mass spectrometric analysis of protease-resistant bands of TDP-43 in ALS and FTLD-TDP type C

To further investigate the differences in the abnormal TDP-43 protein species at a molecular level, we analysed the ~16 kDa trypsin-resistant bands by mass spectrometry. Mass analysis of chymotrypsin digests of ~16 kDa trypsin-resistant fragments

identified 4 peptides, amino acid residues 277–289, 290–299, 294–333 and 300–316, suggesting these peptides are derived from trypsin-resistant fragments 276–414 and 294–414. Mass spectrometric analysis of the single broad band from FTLD-TDP type C identified the peptides of amino acids 273–283, 277–289, 290–313 and 317–330, strongly suggesting that the trypsin-resistant fragments from FTLD-TDP type C are derived from peptides 273–414 and 276–414. These analyses clearly indicate that trypsin-resistant core regions of the abnormal TDP-43 accumulated in the brain are not necessarily the same between ALS and FTLD (Supplementary Fig. 10).

Discussion

In this study, we have shown that the banding patterns for TDP-43 C-terminal fragments in ALS and FTLD are distinguishable and classifiable into at least three types. This difference was consistently demonstrated in 27 cases, eight with ALS, five with FTLD-TDP type A, eight with FTLD-TDP type B and six with FTLD-TDP type C. These results strongly suggest that distinct

types of TDP-43 molecules constitute the distinct types of pathologies of TDP-43 and determine the clinicopathological phenotypes of TDP-43 proteinopathies. In TDP-43 histopathology, ALS is considered to represent a distinct pathological subtype because the distribution of TDP-43 inclusions is different from that of FTLD-TDP (Mackenzie *et al.*, 2006a). However, as shown in this study, the TDP-43 accumulations in ALS and FTLD-TDP type B are biochemically indistinguishable. In fact, clinical and histopathological motor neuron disease is often present in cases with FTLD-TDP type B histology. In the three types of phosphorylated C-terminal TDP-43 banding pattern, the pattern seen in FTLD-TDP type C is the most distinctive, lacking the 26 kDa band detected in ALS, FTLD-TDP type A and type B cases (Fig. 1). The clinical diagnosis of the FTLD-TDP type C cases was semantic dementia in every instance, consistent with other studies showing this type of histology to be associated with semantic dementia (Mackenzie *et al.*, 2006a). FTLD is clinically classified into frontotemporal dementia, demantic dementia and progressive non-fluent aphasia, based on topographical distributions of degeneration (Neary *et al.*, 1998). In frontotemporal dementia, the bilateral frontal and temporal lobes are affected, whereas the bilateral temporal lobes are affected in semantic dementia and the left hemisphere in progressive non-fluent aphasia. Present data showing the most distinctive pattern of abnormal TDP-43 in type C indicate that semantic dementia may be biochemically different from frontotemporal dementia. Similar differences in tau fragment banding patterns have been shown between progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration (Arai *et al.*, 2004). Progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration are neurodegenerative diseases that are characterized by intracytoplasmic aggregates of hyperphosphorylated tau with four microtubule-binding repeats, with distinctive pathological features. Immunoblot analysis of Sarkosyl-insoluble tau demonstrated that a 33 kDa C-terminal fragment of tau band predominated in progressive supranuclear palsy, whereas two closely related bands of ~37 kDa predominated in corticobasal degeneration. The clinicopathological subtypes of these diseases may be explained by different conformations of protein aggregates or species of abnormal proteins.

Unfortunately, we were unable to obtain brain tissue samples from patients with FTLD-TDP type D (associated with VCP mutation; Cairns *et al.*, 2007b; Neumann *et al.*, 2007). However, because the deposition of abnormal TDP-43 in this disorder is mostly within neuronal nuclei, it is possible that the conformation of abnormal TDP-43 in FTLD-TDP type D may also differ from that in FTLD-TDP types A–C. Familial ALS and FTLD-TDP cases in which known mutations [*GRN* (Baker *et al.*, 2006) or *C9ORF72* (DeJesus-Hernandez *et al.*, 2011; Renton *et al.*, 2011)] were examined in this study. In FTLD-TDP due to *GRN* mutations, type A pathology is exclusively seen (Mackenzie *et al.*, 2006b; Cairns *et al.*, 2007b; Josephs *et al.*, 2007). All our cases with FTLD with *GRN* mutation showed the same C-terminal banding patterns of phosphorylated TDP-43 corresponding to type A histology. Some recent studies describing the clinical and pathological features of cases of FTLD-TDP with hexanucleotide repeat expansions in *C9ORF72* reported that many of the 'pure' frontotemporal dementia cases had type A pathology, whereas many of the combined frontotemporal dementia and motor neuron disease

cases had type B pathology (Murray *et al.*, 2011; Boeve *et al.*, 2012; Hsiung *et al.*, 2012; Mahoney *et al.*, 2012; Simon-Sanchez *et al.*, 2012; Snowden *et al.*, 2012). Present cases with *C9ORF72* expansions included one case of ALS, one case of pure frontotemporal dementia with type A pathology, and two cases of frontotemporal dementia with motor neuron disease and type B pathology. The C-terminal banding pattern of these cases with familial ALS and frontotemporal dementia with motor neuron disease was not different from that in the sporadic ALS and FTLD-TDP type B cases, and that of the frontotemporal dementia case was not different from that in the cases with *GRN* mutation. Therefore, expansions in *C9ORF72* do not seem to influence the various types of TDP-43 C-terminal banding pattern or histological type of TDP-43 pathology.

Immunohistochemical studies using TDP-43 antibodies have shown that pathological TDP-43 is present throughout many CNS areas in ALS, suggesting that ALS does not selectively affect only the motor system, but is rather a multisystem neurodegenerative TDP-43 proteinopathy (Geser *et al.*, 2008). We also confirmed this viewpoint, immunohistochemically and biochemically, finding the same disease characteristic C-terminal fragment (banding) patterns of phosphorylated TDP-43 within the cerebral cortex, spinal cord and the other different brain regions in ALS. Although the types of pathological structures or their morphologies detected on immunohistochemistry analysis appeared different, the banding patterns for the C-terminal fragments were the same in all regions examined in three patients with ALS. This was also true for the one case with FTLD-TDP type C, where the same banding pattern of the C-terminal fragments was detected in several different brain regions beyond the frontal cortex (Fig. 3). These results strongly suggest that the same abnormal TDP-43 molecule is deposited in different brain regions in ALS (and probably also in FTLD-TDP type B) and FTLD-TDP type C, although we need to examine whether this is also true for cases with FTLD-TDP type A. Importantly, the extent of the abnormal protein pathology is closely correlated with the disease progression, such as Alzheimer's disease in tauopathies (Braak and Braak, 1991), and Parkinson's disease in α -synucleinopathies (Braak *et al.*, 2003; Saito *et al.*, 2003). However, the molecular mechanisms governing different clinicopathological phenotypes of these neurodegenerative diseases and their progression are poorly understood. Recent studies using cellular or animal models have suggested that aggregation-prone proteins, such as tau and α -synuclein, can spread to other cells and brain regions like prion disorders (Clavaguera *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2009; Nonaka *et al.*, 2010). The spreading of α -synuclein lesions to the grafts is also observed in Parkinson's disease brains after transplantation (Li *et al.*, 2008). However, it remains to be clarified whether the 'propagating' abnormal protein species represents a distinct 'strain type' that can be differentiated by molecular criteria in human patients or whether the species are the same in different brain regions.

We have also shown that the banding patterns of protease-resistant fragments of phosphorylated TDP-43 are similarly different in accordance with the banding patterns seen in untreated C-terminal fragments, confirming the direct link between neuropathological subtypes and biochemical banding patterns. The mass spectrometric analysis indicated that the protease resistant regions

of abnormal TDP-43 are different between the diseases. As abnormally phosphorylated TDP-43 has been shown to accumulate in a filamentous form in ALS spinal cords (Hasegawa *et al.*, 2008), the filament core regions may be different between the diseases. Protease-resistant bands, and differences in banding patterns, have been reported in the prion diseases, Creutzfeldt–Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy (Collinge *et al.*, 1996). Protease-resistant prion protein extracted from cases with new-variant Creutzfeldt–Jakob disease showed a different and characteristic pattern from that in cases with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease, with the banding pattern being indistinguishable from that of mice infected with bovine spongiform encephalopathy prion. Protease-treated prion protein species are thought to have different mobilities because of different conformations. These observations in prion disease suggest that the different banding patterns to the abnormal TDP-43 fragments in ALS and FTLD might represent different TDP-43 strains with different conformations.

Recently, TDP-43 pathology has been detected in some cases with Alzheimer's disease (Arai *et al.*, 2009). We have shown here that the banding patterns of TDP-43 in cases of Alzheimer's disease with TDP-43 pathology are the same as those in FTLD-TDP type A. These novel observations suggest a biochemical commonality between FTLD and Alzheimer's disease with respect to TDP-43 pathology.

The results shown in this study also suggest a molecular basis for the clinicopathological classification of TDP-43 proteinopathies, which complements the histological classifications (Mackenzie *et al.*, 2011).

Funding

This work was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (to M.H., 11000624) from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, and grants from Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (to M.H.).

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Arai T, Mackenzie IR, Hasegawa M, Nonaka T, Niizato K, Tsuchiya K, et al. Phosphorylated TDP-43 in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2009; 117: 125–36.
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, Ikeda K, Nonaka T, Mori H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 351: 602–11.
- Arai T, Ikeda K, Akiyama H, Nonaka T, Hasegawa M, Ishiguro K, et al. Identification of amino-terminally cleaved tau fragments that distinguish progressive supranuclear palsy from corticobasal degeneration. *Ann Neurol* 2004; 55: 72–9.
- Armstrong RA, Ellis W, Hamilton RL, Mackenzie IR, Hedreen J, Gearing M, et al. Neuropathological heterogeneity in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy: a quantitative study of 94 cases using principal components analysis. *J Neural Transm* 2010; 117: 227–39.
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, Gass J, Rademakers R, Lindholm C, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006; 442: 916–19.
- Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, DeJesus-Hernandez M, Knopman DS, Pedraza O, et al. Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in *C9ORF72*. *Brain* 2012; 135: 765–83.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 239–59.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24: 197–211.
- Brooks BR. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 1994; 124 (Suppl): 96–107.
- Cairns NJ, Bigio EH, Mackenzie IR, Neumann M, Lee VM, Hatanpaa KJ, et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration. *Acta Neuropathol* 2007a; 114: 5–22.
- Cairns NJ, Neumann M, Bigio EH, Holm IE, Troost D, Hatanpaa KJ, et al. TDP-43 in familial and sporadic frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions. *Am J Pathol* 2007b; 171: 227–40.
- Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, et al. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 909–13.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996; 383: 685–90.
- DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of *C9ORF72* causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 2011; 72: 245–56.
- Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem* 2009; 284: 12845–52.
- Geser F, Brandmeir NJ, Kwong LK, Martinez-Lage M, Elman L, McCluskey L, et al. Evidence of multisystem disorder in whole-brain map of pathological TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 636–41.
- Geser F, Martinez-Lage M, Robinson J, Uryu K, Neumann M, Brandmeir NJ, et al. Clinical and pathological continuum of multisystem TDP-43 proteinopathies. *Arch Neurol* 2009; 66: 180–9.
- Gitcho MA, Bigio EH, Mishra M, Johnson N, Weintraub S, Mesulam M, et al. TARDBP 3'-UTR variant in autopsy-confirmed frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 proteinopathy. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 633–45.
- Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, Kametani F, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008; 64: 60–70.
- Hsiung GY, DeJesus-Hernandez M, Feldman HH, Sengdy P, Bouchard-Kerr P, Dwosh E, et al. Clinical and pathological features of familial frontotemporal dementia caused by *C9ORF72* mutation on chromosome 9p. *Brain* 2012; 135: 709–22.
- Inukai Y, Nonaka T, Arai T, Yoshida M, Hashizume Y, Beach TG, et al. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLD-U and ALS. *FEBS Lett* 2008; 582: 2899–904.
- Josephs KA, Ahmed Z, Katsuse O, Parisi JF, Boeve BF, Knopman DS, et al. Neuropathologic features of frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin-positive inclusions with progranulin gene (*GRN*) mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 142–51.
- Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, Spiegelman D, McConkey BJ, Vande Velde C, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008; 40: 572–4.

- Kovacs GG, Murrell JR, Horvath S, Haraszti L, Majtenyi K, Molnar MJ, et al. TARDBP variation associated with frontotemporal dementia, supranuclear gaze palsy, and chorea. *Mov Disord* 2009; 24: 1843–7.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; 14: 501–3.
- Mackenzie IR, Baborie A, Pickering-Brown S, Du Plessis D, Jaros E, Perry RH, et al. Heterogeneity of ubiquitin pathology in frontotemporal lobar degeneration: classification and relation to clinical phenotype. *Acta Neuropathol* 2006a; 112: 539–49.
- Mackenzie IR, Baker M, Pickering-Brown S, Hsiung GY, Lindholm C, Dvosh E, et al. The neuropathology of frontotemporal lobar degeneration caused by mutations in the progranulin gene. *Brain* 2006b; 129: 3081–90.
- Mackenzie IR, Neumann M, Baborie A, Sampathu DM, Du Plessis D, Jaros E, et al. A harmonized classification system for FTLT-TDP pathology. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 111–13.
- Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, et al. Frontotemporal dementia with the *C9ORF72* hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological features. *Brain* 2012; 135: 736–50.
- Murray ME, DeJesus-Hernandez M, Rutherford NJ, Baker M, Duara R, Graff-Radford NR, et al. Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72*. *Acta Neuropathol* 2011; 122: 673–90.
- Nearly D, Snowden JS, Gustafson L, Passant U, Stuss D, Black S, et al. Frontotemporal lobar degeneration: a consensus on clinical diagnostic criteria. *Neurology* 1998; 51: 1546–54.
- Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ, Boyer PJ, Markesbery WR, Smith CD, et al. TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with *VCP* gene mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 152–7.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006; 314: 130–3.
- Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M. Seeded aggregation and toxicity of α -synuclein and tau: cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 2010; 285: 34885–98.
- Renton AE, Majounie E, Waite A, Simon-Sanchez J, Rollinson S, Gibbs JR, et al. A hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron* 2011; 72: 257–68.
- Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, et al. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62: 644–54.
- Simon-Sanchez J, Dopper EG, Cohn-Hokke PE, Hukema RK, Nicolaou N, Seelaar H, et al. The clinical and pathological phenotype of *C9ORF72* hexanucleotide repeat expansions. *Brain* 2012; 135: 723–35.
- Snowden JS, Rollinson S, Thompson JC, Harris JM, Stopford CL, Richardson AM, et al. Distinct clinical and pathological characteristics of frontotemporal dementia associated with *C9ORF72* mutations. *Brain* 2012; 135: 693–708.
- Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, Hu X, Vance C, Rogelj B, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008; 319: 1668–72.
- Tan CF, Eguchi H, Tagawa A, Onodera O, Iwasaki T, Tsujino A, et al. TDP-43 immunoreactivity in neuronal inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis with or without *SOD1* gene mutation. *Acta Neuropathol* 2007; 113: 535–42.

アルツハイマー病研究の進歩 —特に脂質代謝と関連して

Progress in the Alzheimer disease research
— From the aspect of lipid metabolism —

独立行政法人国立長寿医療研究センターアルツハイマー病研究部／部長

道川 誠

アルツハイマー病研究の進歩 —特に脂質代謝と関連して

Progress in the Alzheimer disease research
— From the aspect of lipid metabolism —

独立行政法人国立長寿医療研究センターアルツハイマー病研究部/部長

道川 誠*

はじめに

1993年にアポリポ蛋白 E (ApoE) の対立遺伝子 $\epsilon 4$ が晩発性家族性アルツハイマー病で著しく高いことが報告され、さらにこの傾向は孤発型アルツハイマー病でも確認された。また、その後の研究から、 $\epsilon 4$ 遺伝子を多く持つほど発症の危険が増大し発症が早まること ($\epsilon 4$ アリル数依存性)、ApoE $\epsilon 4$ 遺伝子と脳内 A β 沈着量の増加には正の相関があることが明らかにされ、ApoE $\epsilon 4$ の危険因子の意義として A β 沈着との関連が強く示唆されている。しかし、ApoE の産生や機能調節を標的とした治療法の開発には至っていない。ApoE を標的にした予防・治療法の開発には、その構造ならびに構造に関連した機能解析が必要である。ApoE は 299 のアミノ酸から成る 34kDa の蛋白質であり、ApoE2, ApoE3, ApoE4 の主要な 3 つのアイソフォームが存在するが、これらはそれぞれ 3 つの対立遺伝子 $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の遺伝子産物である。ApoE2, ApoE3, ApoE4 のアイソフォームの違いは、112 番目と 158 番目のアミノ酸が 1 つずつ異なることによって生じる。ApoE3 は 112 番目がシステインで 158 番目がアルギニンであるが、ApoE2 は両方ともシステインであり、ApoE4 は両方ともアルギニンである。このアミノ酸 1 つの違いが、ApoE の構造の違いを生じさせその結果 ApoE の機能の違いを生んでいると考えられていることから、構造と機能を明らかにし、それらを調節・制御する標的を攻略することによって予防・治療法を確立できる可能性がある。

I. ApoE の構造と機能

ApoE のアイソフォーム特異性をささえる分子メカニズムについて、1 つのアミノ酸の違いが分子内構造ならびに分子間相互作用に影響し、それが ApoE アイソフォーム特異的作用を決定していると考えられる。

(i) ApoE4 ドメイン相互作用 (分子内相互作用) 仮説

ApoE4 は二つの構造的ドメインを持つ。すなわち 22-kDa の N 末端側ドメイン (アミノ酸残基 1-191) と 10-kDa の C 末端側ドメインである。N 末端側ドメインは LDL 受容体結合領域を含み、C 末端側ドメインは脂質結合領域を含む。構造解析から、ApoE4 の N 末端側ドメインに存在する 112 番目のアルギニンと電気的に反発した 61 番目のアルギニンが C 末端側ドメインに存在する 255 番目のグルタミン酸と salt bridge を形成してコンパクトな 3 次構造を作ることが知られている。ApoE2 や ApoE3 ではアルギニン 61 は異なるコンフォメーションをとるので、N 末端側ドメインと C 末端側ドメインは開いた分子構造になると考えられている¹⁾。この構造上の違いが、ApoE4 は粒子サイズの大きな VLDL と結合しやすいのに比べ¹⁾、ApoE2 と ApoE3 は粒子サイズの小さな HDL に結合しやすいというアイソフォーム特異的作用の違いを生むと考えられている。

(ii) ApoE 分子間相互作用

ApoE2, ApoE3, および ApoE4 はそれぞれ 2, 1, および 0 個のシステインを持っているため、ApoE2 お

* Makoto Michikawa: Department Head, Department of Alzheimer's Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

よび ApoE3 は、disulfide 結合によってホモあるいはヘテロ 2 量体を形成しうる。実際、ApoE 間による disulfide 結合によって血漿中の ApoE3 の約 55% は 2 量体として存在することが確認されている²⁾。ApoE3 分子間の 2 量体形成は構造上も大きな違いを生むため ApoE 機能を左右すると考えられる。システイン 112 は N 末端側ドメインに存在するが、2 量体を形成した ApoE は N 末端のみならず C 末端側ドメイン機能である受容体結合効率や脂質との結合効率などに影響を及ぼすと考えられる。実際に 2 量体を形成した ApoE3 は、単体に比べて HDL への結合親和性が有意に増加する。我々も、ApoE3 における 2 量体形成が ApoE3 による HDL 産生能に関与することを確認している³⁻⁵⁾。

II. 脳内コレステロール代謝と ApoE

(i) 脳内コレステロール代謝の特異性

中枢神経系でのコレステロールの持つ意義について特筆すべきは、脳を構成する脂質量の多さと神経系細胞構造の特殊性がある。特に、神経突起の伸長やシナプス形成では、細胞体からのコレステロール供給（輸送）ではなく、末端局所での HDL を介するコレステロール供給の果たす役割が大きい⁶⁾ことが分かっている。脳内コレステロール代謝を議論する際に注意すべきことは、体循環系と脳内との間には血液脳関門が存在するために、脳内には体循環系とはその制御が異なった独自のコレステロール代謝系が存在する点である。例えば、血液中には LDL、VLDL、IDL、HDL、カイロミクロンなどのリポ蛋白が存在し、血液中でそれぞれが運搬・代謝されているが、中枢神経系（脳脊髄液中）には HDL のみが存在する。これは、血液脳関門によって血液中の LDL、VLDL、IDL、カイロミクロンなどのリポ蛋白が脳内に入れないことを示している

(ii) ApoE の HDL 産生におけるアイソフォーム依存性

脳内コレステロール代謝を制御する主要な因子の一つが ApoE であり、ApoE が産生する HDL は ApoE 受容体を介して細胞に取り込まれ再利用される。この HDL 産生作用が ApoE3 と ApoE4 では大きく異なり、ApoE3 は効率よく HDL を産生するが、ApoE4 はその作用が弱く ApoE3 に比べて半分以下の能力しかないこと、その分子機構は ApoE の分子間ならびに分子内の相互作用による構造の違いによって説明できることを私たちは明らかにした^{3,4)}。

III. アルツハイマー病病理と ApoE

(i) A β 沈着と ApoE

脳内 A β 濃度の上昇や A β 沈着がアルツハイマー病病態の中心的な役割を果たすと考えられている（アミロイドカスケード仮説）。ApoE は、A β の輸送や代謝にある役割を果たしていると考えられている。例えば、lipid-poor あるいは lipid-free な ApoE4 は、LRP1 や ApoER2 を介した APP の endocytosis を増加させることによって A β 産生を増加させると報告されている⁷⁾。しかし、他方では APP 代謝にたいする ApoE のアイソフォーム特異性はないとされる。また、A β 産生についての効果は確定していないが、A β の除去作用にはいくつかの分子機構によって深く関わっていると考えられている。A β の沈着が始まる前の若い APP トランスジェニックマウスでは、ApoE 欠損によって可用性 A β レベルが上昇することが示されている。また、脂質と結合した ApoE と遊離した ApoE では A β との結合結果が異なることが明らかにされた。生理的条件下では ApoE は主に HDL 粒子と結合して存在するが、こうした ApoE は A β に対して ApoE3 が ApoE4 の 20 倍以上の結合親和性を示すことが示された。これらの結果は、ApoE3 は A β により強く結合して脂質複合体を作るために HDL 取り込みを介して A β を除去し、毒性の強い A β 重合体形成を防いでいることを示唆している。

(ii) A β 除去・分解と ApoE

最近、ApoE を含むリポ蛋白粒子が、A β と結合し受容体を介して細胞内への取り込みを調節している可能性が明らかにされている。ApoE は脳内の A β 細胞内分解および細胞外分解を制御することが示され、しかもこの機能にアイソフォーム特異性があることが報告された。それによると、ApoE（特に脂質との複合体を形成した ApoE、これは HDL-ApoE のこと）が A β の細胞内ならびに細胞外分解を促進すること（作用の強さは ApoE2>ApoE3>ApoE4 の順である）、HDL 産生を増強させる ABCA1 発現を増強させる LXR アゴニストを投与すると脳内 A β 沈着が減少し、記憶障害が改善することなどが、培養細胞ならびにモデルマウスを用いて明らかにされている。すなわち、ApoE-HDL を増加させる鍵分子である ABCA1 発現を上昇させると脳内 A β 沈着が減少するという報告がある⁸⁾。これとは逆に、ABCA1 ノックアウトマウスでは脳内 A β 沈着増加とする論文も複数発表されており、ApoE-HDL 産生が脳内 A β 沈着を左右することが示されている。最近、アルツハイマー病患者を両親に持つヒトの血漿中の ApoE レベル

は、両親に患者を持たないヒトに比べて ApoE 遺伝子型に関係なく低下すること、低下しているレベルの中でも ApoE $\epsilon 2 > \epsilon 3 > \epsilon 4$ の遺伝子型による違いもあったとされる⁹⁾。これが直ちに脳内 ApoE レベルでも同様の違いがあるかどうかは、今後の検討を待つ必要があるが、脳内 HDL 量の低下を示唆するデータであり、ApoE-HDL を増やすことの重要性を示唆しているかもしれない。

(iii) 血液脳関門と ApoE

また、ApoE 受容体によって内皮細胞に取り込まれた A β は、血液脳関門を介して体循環系へ排出を担うことも示されている¹⁰⁾。こうした ApoE による A β 取り込みとその細胞内取り込み作用という脳内での ApoE 作用の他に、アルツハイマー病では血液脳関門の機能不全が起こっていること、ApoE 欠損マウスでは血液脳関門の透過性が上昇していること、などが示されており、血液脳関門形成や機能維持に ApoE が深く関わっている可能性がある¹⁰⁾ことから、脳内 A β の clearance の観点では脳内 ApoE-A β 複合体の細胞内取り込みから搬出の経路には、血液脳関門の機能不全も関わる可能性があるだろう。我々は最近、内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトの3種類の培養細胞からなる BBB モデルを確立し、ApoE3, ApoE4 の違いによる BBB 形成を tight junction 形成による電気抵抗値上昇を指標として評価した。その結果、ApoE4 型アストロサイトの培養系では ApoE3 に比して抵抗値は低値であった。また in vivo における BBB 透過性をエバンスブルー法により行ったところ、ApoE4 型マウスでは BBB 透過性の亢進が認められた。以上から、ApoE4 型脳では、BBB の機能障害(脆弱性)があることが示され、これが A β 搬出低下などと関連して AD 発症を早めている可能性がある¹¹⁾。また、脳内に存在するがその機能は不明であったリポタンパクリパーゼが、新規の A β 結合分子であり、A β の細胞内取り込みとその後の分解を促進することを発見した¹²⁾。この LPL によって促進する A β の取り込みと分解は、ApoE の存在に依存しないことを見出した。すなわち apoE-HDL 依存と非依存の機序で細胞外 A β は分解除去されることを示した。また、これらのことから LPL の代謝調節は治療標的になり得ると考えられる。

文 献

- 1) Dong, L.M., and Weisgraber, K.H. 1996. Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 271:19053-19057.
- 2) Weisgraber, K.H., and Shinto, L.H. 1991. Identification of the disulfide-linked homodimer of apolipoprotein E3 in plasma. Impact on receptor binding activity. *J Biol Chem* 266:12029-12034.
- 3) Gong, J.S., Kobayashi, M., Hayashi, H., Zou, K., Sawamura, N., Fujita, S.C., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. 2002. Apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human ApoE3 and ApoE4 knock-in mice. *J Biol Chem* 277:29919-29926.
- 4) Minagawa, H., Gong, J.S., Jung, C.G., Watanabe, A., Lund-Katz, S., Phillips, M.C., Saito, H., and Michikawa, M. 2009. Mechanism underlying apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent lipid efflux from neural cells in culture. *J Neurosci Res* 87:2498-2508.
- 5) Minagawa, H., Watanabe, A., Akatsu, H., Adachi, K., Ohtsuka, C., Terayama, Y., Hosono, T., Takahashi, S., Wakita, H., Jung, C.G. et al. 2010. Homocysteine, another risk factor for Alzheimer disease, impairs apolipoprotein E3 function. *J Biol Chem* 285:38382-38388.
- 6) Hayashi, H., Campenot, R.B., Vance, D.E., and Vance, J.E. 2004. Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J Biol Chem* 279:14009-14015.
- 7) He, X., Cooley, K., Chung, C.H., Dashti, N., and Tang, J. 2007. Apolipoprotein receptor 2 and X11 alpha/beta mediate apolipoprotein E-induced endocytosis of amyloid-beta precursor protein and beta-secretase, leading to amyloid-beta production. *J Neurosci* 27:4052-4060.
- 8) Wahrle, S.E., Jiang, H., Parsadanian, M., Kim, J., Li, A., Knoten, A., Jain, S., Hirsch-Reinshagen, V., Wellington, C.L., Bales, K.R., et al. 2008. Overexpression of ABCA1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* 118:671-682.
- 9) van Vliet, P., Oleksik, A.M., Mooijaart, S.P., de Craen, A.J., and Westendorp, R.G. 2009. APOE genotype modulates the effect of serum calcium levels on cognitive function in old age. *Neurology* 72:821-828.

- 10) Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M.B., Holtzman, D.M., and Zlokovic, B.V. 2008. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest* 118:4002-4013.
- 11) Nishitsuji, K., Hosono, T., Nakamura, T., Bu, G., and Michikawa, M. 2011. Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J Biol Chem* 286:17536-17542.
- 12) Nishitsuji, K., Hosono, T., Uchimura, K., and Michikawa, M. 2011. Lipoprotein lipase is a novel amyloid beta (Abeta)-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of Abeta in astrocytes. *J Biol Chem* 286:6393-6401.

この論文は、平成23年11月26日(土)第19回東北老年期認知症研究会で発表された内容です。

総説

アルツハイマー病の危険因子アポリポタンパク質 E4 の疾患発症の 分子機構に関する最近の知見と新薬開発への応用の可能性

道川 誠*

医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス

Vol. 44, No.1 別刷 (2013年)

一般財団法人 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス財団

アルツハイマー病の危険因子アポリポタンパク質E4の疾患発症の分子機構に関する最近の知見と新薬開発への応用の可能性

道川 誠*

Recent Findings of Molecular Mechanism(s) Underlying Apolipoprotein E4-mediated Progress in the Pathophysiology of Alzheimer Disease(AD) and its Application for AD Therapy

Makoto MICHIKAWA*

はじめに

アルツハイマー病 (AD) の最初の患者が報告されてから100年以上が経過した。症状改善薬はいくつか臨床現場に登場しているものの、未だに疾患の進行を抑制する疾患修飾薬はその多くが開発段階にある。治療薬開発には、AD病態の本質を解明し、その分子病態進行の鍵となる標的分子へのアプローチが必要となる。

AD発症の分子機構は、アミロイドカスケード仮説として理解されており、そこから派生する多くの治療標的が存在する。例えば、アミロイドベータ ($A\beta$) の産生、分解・除去、重合抑制などの他、認知症発症と関連が深いと考えられているタウタンパク質のリン酸化や重合体形成、シナプス機能維持や神経細胞死抑制などであり、これらを標的とした疾患進行を抑制する疾患修飾薬の開発が数多くなされている。

1993年に、アポリポタンパク E (ApoE) の対立遺伝子 $\epsilon 4$ が晩発性家族性アルツハイマー病で著しく高いことが報告され、その後、この傾向は孤発型アルツハイマー病でも確認された。 $\epsilon 4$ 遺伝子を多く持つほど発症の危険が増大し発症が早まること ($\epsilon 4$ アリル数依存性)、ApoE $\epsilon 4$ 遺伝子と脳内 $A\beta$ 沈着量の増加には正の相関があることが明らかにされ、ApoE $\epsilon 4$ の危険因子の意義として、 $A\beta$ 沈着との関連が強く示唆されている。しかし、ApoE の産

生や機能調節を標的とした治療法の開発には至っていない。

ApoE を標的にした予防・治療法の開発には、その構造ならびに構造に関連した機能解析が必要である。ApoE の構造と機能を明らかにし、それらを調節・制御する標的を攻略することによって予防・治療法を確立できる可能性がある。

1. ApoE の構造と機能

ApoE は 299 のアミノ酸から成る 34kDa のタンパク質であり、ApoE2, ApoE3, ApoE4 の主要な 3 つのアイソフォームが存在する。これらはそれぞれ 3 つの対立遺伝子 $\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$ の遺伝子産物である。ApoE2, ApoE3, ApoE4 の違いは、112 番目と 158 番目のアミノ酸が 1 つずつ異なることである。ApoE3 は 112 番目がシステインで 158 番目がアルギニンであるが、ApoE2 は両方ともシステインであり、ApoE4 は両方ともアルギニンである。このアミノ酸 1 つの違いが、ApoE の構造の違いを生じさせ、その結果、ApoE の機能の違いを生んでいると考えられる。これらの遺伝子多型の中で ApoE $\epsilon 3/\epsilon 3$ 型が最も多く (およそ全体の 50-70%)、 $\epsilon 3$ 遺伝子をもつ割合は全体の 70-80% に達すること、これに対して、 $\epsilon 2$ 及び $\epsilon 4$ の遺伝子頻度は、10-15% 及び 5-10% であることが示されている。先に述べたよ

* 名古屋市立大学大学院医学研究科病態生化学 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1 (〒467-8601)
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-city 467-8601, Japan

うに, ApoE2, ApoE3, ApoE4 のアイソフォームの違いは, 112 番目と 158 番目のアミノ酸が1つずつ異なることによって生じる。各 ApoE アイソフォームの違いはアミノ酸 1 分子の違いによるため, 理論的にはこれらアミノ酸の違いに起因する ApoE 構造の違いか, 異なるアミノ酸そのものの持つ作用の違いによる可能性が考えられる。

1.1 ApoE4 にみられる分子内相互作用

ApoE4 は 2 つの構造的ドメインを持つ。すなわち 22-kDa の N 末端側ドメイン (アミノ酸残基 1-191) と 10-kDa の C 末端側ドメインである。N 末端側ドメインは LDL 受容体結合領域を含み, C 末端側ドメインは脂質結合領域を含む。構造解析から, ApoE4 の N 末端側ドメインに存在する 112 番目のアルギニンと電気的に反発した 61 番目のアルギニンが, C 末端側ドメインに存在する 255 番目のグルタミン酸と salt bridge を形成して, コンパクトな 3 次構造を作ることが知られている。ApoE2 や ApoE3 ではアルギニン 61 は異なるコンフォメーションをとるので, N 末端側ドメインと C 末端側ドメインは開いた分子構造になると考えられている¹⁾。

この構造上の違いが, ApoE4 は粒子サイズの大きな VLDL と結合しやすいのに比べ²⁾, ApoE2 と ApoE3 は粒子サイズの小さな HDL に結合しやすいというアイソフォーム特異的作用の違いを生むと考えられている。

1.2 ApoE3 にみられる分子間相互作用

ApoE2, ApoE3, 及び ApoE4 は, それぞれ 2, 1 及び 0 個のシステインを持っている。そのため, ApoE2 及び ApoE3 は, disulfide 結合によってホモあるいはヘテロ 2 量体〜ポリマーを形成しうる。実際, 血漿中の ApoE3 の約 55% は 2 量体として存在するとされる³⁾。ApoE3 分子間の 2 量体形成は構造上大きな違いを生むため, ApoE 機能を左右すると考えられる。すなわち, 2 量体を形成した ApoE は, N 末端側ドメインならびに C 末端側ドメイン機能である受容体結合効率や脂質との結合効率などに影響を及ぼすと考えられる。

実際に 2 量体を形成した ApoE3 は, 単体に比べて HDL への結合親和性が有意に増加するとされ, われわれも, ApoE3 における 2 量体形成が ApoE3 による HDL 産生能に関与することを確認している³⁾。

2. 脳内における ApoE 産生とその制御

従来から, ApoE はアストロサイトやオリゴデンドロサイト, あるいは上皮細胞によって産生され, 神経細胞では産生されないと考えられてきた。しかし, アストロサイト

に比べれば濃度が低いものの, 脳内の神経細胞において ApoE が発現されることがタンパクレベル及び mRNA レベルで確認され, 低濃度で作用を持つことが示された。通常, 培養神経細胞から分泌される ApoE 濃度はウエスタンブロット解析の検出限度以下であり, 0.2 μ M 以上の濃度が必要なコレステロール搬出 (HDL 産生) 作用には関与しないのではないかと考えられる。したがって, 神経細胞での ApoE 産生の意義は, 低濃度でも効率的に働く別の機序に関わっていると考えられる。

一連の研究から, 神経細胞で産生される ApoE は, 神経細胞特異的に発現しているキモトリプシン様のプロテアーゼでアミノ酸残基 272 番目と 283 番目で切断され, その N 末端側断片に活性があるとされる。この断片はアルツハイマー病脳で高濃度に検出されるとされ, かつ ApoE4 の方がより切断を受けやすいとされる。その細胞障害機序の詳細は不明であるが, 細胞内ミトコンドリア障害を引き起こすと考えられている。神経細胞内 ApoE 産生は, 様々な病理学的状況—例えば毒性を持つ A β への曝露, 脳外傷, 酸化ストレス曝露などで促進されることから, 病的な脳内変化を受けて ApoE 産生が増加し, ApoE4 はより多くが断片化されて細胞死への過程を促進している可能性も考えられる。

3. 脳内コレステロール代謝の特異性と ApoE 機能

中枢神経系でのコレステロール代謝・輸送の持つ意義は, 脳を構成する脂質量の多さと神経系細胞構造の特殊性に由来する。特に, 神経突起の伸長やシナプス形成では, 細胞体からのコレステロール供給 (輸送) ではなく, 末端局所での HDL を介するコレステロール供給の果たす役割が大きい⁴⁾ ことが分かっている。

脳内コレステロール代謝を議論する際に注意すべき 2 つ目は, 体循環系と脳内との間には血液脳関門が存在するために, 脳内には体循環系とはその制御が異なった独自のコレステロール代謝系が存在する点である。例えば, 血液中には LDL, VLDL, IDL, HDL, カイロミクロンなどのリポタンパクが存在し, 血液中でそれぞれが運搬・代謝されているが, 中枢神経系 (脳脊髄液中) には HDL のみが存在する。これは, 血液脳関門によって血液中の LDL, VLDL, IDL, カイロミクロンなどのリポタンパクを脳内に入れられないためであり, 脳内では HDL が ApoE によって産生されるためである。別の言い方をすれば, 脳内脂質代謝系は, 血中の脂質代謝の直接の影響を受けにくいということである。

脳内コレステロール代謝を制御する主要な因子の 1 つが ApoE であり, ApoE が産生する HDL は ApoE 受容体を

介して細胞に取り込まれ再利用される。この HDL 産生作用が ApoE3 と ApoE4 では大きく異なり、ApoE3 は効率よく HDL を産生するが、ApoE4 はその作用が弱く ApoE3 に比べて半分以下の能力しかなく、その分子機構は ApoE の分子間ならびに分子内の相互作用による構造の違いによって説明できることを、私たちは明らかにした^{3, 5)}。

以下に記述するように、ApoE-HDL (=lipidated ApoE) は、Aβ と結合し Aβ の分解除去に働くことが明らかにされており、ApoE-HDL 量の調節は治療標的になると考えられる。もちろん脳内 Aβ の分解除去の経路は、ApoE-HDL に結合した Aβ の取り込み・分解だけではなく、ApoE 非依存性の経路として LDL 受容体を介する経路^{6, 7)}、ならびに lipoprotein lipase と結合した LRP1 を介する経路⁸⁾が知られている。

4. アルツハイマー病分子病態と ApoE

4.1 Aβ 除去・分解と ApoE

ApoE は、Aβ の輸送や代謝に関与すると考えられている。APP 代謝や Aβ 産生について、ApoE の関与やアイソフォーム特異性については合意が得られていないが、Aβ の分解・除去作用には深く関わっていると考えられている。Aβ の沈着が始まる前の若い APP トランスジェニックマウスでは、ApoE 欠損によって可溶性 Aβ レベルが上昇することが示されている⁹⁾。

また、lipidated ApoE と lipid free ApoE では、Aβ との結合結果が異なることが明らかにされた。生理的条件下では、ApoE は主に HDL 粒子と結合して存在する (lipidated ApoE) が、こうした ApoE は Aβ に対して、ApoE3 が ApoE4 の 20 倍以上の結合親和性を示すことが示された。実際、ApoE を含むリポタンパク粒子が、Aβ と結合し ApoE 受容体を介した細胞内への取り込みにより、Aβ 細胞内分解及び細胞外分解に貢献することが示され、しかもこの機能にアイソフォーム特異性があることが報告された^{10, 11)}。それによると、lipidated ApoE (ApoE-HDL) が Aβ の細胞内ならびに細胞外分解を促進すること (作用の強さは ApoE2 > ApoE3 > ApoE4 の順である)、HDL 産生を増強させる ABCA1 発現を増強させる LXR アゴニストを投与すると脳内 Aβ 沈着が減少し、記憶障害が改善することなどが、培養細胞ならびにモデルマウスを用いて明らかにされている。

逆に、ABCA1 ノックアウトマウスでは脳内 Aβ 沈着増加とする報告も複数あり、ApoE-HDL 産生が脳内 Aβ 沈着を左右することが示されている。

アルツハイマー病患者を両親に持つヒトの血漿中の ApoE レベルは、両親に患者を持たないヒトに比べて、

ApoE 遺伝子型に関係なく低下していること、更に ApoE ε2 > ε3 > ε4 の遺伝子型による違いがあったとされる¹²⁾。これが直ちに脳内 ApoE レベルでも同様の違いがあるかどうかは、今後の検討が必要だが、ApoE が低下すれば脳内 HDL 量も低下することになるため、ApoE-HDL を増やすことの重要性を示唆しているかもしれない。

4.2 血液脳関門と ApoE

また、ApoE 受容体によって内皮細胞に取り込まれた Aβ は、血液脳関門を介して体循環系へ排出されることが示されている¹³⁾。更に、アルツハイマー病では血液脳関門の機能不全が生じること、ApoE 欠損マウスでは血液脳関門の透過性が上昇していること、などが示されており、血液脳関門形成や機能維持に ApoE が深く関わっている可能性がある¹⁴⁾。

最近、こうした背景からわれわれは脳内 Aβ の clearance の観点から、脳内 ApoE-Aβ 複合体の細胞内取り込みから搬出の経路には、血液脳関門の機能不全も関わる可能性について検討した。昨年われわれは、ApoE3、ApoE4 をそれぞれ発現するマウスから培養したアストロサイトを使用して、血液脳関門モデルを確立し、血液脳関門形成における ApoE のアイソフォーム特異性を検討した。その結果、ApoE4 モデルでは、ApoE3 モデルに比べて、血管内皮細胞同士で形成する tight junction 形成が不完全であることを見いだした¹⁵⁾。また、ApoE3 及び ApoE4 ノックインマウスを用いた実験から、ApoE4 ノックインマウスの脳では、血液脳関門の脆弱性が示された。われわれの培養系では、アストロサイトと血管内皮細胞は、空間的に離れて培養しているため、ApoE の効果は、おそらく ApoE-HDL のような分泌性の因子によるものと考えられた。

ApoE と血液脳関門形成・機能維持との関連は、今年になって更に報告があった¹⁶⁾。血液脳関門は、脳内 Aβ を脳外に排出する主要な経路の 1 つであるため、ApoE による血液脳関門形成や機能維持にアイソフォーム特異性が見られれば、アルツハイマー病発症に関与する作用点として重要であると考えられる。また、血液脳関門形成や機能維持・調節には、血液側からのアプローチも考えられ、必ずしも脳内に到達する薬剤でなくとも血液脳関門機能制御を通じて脳内 Aβ 排出を調節できる可能性があり、創薬開発は容易になるかもしれない。

以上のように、ApoE の作用調節ならびにそれによる脂質代謝の調節によって動く細胞内シグナル分子の解明は、血液脳関門機能調節という新たな創薬の作用点になる可能性がある。

4.3 ミトコンドリアと ApoE

一方、ミトコンドリア障害は、アルツハイマー病脳に認められる障害の1つであり、特に ApoE4 型のヒトで報告されている。C 末端側が切断された ApoE (1-272) は、ミトコンドリアに局在し、その機能障害を引き起こすことが示されている。C 末端側を切断する酵素は、神経細胞に特異的に発現し、また ApoE4 が切断を受けやすいことが示されており、ApoE4 特異的にミトコンドリア障害ならびに学習記憶障害を引き起こすとしている。筆者らの検討でも、ApoE (1-272) を発現させるとミトコンドリア関連タンパクと結合し、ミトコンドリア障害を生じることが明らかになっている¹⁷⁾。少なくとも、細胞内における ApoE 発現を強めると、上記のような現象が起こることは確からしいが、生理的条件下で、分泌タンパクである ApoE がどのような機構で細胞質に移行し、タウタンパクやミトコンドリアと関係するかについての機構説明が必要である。

ただし、コレステロール輸送障害に起因するタウオパチーを来す疾患である Niemann-Pick type C1 病モデルマウスにおいて、われわれはコレステロール代謝変動によるタウオパチーとミトコンドリア障害を見いだした^{18, 19)}。これらの結果は、ライソゾーム系に蓄積するコレステロールが細胞質、あるいはミトコンドリア膜に輸送する経路が存在することを示唆している。

5. 認知能力と ApoE

ApoE 欠損マウスにヒト ApoE3, ApoE4 を発現したマウス(ノックインマウス)を用いた研究により、ApoE4 ノックインマウスは学習能力が低下していることが示されている。この学習障害は加齢とともに増悪し、メスのみ見られたという。また、ApoE 欠損マウス脳でも加齢依存的な神経細胞変性がみられたが、ApoE3 はこれを抑制し、ApoE4 は抑制しなかったという。ApoE3, ApoE4 のトランスジェニックマウスの解析では、ApoE4 型マウスではアルツハイマー病病理がないにもかかわらず、著しい記憶の低下が見られたとされる。

もし、ApoE のみで認知機能にアイソフォーム依存的な違いを生じるとすれば、危険因子 ApoE4 の意義は神経機能の脆弱性を引き起こすことでアルツハイマー病発症の閾値を下げている可能性がある。同様のことがヒトでも生じているかどうかについては慎重な解析が必要である。

2012年6月にフロリダのジャクソンビルにあるメイヨークリニックで開催された ApoE シンポジウムで、若い人を対象として知能試験を行ったジョータウン大学からの研究発表があり、ApoE4 型では ApoE3 型に比べてある種の認知機能の低下が見られたとのことであった。この

結果は、若年でも認知機能にアイソフォーム特異性があることを示唆しており、マウスで見られた ApoE アイソフォーム特異的な認知機能低下と一致した結果であるが、今後、慎重に検討する必要がある。

文 献

- 1) Dong L.M., Weisgraber K.H. : Human apolipoprotein E4 domain interaction. Arginine 61 and glutamic acid 255 interact to direct the preference for very low density lipoproteins. *J Biol Chem*, 271, 19053-19057 (1996).
- 2) Weisgraber K.H., Shinto L.H. : Identification of the disulfide-linked homodimer of apolipoprotein E3 in plasma. Impact on receptor binding activity. *J Biol Chem*, 266, 12029-12034 (1991).
- 3) Minagawa H., Gong J.S., Jung C.-G., Watanabe A., Lund-Katz, Phillips M.C., Saito H., Michikawa M. : Mechanism underlying apolipoprotein E (ApoE) isoform-dependent-Lipid efflux from neural cells in culture. *J Neurosci Res*, in press. (2009).
- 4) Hayashi H., Campenot R.B., Vance D.E., Vance J.E. : Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *J Biol Chem*, 279, 14009-14015 (2004).
- 5) Gong J.S., Kobayashi M., Hayashi H., Zou K., Sawamura N., Fujita S.C., Yanagisawa K., Michikawa M. : Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice. *J Biol Chem*, 277, 29919-29926 (2002).
- 6) Basak J.M., Verghese P.B., Yoon H., Kim J., Holtzman D.M. : Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of Abeta uptake and degradation by astrocytes. *J Biol Chem*, 287, 13959-13971 (2012).
- 7) Castellano J.M., Deane R., Gottesdiener A.J., Verghese P.B., Stewart F.R., West T., Paoletti A.C., Kasper T.R., DeMattos R.B., Zlokovic B.V., Holtzman D.M. : Low-density lipoprotein receptor overexpression enhances the rate of brain-to-blood Abeta clearance in a mouse model of beta-amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 15502-15507 (2012).
- 8) Nishitsuji K., Hosono T., Uchimura K., Michikawa M. : Lipoprotein lipase is a novel amyloid beta (Abeta)-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of Abeta in astrocytes. *J Biol Chem*, 286, 6393-6401 (2011b).
- 9) Dodart J.C., Bales K.R., Johnstone E.M., Little S.P., Paul S.M. : Apolipoprotein E alters the processing of the beta-amyloid precursor protein in APP (V717F) transgenic mice. *Brain Res*, 955, 191-199 (2002).
- 10) Koistinaho M., Lin S., Wu X., Esterman M., Koger D., Hanson J., Higgs R., Liu F., Malkani S., Bales K.R., Paul S.M. : Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med*, 10, 719-726 (2004).
- 11) Jiang Q., Lee C.Y., Mandrekar S., Wilkinson B., Cramer P., Zelcer N., Mann K., Lamb B., Willson T.M., Collins J.L., Richardson J.C., Smith J.D., Comery T.A., Riddell D., Holtzman D.M., Tontonoz P., Landreth G.E. : ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*, 58, 681-693 (2008).