

む)

1. 特許取得

特許登録

1. 発明の名称 画像診断支援システム及び方法

特許第 5107538 号

特許登録日 2012年10月12日

発明者 百瀬 敏光、相馬 努、桜井 晃臣

特許出願

1. 発明の名称 脳断層動態画像解析装置

特許出願番号 特願 2012-190107

特許出願日 2012年8月30日

発明者 百瀬 敏光、佐藤 友彦、相馬 努、齋藤 大輔、高橋 美和子、大垣 慶介

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
研究事業）

（総括・分担）研究報告書

多系統萎縮症のコエンザイム Q10 を用いた治療に関する研究

研究分担者 辻 省次、後藤順、三井純

研究要旨：多系統萎縮症の発症に関与する遺伝的要因を解明するために、多系統萎縮症多発家系 6 家系について、連鎖解析、全ゲノム配列解析を実施し、2 家系で、COQ2 遺伝子にホモ接合性、あるいは、複合ヘテロ接合性変異を見出した。さらに、孤発性多系統萎縮症においても、機能障害性の COQ2 変異が、多系統萎縮症発症のリスクを高めることが示された。今後、コエンザイム Q10 を用いた臨床治験の実現に向けて、準備を進めていく。

分担研究者

辻 省次：東京大学医学部附属病院神経内科 教授

後藤順：東京大学医学部附属病院神経内科准教授

三井純：東京大学医学部附属病院神経内科助教

A 研究目的

多系統萎縮症 (multiple system atrophy, MSA) は、大部分が孤発性で、あるが、一部に多発家系が存在することが知られている。MSA は、小脳失調、パーキンソニズム、自律神経症状などをさまざまな組み合わせで発症する疾患で、病因は未解明である。本研究では、全ゲノム解析/exome 解析に基づき、MSA の発症に関わるゲノム要因を明らかにし、解明された病態機序について、疾患の進行を抑制する治療法を開発することを目的としている。上記の目的を達成するために、1. MSA の多発家系の連鎖解析と全ゲノム配列解析を実施し、病因遺伝子の同定を目指す、2. 多発家系で見出された遺伝子について、孤発性 MSA の発症リスクを高めるかどうかについて検討する、3. これらの成果に基づき、MSA に対する臨床治験を実施すること、を目的としている。

B 研究方法

多系統萎縮症のゲノム解析：MSA 多発家系について、連鎖解析、全ゲノム配列解析を実施し、病因遺伝子の探索を進め、孤発性多系統萎縮症 (758 例) およびコントロール (1129 例) における関連解析を実施した。

臨床治験のプロトコールの検討：コエンザイム Q10 を用いた臨床治験のプロトコールの作成についての検討を行った。

C 研究結果

多系統萎縮症多発家系の6家系中2家系でCOQ2遺伝子にホモ接合性、あるいは、複合ヘテロ接合性変異を見出した。孤発性多系統萎縮症においても、機能障害性のCOQ2変異が、多系統萎縮症発症のリスクを高めることが示された。(V343A変異：odds ratio = 3.05 (95% CI 1.65-5.85, その他の機能障害性変異：odds ratio = 11.97 (95% CI 1.60-531.52))

コエンザイムQ10を用いた臨床治験の実施に当たって検討すべき項目として、コエンザイムQ10のbioavailabilityの検討, formulationの検討, 薬物動態に関する検討, 臨床評価スケールについての検討, surrogate markerの検討などが必要であると考えられた。

D 考察

COQ2遺伝子は、コエンザイムQ10の合成系の酵素をコードしており、機能障害性のCOQ2遺伝子変異により、コエンザイムQ10の合成の低下、その結果として、ミトコンドリアにおける電子伝達系の障害、ATP産生の低下、あるいは、酸化ストレスに対する脆弱性の亢進などが病態機序として想定される。

コエンザイムQ10は疎水性であるために、消化管からの吸収、さらには、中枢神経系への移行が十分に達成できるかどうかを、コエンザイムQ10のformulation, 投薬量について検討をする必要がある。また、緩徐進行性の神経変性疾患について、臨床治験におけるエンドポイントをどのように設定するかが検討課題であり、surrogate markerの確立が望まれる。

E 結論

MSAの発症リスクを高める遺伝子として、COQ2を同定した。今後、コエンザイムQ10の投与に基づく、臨床治験を実施できるように進めていく。

F 健康危険情報

該当なし

G 研究発表

論文発表

Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Gen Sobue Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Hananosato MV, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Parkinson U, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Parkinson U, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S.

Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. N Engl J Med. 2013; 369:
233-244

学会発表

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3.その他

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
本橋慧樹、福元宏明、森豊隆志、岩坪威	創薬におけるバイオマーカーの重要性	実験医学2014年2月	Vol.32 No.2	86-92	2014
Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, Isshiki H, Takeo K, Tomita T, <u>Iwatsubo T</u>	FTY720/Fingolimod, a sphingosine analogue, reduces amyloid- β production in neurons.	PLOS One 8	e64050		2013
Maikusa N, Yamashita F, Tanaka K, Abe O, Kawaguchi A, Chiba S, Kasahara A, Kobayashi N, Yuasa T, Sato N, Matsuda H, <u>Iwatsubo T</u> and the Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative	Improved volumetric measurement of brain structure with a distortion correction procedure using an ADNI phantom.	Medical Physics	40	062303	2013
Takahashi R, Ishii K, Senda M, Ito K, Ishii K, Katoh T, Makishi Y, Nishio T, Ikari Y, <u>Iwatsubo T</u> ; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.	Equal sensitivity of early and late scans after injection of FDG for the detection of Alzheimer's disease: an analysis of 3D PET data from the ADNI, a multi-center study.	Ann Nucl Med in press			

Doody RS, Raman R, Siemers E, Sethuraman G, Moshes R for the Selegiline Study Group, Farlow M, <u>Iwatsubo T</u> , Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS for the Alzheimer's Disease Cooperative Study Steering Committee	A phase three trial of selegiline for treatment of Alzheimer's disease.	N Engl J Med	369	341-350	2013
Goto M, Abe O, Aoki S, Hayashi N, Miyati T, Takao H, <u>Iwatsubo T</u> , Yamashita F, Matsuda H, Mori H, Kunimatsu A, Ino K, Yano K, Ohtomo K; Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.	DARTEL provides reduced effect of scanner for cortex volumetry with atlas-based method in healthy subjects.	Neuroradiology	55	869-875	2013
Kobayashi S, <u>Momose T</u> , Sakurai M, Kanazawa I.	Postanoxic Akinesia with Bilateral Pallidal Lesions: A PET Study.	Intern Med.	51(17)	2449-51	2012
Hibi S, Yamaguchi Y, Umeda-Kameyama Y, Yamamoto H, Iijima K, <u>Momose T</u> , Akishita M, Ouchi Y.	The high frequency of periodic limb movements in patients with Lewy body dementia.	J Psychiatr Res	46(12)	1590-1594	2012
Takahashi M, Soma T, Kawai K, Koyama K, Ohtomo K, <u>Momose T</u> .	Voxel-based comparison of preoperative FDG-PdPET between mesial temporal lobe epilepsy patients with and without postoperative seizure-free outcomes.	Ann Nucl Med	26	698-706	2012

Soma T, Momose T, Takahashi M, Koyama K, Kawai K, Murase K, Ohtomo K.	“Usefulness of extent analysis for statistical parametric mapping with asymmetry index using inter-ictal FGD-PET in mesial temporal lobe epilepsy”	Ann Nucl Med 2012	26(4)	319-26	2012
新井 憲俊、横地 房子、大西隆、百瀬 敏光、沖山 亮一、谷口 真、高橋 宏、松田 博史、宇川 義一	1側の視床下核刺激でも両側の症状の改善をみる機序について：PETを用いた研究	ジストニア 2012 長谷川一子 編 中外医学社		228-230	2012
百瀬 敏光	PET装置による分子イメージングと放射免疫療法の開発	新機能抗体 開発ハンド ブック 窪 隆雄 監		369-373	2012
荒井 拓也、百瀬 敏光	ラジオアイソトープによるモノクローナル抗体の標識	新機能抗体 開発ハンド ブック 窪 隆雄 監		374-378	2012
北田 孝幸、百瀬 敏光	PET/SPECTを用いたin vivo イメージング技術	新機能抗体 開発ハンド ブック 窪 隆雄 監		379-382	2012
北田 孝幸、山 桂太郎、原 健太郎、橋 美和子、百瀬 敏光	PET装置を利用した分子イメージング法の紹介：高分解能小動物用PET/PET-CT装置の応用	放射線生物 研究	48(1)	82-100	2013
百瀬 敏光	神経伝達機能イメージング	Annual Review Neuroscience 2013 鈴木 則宏、 他 編、 中外医学社		51-62	2013
百瀬 敏光、高橋 美和子	間脳・下垂体の核医学検査	ビジュアル 脳神経外科6 間脳・下垂 体・傍鞍部 斉藤 延人 編 メジカルビ ュー社		80-91	2013
百瀬 敏光	診療に役立つ核医学の基本「脳神経核医学 臨床編その1」	臨床核医学	46-1	8-12	2013

百瀬 敏光	診療に役立つ核医学の基本「脳神経核医学 臨床編その2」	臨床核医学	46-2	23-26	2013
Tsuji S. 他 発表者多数につき、 詳細は欄外参照(※)	Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy.	N Engl J Med	369:	233-44.2	2013

(※) 発表者

Mitsui J, Matsukawa T, Ishiura H, Fukuda Y, Ichikawa Y, Date H, Ahsan B, Nakahara Y, Momose Y, Takahashi Y, Iwata A, Goto J, Yamamoto Y, Komata M, Shirahige K, Hara K, Kakita A, Yamada M, Takahashi H, Onodera O, Nishizawa M, Takashima H, Kuwano R, Watanabe H, Ito M, Gen Sobue Sobue G, Soma H, Yabe I, Sasaki H, Aoki M, Ishikawa K, Mizusawa H, Kanai K, Hattori T, Kuwabara S, Arai K, Koyano S, Kuroiwa Y, Hasegawa K, Yuasa T, Yasui K, Nakashima K, Ito H, Hananosato MV, Izumi Y, Kaji R, Kato T, Kusunoki S, Osaki Y, Horiuchi M, Kondo T, Murayama S, Hattori N, Yamamoto M, Murata M, Satake W, Toda T, Dürr A, Brice A, Filla A, Klockgether T, Wüllner U, Nicholson G, Gilman S, Shults CW, Tanner CM, Kukull WA, Lee VM, Parkinson U, Masliah E, Low PA, Sandroni P, Trojanowski JQ, Parkinson U, Ozelius L, Foroud T, Tsuji S.

6. 創薬におけるバイオマーカーの重要性

本橋慧樹, 福元宏明, 森豊隆志, 岩坪 威

アカデミアにおける基礎研究から見出される創薬シーズを実用化する昨今の動きは、研究成果を社会還元するうえで、ますます重要視されている。創薬活動を効率よく行うためには、実験室での基礎研究から臨床開発までの各ステージを通じて、適切なバイオマーカーを利用することが重要である。本稿では、創薬活動においてバイオマーカーが果たすさまざまな役割を具体例をあげて紹介する。また、高齢化社会のなかで増え続けるアルツハイマー病に対するバイオマーカーの研究・開発の最新の状況を、われわれの活動内容も含めて紹介する。

はじめに

創薬コンセプトの発案から医薬品として臨床使用されるまでには、いくつもの関門がある。本稿では、創薬活動のさまざまな局面で有用となりうるバイオマーカーについて、最新の研究状況、行政当局の考え方を含めて紹介する。本稿が今後のアカデミア発の創薬活動の一助になれば幸いである。

1 バイオマーカーの定義

バイオマーカーは「正常な生物学的過程、発病過程、もしくは治療的介入に対する薬理学的反応を示す指標として客観的に測定され、評価されるもの」と定義される¹⁾。創薬活動におけるバイオマーカーは、分子レ

ベルでは、タンパク質（生理活性物質、薬物代謝酵素、標的受容体産物、受容体リガンド、抗体など）、ペプチド、糖類、脂肪酸、DNA、RNA（miRNA、shRNAなども含む）があげられる。また、臨床の現場で繁用されている各種臨床検査項目（AST、ALT、グルコース、尿酸、ビリルビン、トリグリセリド、コレステロール、血清クレアチニン、各血球細胞数など）、画像データ（MRI、fMRI、PET、CT、X線画像など）、血圧、心電図、骨密度などもバイオマーカーといえる。

2 創薬活動における各ステージでのバイオマーカーの役割

創薬の研究・開発活動は、一般的に図1に示すような流れをたどる。着想から医薬品としての承認まで約

【キーワード&略語】

バイオマーカー, アルツハイマー病, J-ADNI

AD: Alzheimer's disease (アルツハイマー病)

J-ADNI: Japanese Alzheimer's Disease

Neuroimaging Initiative

(日本アルツハイマー病脳画像診断先導的研究)

MCI: mild cognitive impairment

(軽度認知障害)

NOAEL: no observed adverse effect level

(最大無毒性用量)

Importance of biomarker on drug discovery and development

Keiju Motohashi/Hiroaki Fukumoto/Takashi Moritoyo/Takeshi Iwatsubo: Unit for Early and Exploratory Clinical Development, The University of Tokyo Hospital (東京大学医学部附属病院早期・探索開発推進室)

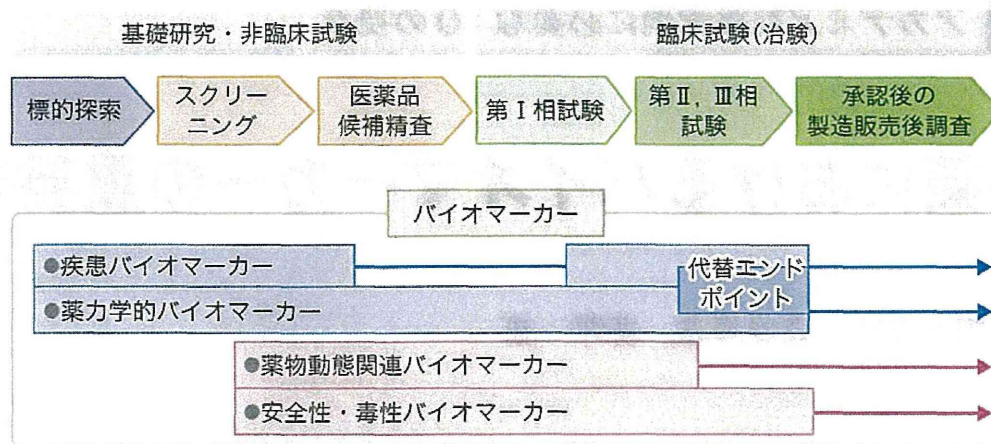


図1 創薬活動の種々のステージで用いられるバイオマーカー

10～20年が必要とされるなか、図1にあげた疾患バイオマーカー、薬力学的バイオマーカー、薬物動態関連バイオマーカーおよび安全性・毒性バイオマーカーは、薬剤候補を最終的に絞り込む際や、臨床試験における評価で重要な役割を果たす。以下に各バイオマーカーについて紹介する。

1) 疾患バイオマーカー

疾患の発症から進行過程を反映する疾患バイオマーカーは、疾患の診断、進行度や予後の評価、創薬ターゲットの決定、*in vitro* または *in vivo* のスクリーニング系の構築、当該治療薬による効果を期待できる患者の特定、臨床試験での有効性の評価などに利用されるため、創薬活動において非常に重要である。以下に代表的な疾患バイオマーカーの例を紹介する。

i) 生活習慣病の疾患バイオマーカー

高血圧症、糖尿病、脂質異常症に代表される生活習慣病においては、創薬活動におけるバイオマーカーの利用が必要不可欠である。高血圧症における血圧、糖尿病における血糖・HbA1c、脂質異常症におけるLDLコレステロールが代表的な疾患バイオマーカーとして診断に用いられている。さらに、これらのバイオマーカーと死亡リスクや心血管イベント発現との関連が多くの大規模臨床試験において明らかにされており、臨床において、これらのバイオマーカーの変化が、病態の悪化や治療効果を反映する指標として用いられている。創薬活動においても、化合物のスクリーニングから臨床試験での被験者選択、後述する有効性評価のための代替エンドポイントまで、これらのマーカーが活

用されている。

ii) がん疾患バイオマーカー

がんの有無、大きさ、進行度を画像診断で特定する方法として、従来CTやMRI、超音波検査などが用いられてきた。近年では、がん細胞では糖代謝が異常に高いという性質を利用した¹⁸F-FDG-PETが臨床で普及してきている。従来の画像診断では難しい初期のがん組織も検出できるなどの利点があるが、検査費用が高い、がん細胞以外の糖代謝の高い組織や炎症部位も陽性シグナルを示すなどの課題もある。

また、がんの原因が多くの研究により明らかにされ、細胞内増殖シグナル関連遺伝子の過剰発現や変異などによることがわかってきた。そして、それら遺伝子産物に対するモノクローナル抗体や同遺伝子産物である酵素・受容体に対する低分子薬剤が次々と開発されている(表1)。

疾患バイオマーカーは、適切な薬剤処方のための患者選択にも利用される³⁾。薬剤の標的となる遺伝子変異のない患者に対して当該薬剤を投与しても効果が期待できないことから、薬剤の投与前に、当該遺伝子変異の有無を明らかにする必要がある。実際、trastuzumabの投与時のHER2過剰発現の検査、crizotinib投与時のALK融合遺伝子の検査などが必須とされている。

このように、ある医薬品の効果を得やすい患者の特定や投与量選択の基準に用いられ、当該医薬品を安全で有効に使用可能とする体外診断薬をコンパニオン診断薬という。欧米の規制当局からコンパニオン診断薬の開発に関するガイダンス案が公表されており^{4)~6)}、

表1 各がんに対する疾患バイオマーカーと抗がん剤

バイオマーカー		がん	薬剤	薬剤標的
HER2	遺伝子増幅	乳がん	trastuzumab	HER2
エストロゲン受容体	タンパク質発現	乳がん	tamoxifen	エストロゲン受容体
BCR-ABL	遺伝子転座	慢性骨髄性白血病	imatinib dasatinib nilotinib	BCR-ABL
EGFR ± KRAS	KRAS 変異	大腸がん	cetuximab pantitumumab	EGF 受容体
EGF 受容体	リン酸化部位変異	非小細胞性肺がん	erlotinib gefitinib	EGF 受容体
PML-RAR	遺伝子転座	急性前骨髄球性白血病	オールトランス型 レチノイン酸	PML-RAR
BECA1/2	遺伝子変異	乳がん	olaparib veliparib	PARP
BRAF V600E	遺伝子変異 (V600E)	メラノーマ	vemurafenib	BRAF
ALK	遺伝子再編成	非小細胞性肺がん	crizotinib	ALK

文献2をもとに作成

本邦においても個別化医療を進めるため、ガイドン
ス案の作成を含め積極的な取り組みが進められている⁷⁾。

2) 薬力学的バイオマーカー

薬剤標的分子、あるいは、標的分子の情報伝達カ
スケード下流にある関連分子そのものが薬力学的バイオ
マーカーとなる。また、薬剤により改善する疾患バイ
オマーカーも薬力学的マーカーとなりうる。

糖尿病治療薬のDPP-IV阻害剤は、糖尿病にみられ
る低インスリン状態の改善を目的とし、膵臓β細胞か
らのインスリン分泌を増加させるGLP-1およびGIPの
分解を抑制することでGLP-1とGIPを増加させ、イン
スリン分泌促進およびグルカゴン濃度低下作用を發揮
する。DPP-IV阻害剤の薬力学的バイオマーカーは、
GLP-1およびGIPに加えてその下流分子であり、疾患
バイオマーカーでもあるインスリン、血糖値やHbA1c
も該当する。近年承認されたシダグリブチン、アログ
リブチン、ビルダグリブチンなどの薬効薬理試験およ
び臨床薬理試験で、これらのバイオマーカーが利用さ
れ、適切な用法・用量の推定などに活用されている⁸⁾。

3) 薬物動態関連バイオマーカー

薬物動態関連バイオマーカーは、薬物の体内動態に
影響を与える分子で、当該薬物に特有の薬物代謝酵素
や薬物トランスポーターなどが相当する。患者の代謝
関連分子の遺伝的相違により薬物の曝露量が大きく変

動する場合があります。至適用法・用量の判断に用いられ
ている。

血液抗凝固剤であるワルファリンは至適用量の個人
差が大きく、血液凝固能（プロトロンビン時間）でモ
ニタリングし、個々の用量が決められている。これに
加え、最近、代謝酵素であるCYP2C9および標的酵素
であるVKORC1に遺伝子多型があることがわかり、各
患者の遺伝子多型の相違が安全性・有効性に大きく影
響することが明らかにされた。したがって、米国では
これらの遺伝子多型の組み合わせにより推奨投与量が
決められている（表2）⁹⁾。

4) 安全性・毒性バイオマーカー

非臨床試験の早期から、薬物の毒性や安全性は慎重
に検討されている。安全性・毒性バイオマーカーとし
ては、各臨床検査（電解質、肝酵素、腎機能、筋酵素
などの測定）や、バイタルサイン、心電図、GFR（糸
球体濾過量）などがあげられる。安全性・毒性バイ
オマーカーは、臨床的な機能低下・異常を早期に予見・
検出できるものであり、また、各機能臓器などに対す
る毒性の程度を反映するものである。

毒性試験では、動物に対し推定される臨床用量より
も十分高い用量までの安全性を検討し、算出された最
大無毒性用量（no observed adverse effect level：
NOAEL）が臨床用量の推定に用いられる。各臓器に

表2 CYP2C9およびVKORC1 遺伝子型によるワルファリン1日あたりの推奨投与量 (mg/日)

VKORC1 : -1639G>A	CYP2C9*1/*1	CYP2C9*1/*2	CYP2C9*1/*3	CYP2C9*2/*2	CYP2C9*2/*3	CYP2C9*3/*3
GG	5~7	5~7	3~4	3~4	3~4	0.5~2
GA	5~7	3~4	3~4	3~4	0.5~2	0.5~2
AA	3~4	3~4	0.5~2	0.5~2	0.5~2	0.5~2

文献9をもとに作成

対する毒性を鋭敏にとらえられるバイオマーカーの利用は、適切な臨床用量を推定するうえで重要である。

近年、薬剤誘発性急性腎障害の検出において従来のバイオマーカー (sCrおよびBUN) に比べより高い感度・特異性を有するKim-1 (kidney injury molecule-1)¹⁰⁾などの毒性バイオマーカーが開発され、後述する「適格性確認」が日米欧の規制当局によってなされている。

5) 治験での効果を判定するバイオマーカー

薬剤の治療効果を判定するうえで最も重要となる指標は、生命予後の改善や心血管イベント、合併症の発現など、臨床的な転帰を評価する臨床的エンドポイント (clinical endpoint) である。一般に、臨床的エンドポイントの評価には大規模・長期間の臨床試験が必要となる。これに対し、代替エンドポイント (図1) は、「疫学、治療学、病態生理学、あるいはほかの科学的根拠に基づき、臨床的エンドポイントを予測するもの」と定義され、小規模・短期間で評価可能な、個々の患者の病態を鋭敏に反映するバイオマーカーが、薬剤の有効性の評価に用いられる。

薬力学的バイオマーカーであり、疾患バイオマーカーでもあるHbA1cや血圧、LDLコレステロール値が代替エンドポイントとして利用されている。しかしながら、複雑な疾患メカニズムや予期しない薬剤の作用などの影響も相まって、バイオマーカー変化が臨床的エンドポイントを必ずしも反映しない場合も多い。たとえば糖尿病治療薬の開発においては、米国食品医薬品局 (FDA) は代替エンドポイントであるHbA1cの評価に加えて心血管イベントの発生リスクを臨床試験において評価することを求めている。薬剤の有効性・安全性の評価においては、各臨床検査値や有害事象の発現状況を考慮しつつ、代替エンドポイントに対する作用のみならず、臨床的エンドポイントに対する影響も

総合的に検討する必要がある。

3 バイオマーカーを利用する際の留意点

医薬品開発のさまざまな過程でバイオマーカーは必要不可欠であり、アカデミア発の創薬においても開発段階に応じて適切な利用が求められる。一方で、バイオマーカーが誤った判断を導く可能性を常に考慮しておく必要がある。バイオマーカーの正確な測定を行うために、測定値に影響を与える因子の検討、特に適切な検体のサンプリング法・保存法・測定法などに十分な品質管理が求められる。また、医薬品開発を進めるにあたっては、使用するバイオマーカーが、目的とする生物学的過程、反応または事象を適切に反映しうると判断され、その使用が規制当局にも支持されていること (適格性確認) が重要である。適格性確認がなされないまま医薬品開発を進めた場合、承認審査の段階で取得データが認められないことも起こりうる。バイオマーカーの適格性確認については、日米EU医薬品規制調和国際会議 (ICH) によるICH-E16ガイドライン¹¹⁾を参照されたい。

4 アルツハイマー病におけるバイオマーカー

現在、アルツハイマー病 (AD) に対して複数の症候改善薬が承認されているが、神経細胞死やシナプス変性を抑制し、病態進行そのものを抑える疾患修飾薬は、いまだ開発途上にある。この疾患修飾薬の研究・開発と併行し、ADの疾患バイオマーカーおよび発症過程に関する臨床研究が盛んに行われている。ここではADのバイオマーカーに関するわれわれの臨床研究を含めて、最新的话题を紹介する。

1) 疾患修飾薬開発の現状

ADの発症^{12) 13)}には、AD病理像の老人斑の主要構成成分であるアミロイドβペプチド (Aβ) が関係し

ている。これまで主にA β を標的とする疾患修飾薬の開発が進められてきたが、いまだ明確な有効性を示した薬剤はない。

A β 産生にかかわる γ セクレターゼの阻害剤であるsemagacestatは、脳内A β を約25%低下させる用量で患者の認知機能を悪化させ、末梢では皮膚がんのリスクを増加させる結果となった。これは γ セクレターゼがA β 産生にかかわる基質（APP：アミロイド前駆体タンパク質）以外にNotchをはじめとする数十の基質を有し、それらを阻害したことによると考えられている¹⁴⁾。また、A β に対する抗体を用いて脳内のA β を除去するbapineuzumabやsolanezumabも、軽度～中等度AD認知症患者において明確な有効性は示されなかった¹⁵⁾。

脳内におけるA β の蓄積は、認知症の前段階である軽度認知障害（MCI due to AD）や、より早期段階で「症状はないが病理学的変化が生じている段階」であるpreclinical ADの段階から起きていると考えられている。このため、認知機能が低下し臨床症状が顕著となる認知症の段階では、神経細胞の変性・脱落がすでに進行してしまっているため、治療介入のタイミングとしては遅いとの考え方もなされている。したがって、認知症発症後の患者のみならず、臨床症状が明確でない早期段階も含めてバイオマーカーを利用した正確な診断を行うことが求められている。そのうえで、各薬剤の特徴を踏まえて臨床試験で適切な対象患者を選択することが、疾患修飾薬を開発するうえで重要である。

2) バイオマーカー探索の現状

米国では2005年からADの発症・進行過程を研究すべく“Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)”が開始され、ADの病理学的背景を有する軽症AD患者200例、健忘型MCI 400例、および健康高齢者200例を対象として、数年にわたり、6～12カ月おきにバイオマーカーの推移が評価された。すなわち、MRIによる脳容積測定、FDG-PETによる脳代謝画像、アミロイドイメージングなどの画像バイオマーカー、脳脊髄液（CSF）・血液などの生化学的バイオマーカーが臨床・神経心理検査とともに評価された。これらのデータはウェブサイト上にデータベースとして公開され、世界的に研究に利用されている。

本邦においても、米国と同様のプロトコルでJ-ADNI

(Japanese ADNI)が2008年より開始され、軽症AD患者150例、健忘型MCI 300例、健康高齢者150例を対象としたバイオマーカー研究が行われている（図2）¹⁶⁾。すでに被験者リクルートは終了しており、現在データ公開のための準備を進めている。一部の解析結果も発表され、すでに米国で公表されている結果との類似点もわかってきている。

これらの結果を含め、各ADバイオマーカーが医薬品開発において果たす役割と課題について以下に紹介する。

i) 臨床診断

認知症の原因疾患として最も多いものがADであるが、その他にも血管性認知症、前頭側頭型認知症、レビー小体型認知症などが存在する。ADの診断にあたってはこれらの疾患との鑑別が重要であるが、臨床症状のみに基づく鑑別は困難である。従来、CTやMRIなどの画像バイオマーカーが鑑別に用いられてきたが、これらに加え、PETを用いたアミロイドイメージングによる脳内A β の蓄積、CSF中のA β 42の低下およびタウ・リン酸化タウの増加、FDG-PETによる側頭頂葉の代謝機能低下などのADに特徴的な所見をとらえることができるようになり、診断精度の向上が期待されている。

また、MCI due to ADやpreclinical ADではAD認知症への進行リスクの評価にもこれらのバイオマーカーが有用であることが示唆されている。臨床試験の限られた期間で薬剤の効果を検出するためには、認知症への進行速度がより速い患者を組み入れることが望ましく、このような進行リスクの評価に最適なバイオマーカーについても研究が進められている¹⁷⁾。また、preclinical ADにおいても、以下のようにバイオマーカーを用いた進行ステージの評価が提唱され、研究が進められている¹⁸⁾。

【Stage1】アミロイドイメージング陽性やCSF A β 低下所見によるアミロイド蓄積の出現

【Stage2】Stage1に加え、FDG-PETシグナル低下所見（糖代謝低下）やCSF中のタウ増加といった神経変性所見の出現

【Stage3】Stage1, 2のバイオマーカー所見に加え、軽微な認知機能低下の出現

現在タウイメージングなどの新しい手法も研究が進

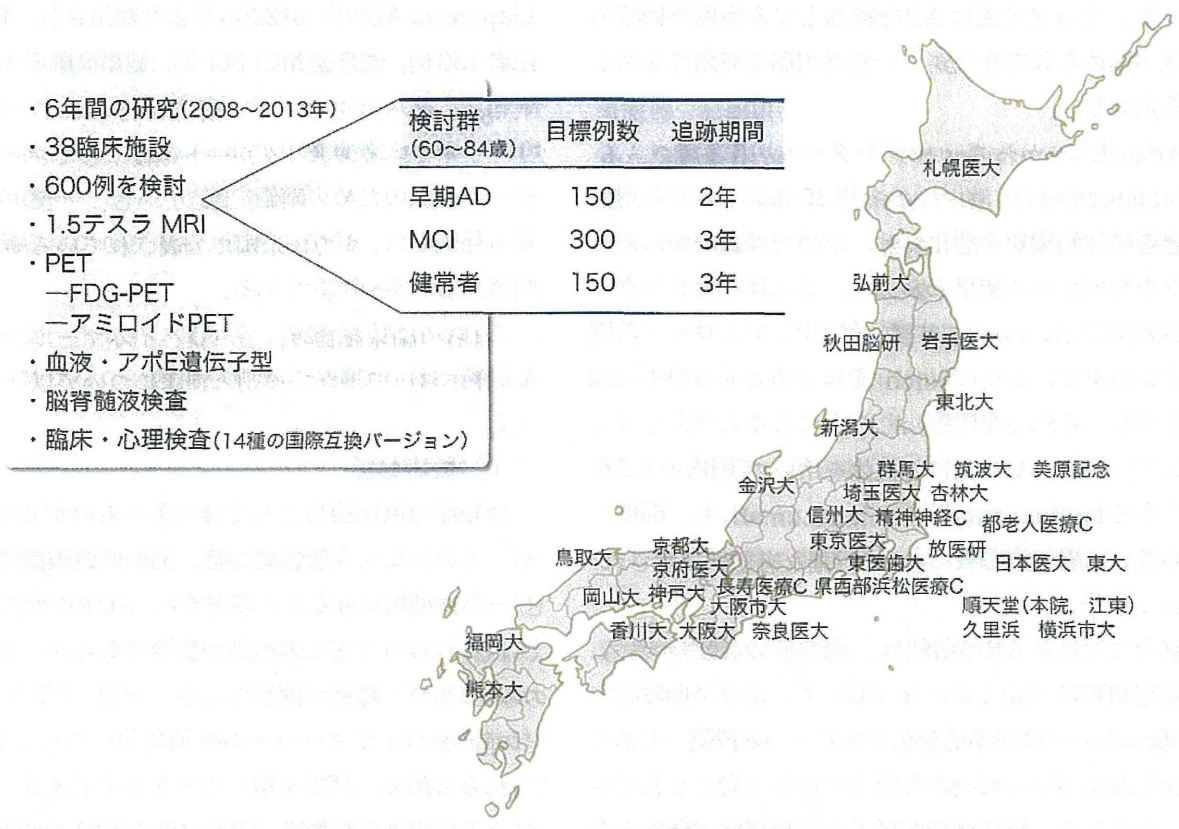


図2 J-ADNI 試験計画の概要

められており、これらの診断薬の開発が治療薬開発を加速することが期待される。

ii) 有効性評価

認知機能や日常生活動作などの臨床指標は、患者の状態や評価者によるばらつきが大きく、特に臨床症状が乏しい段階では、臨床試験において統計的な検出力を確保するために多症例数を必要とする。ADNIなどの研究から、MRIにおける海馬容積やFDG-PETの脳代謝画像所見が臨床症状の変化と相関することが明らかとなり、これらを代替エンドポイントとすることで、臨床症状を評価するよりも、少ない症例数と評価期間で有効性・有効用量を見極めることができる可能性が示唆された¹⁹⁾。

一方で、実際の治験においては臨床症状が改善しても海馬容積は縮小するなど、薬剤によって、治療効果とバイオマーカー変化が相関しない例も散見されており、薬剤介入に基づくバイオマーカー変化と臨床的エンドポイントとの関係についてははまだ検討すべき点が多い。

iii) 課題と今後の検討

CSF中Aβ・タウ、MRIによる海馬容積測定、アミロイドイメージングに関しては、欧州医薬品庁(EMA)において臨床試験の被験者選択への利用に対する適格性確認が行われ、その利用が推奨されている²⁰⁾。これらのバイオマーカーはすでに種々の治験のなかで利用されているが、測定値が施設間・地域間で異なるなど、測定方法の標準化が大きな課題となっている。また、国際共同治験が増加するなか、バイオマーカーの変化・推移に関する民族的な相違についても検討が必要な状況にある。

われわれは、平成24年(2012年)度から厚生労働省により開始された「革新的医薬品・医療機器・再生医療製品実用化促進事業」において「アルツハイマー病治療薬の臨床評価ガイドラインの策定」のための研究を進めており、医薬品医療機器総合機構(PMDA)との連携の下、バイオマーカーを利用した効率的な医薬品開発の促進をめざし研究を進めている。

おわりに

創薬活動におけるバイオマーカーの用途は、候補化合物のスクリーニングから、臨床試験の患者選択、有効性の評価まで多岐にわたる。アカデミア発の創薬においても、基礎研究の段階からバイオマーカーの活用を意識して取り入れ、創薬の各ステージにおいて適切なバイオマーカーを選定し、活用することが重要である。本稿で紹介したバイオマーカーの諸活用例が、今後の創薬活動のなかで役立つことを期待したい。

文献

- 1) Biomarkers Definitions Working Group : Clin. Pharmacol. Ther., 69 : 89-95, 2001
- 2) La Thangue, N. B. & Kerr, D. J. : Nat. Rev. Clin. Oncol., 8 : 587-596, 2011
- 3) Ravnan, M. C. & Matalka, M. S. : Clin. Ther., 34 : 1474-1486, 2012
- 4) "Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff - In Vitro Companion Diagnostic Devices" FDA draft guidance, 2011 <http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm262292.htm>
- 5) EMA/CHMP/641298/2008, 2010 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500094445.pdf
- 6) EMA/446337/2011, 2011 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/07/WC500108672.pdf
- 7) コンパニオン診断薬プロジェクト, 医薬品医療機器総合機構 <http://www.pmda.go.jp/kijunsakusei/companion.html>
- 8) Herman, G. A. et al. : Clin. Pharmacol. Ther., 81 : 761-767, 2007
- 9) Jonson, J. A. et al. : Clin. Pharmacol. Ther., 90 : 625-629, 2011
- 10) Waanders, F. et al. : J. Pathol., 220 : 7-16, 2010
- 11) ICH-E16 http://www.pmda.go.jp/ich/e/e16_11_1_20.pdf
- 12) Bertram, L. & Tanzi, R. E. : Nat. Rev. Neurosci., 9 : 768-778, 2008
- 13) Jonsson, T. et al. : Nature, 488 : 96-99, 2012
- 14) "Lilly Halts IDENTITY Trials as Patients Worsen on Secretase Inhibitor" Alzheimer Research Forum <http://www.alzforum.org/new/detail.asp?id=2536>
- 15) Tayeb, H. O. et al. : Expert Opin. Biol. Ther., 13 : 1075-1084, 2013
- 16) Iwatsubo, T. : Alzheimers. Dement., 6 : 297-299, 2010
- 17) Trzepacz, P. T. et al. : Neurobiol. Aging, 35 : 143-151, 2014
- 18) Sperling, R. A. et al. : Alzheimers. Dement., 7 : 280-292, 2011
- 19) Lorenzi, M. et al. : Neurobiol. Aging, 31 : 1443-1451, 1451.e1, 2010
- 20) "Qualification of novel methodologies for medicine development" European Medicines Agency http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000319.jsp&mid=WC0b01ac0580022bb0

<筆頭著者プロフィール>

本橋慧樹：2008年 東北大学大学院薬学研究科修士課程修了，同年より医薬品医療機器総合機構において新薬審査・治験相談業務に従事，2012年より東京大学医学部附属病院 早期・探索開発推進室，現在に至る。アルツハイマー病治療薬の臨床評価基準策定のためのレギュラトリーサイエンス研究を行っている。

FTY720/Fingolimod, a Sphingosine Analogue, Reduces Amyloid- β Production in Neurons

Nobumasa Takasugi^{1,2,3*}, Tomoki Sasaki¹, Ihori Ebinuma¹, Satoko Osawa¹, Hayato Isshiki^{2,3}, Koji Takeo¹, Taisuke Tomita^{1,3*}, Takeshi Iwatsubo^{1,2,3}

1 Department of Neuropathology and Neuroscience, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **2** Department of Neuropathology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, **3** Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a pluripotent lipophilic mediator working as a ligand for G-protein coupled S1P receptors (S1PR), which is currently highlighted as a therapeutic target for autoimmune diseases including relapsing forms of multiple sclerosis. Sphingosine related compounds, FTY720 and KRP203 known as S1PR modulators, are phosphorylated by sphingosine kinase 2 (SphK2) to yield the active metabolites FTY720-P and KRP203-P, which work as functional antagonists for S1PRs. Here we report that FTY720 and KRP203 decreased production of Amyloid- β peptide (A β), a pathogenic proteins causative for Alzheimer disease (AD), in cultured neuronal cells. Pharmacological analyses suggested that the mechanism of FTY720-mediated A β decrease in cells was independent of known downstream signaling pathways of S1PRs. Unexpectedly, 6-days treatment of APP transgenic mice with FTY720 resulted in a decrease in A β 40, but an increase in A β 42 levels in brains. These results suggest that S1PR modulators are novel type of regulators for A β metabolisms that are active *in vitro* and *in vivo*.

Citation: Takasugi N, Sasaki T, Ebinuma I, Osawa S, Isshiki H, et al. (2013) FTY720/Fingolimod, a Sphingosine Analogue, Reduces Amyloid- β Production in Neurons. PLoS ONE 8(5): e64050. doi:10.1371/journal.pone.0064050

Editor: Koichi M Iijima, Thomas Jefferson University, United States of America

Received: January 24, 2013; **Accepted:** April 9, 2013; **Published:** May 7, 2013

Copyright: © 2013 Takasugi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is supported in part by Grants-in-Aid for Young Scientists (S) (for T.T.) and (B) (for N.T.) from Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), by the Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Brain Environment) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science & Technology in Japan (for T.T.), by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (Comprehensive Research on Aging and Health) (for T.T.), by Core Research for Evolutional Science and Technology of JST (for T.T., T.I.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: taisuke@mol.f.u-tokyo.ac.jp

‡ Current address: Department of Pharmacology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

Introduction

Bioactive lipids, such as sphingolipids, have effect on various neuronal activities, including signal transduction, inflammatory response, and neuronal survivals [1]. It has been reported that the sphingolipid metabolism in brain was altered under neurodegenerative conditions, e.g., Alzheimer disease (AD) [2,3,4]. However, the relationship between changes in brain sphingolipids with the pathological mechanisms of AD has remained largely unclear. Interestingly, the production of amyloid- β (A β) peptide, the major component of senile plaques deposited in the brains of patients with AD, is known to be modulated by sphingolipids [5]. A β is produced from amyloid- β precursor protein (APP) through a sequential cleavage by two aspartate proteases, β - and γ -secretases [6,7]. BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) [8] is a type-1 transmembrane protein responsible for the β -secretase activity, and γ -secretase is comprised of four integral membrane proteins, Presenilin (PS) as the catalytic subunit associated with Nicastrin (Nct), Aph1, and Pen2 [9]. Both enzymes are located in lipid rafts [10], a membrane microdomain enriched in sphingolipids and cholesterol, and the activities of the secretases are affected by the lipid composition [11,12,13].

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is produced from sphingosine by sphingosine kinase (SphK). S1P works as a ligand for a subset of G-protein coupled receptor (S1PR) proteins, and functions on various

cellular events including neurogenesis, angiogenesis, and immune response [14]. S1PR modulator FTY720 (Fingolimod/Gilenya) is a sphingosine-related molecule exhibiting an immunomodulatory function, which has recently been approved as an oral treatment for relapsing forms of multiple sclerosis [14,15]. FTY720 is phosphorylated by SphK2 to function as an agonist for S1P receptors, i.e., S1PR1, S1PR3, S1PR4, and S1PR5 (Fig. 1) [16,17,18]. Despite its agonistic action, FTY720 promotes endocytosis and degradation of the S1P receptors, thereby resulting in functional antagonistic effects. FTY720 interferes with the neuroinflammatory responses of auto-active T-cells and glial cells [19] and ameliorates the symptoms of autoimmune encephalomyelitis in rodents, the latter being a model for multiple sclerosis [20,21].

Recently, we reported that SphK2, one of the rate limiting enzymes for the production of S1P, is upregulated in AD brains, and that S1P interacts with BACE1 to regulate its proteolytic activity [22]. To examine the effects of S1P receptor modulators on AD, we investigated the effects of FTY720, and another S1PR modulator KRP203 harboring a more specific agonist activity against S1PR1 [23], on A β production in cultured neuronal cells and brain A β levels in AD model mice.

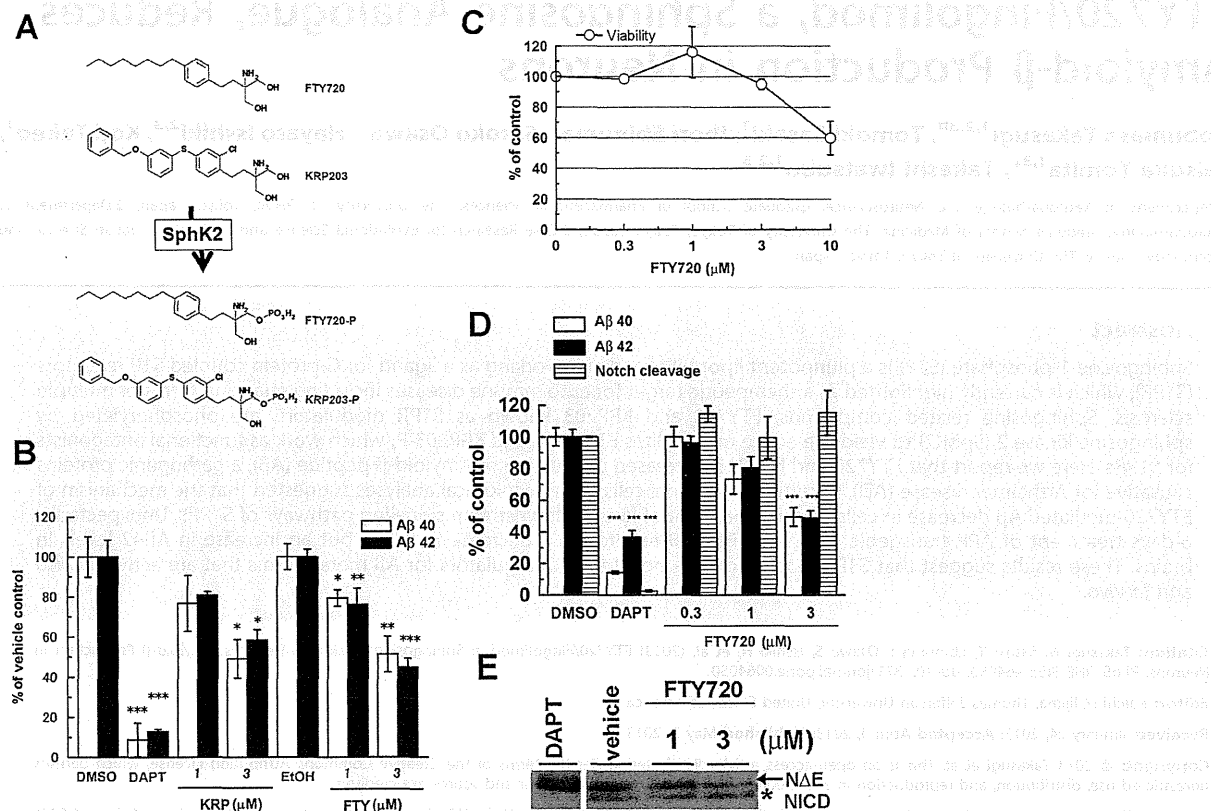


Figure 1. S1P receptor modulators, FTY720 and KRP203 decreased A β production from neuronal cells. (A) The chemical structures of FTY720 and KRP203 and their phosphorylated forms. (B) Levels of A β secretion from mouse primary neurons after treatment with FTY720 or KRP203 for 24 hrs. The levels of secreted A β in conditioned media were quantified by ELISAs. For vehicle control, we used DMSO for FTY720 treatment and EtOH for KRP203 treatment, respectively. The percentages of the relative ratio to levels in vehicle control of each group (mean \pm SEM) are indicated in the figures. * P <0.05, *** P <0.001 by Student's *t* test. (n =4). (C) Effects of FTY720 on cell viability in N2aNH cells. (D) Levels of A β secretion and Notch activity in N2aNH cells after treatment with FTY720 (n =4, mean \pm SEM; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001). 10 μ M of DAPT was used as a positive control. (E) Immunoblot analysis of NICD in FTY720-treated N2a cells, which was transiently transfected with cDNA encoding N Δ E. doi:10.1371/journal.pone.0064050.g001

Materials and Methods

Compounds

2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]-1,3-propanediol, hydrochloride (FTY720), 2-amino-2-[2-[2-chloro-4-[[3-(phenylmethoxy)phenyl]thio]phenyl]ethyl]-1,3-propanediol, hydrochloride (KRP203), 3-(2-(3-hexylphenylamino)-2-oxoethylamino) propanoic acid (W123), 5-[4-phenyl-5-(trifluoromethyl)-2-thienyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazole (SEW2871) (Cayman chemicals), phosphorylated form of FTY720 (FTY720-P) (Echelon bioscience), and suramin (Sigma-Aldrich) were purchased from indicated vendors. *N*-[*N*-(3,5-difluorophenyl)-L-alanyl]-(*S*)-phenylglycine *t*-butyl ester (DAPT) was synthesized as previously described [24]. FTY720, W123, suramin and DAPT were dissolved in DMSO. KRP203 and FTY720-P was dissolved in ethanol and chloroform, respectively.

Antibodies and immunological methods

A polyclonal antibody against presenilin1 (PS1) CTF (G1L3) was raised as described [25]. Following antibodies were purchased from indicated vendors: 82E1 (Immuno-Biological Laboratories) against the N terminus of human A β for detection of A β and β CTF, anti-APP (C) (Immuno-Biological Laboratories) for detection of APP CTFs and AICD, anti-mouse/rat APP (597) for

detection of sAPP α , anti-sAPP β wt (Immuno-Biological Laboratories), anti- α -Tubulin DM1A (Sigma Aldrich), anti-SphK2 P-19 (Santa Cruz Biotechnology), anti-Myc 9B11 and anti-phospho specific ERK antibody (Cell Signaling Technology). Protein samples were analyzed by immunoblotting or two-site ELISAs for the detection of A β as previously described [26,27]. Specificities of the APP antibodies used have previously been shown [22]. To analyze A β species with different C-terminal lengths, samples were separated by modified Tris/Tricine/8M urea gels as reported previously, followed by immunoblotting with 82E1 [28,29].

Cell culture and transfection

Expression plasmids coding for human APP C-terminal 99 amino acid fragment (pcDNA3.1-SC100), Notch C-terminal fragment (pcS2-N Δ E), human Sphingosine kinase 2 (pcDNA3.1-SphK2-V5) and an inactive mutant of SphK2 (G243D) were described previously [22,26,30,31]. Plasmid transfection was performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen). Stable mouse Neuro2a neuroblastoma cells line expressing recombinant Notch protein and luciferase reporter (N2aNH) was established by co-transfection with pcDNA3.1/Hygro-N Δ E/gvp, pcDNA3-EGFP and pGL3(r2.2)-UAS [32,33] followed by selection with G418 and

hygromycin. After indicated time of treatment, medium and lysate were collected. To monitor the cell viability, we compared GFP fluorescence in each lysate with that of vehicle control samples. We further validated this viability assay using almarBlue assay (Invitrogen) (Figure S1). To monitor the Notch cleavage, luciferase assay was performed as described previously [29,32,33]. Primary cortical neurons were prepared from Balb/c mice at embryonic day 16, and grown in Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen) for 7 days [34,35]. Small interfering RNA (siRNA) duplexes targeting the mouse *Sphk2* sequence (target sequences: *Sphk2*: 5'-TAG GCC TGG CCT CGT TGC ATA-3') as well as a negative control sequence were purchased from Qiagen. siRNA was reversely transfected in N2a cells using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) as previously described [22]. cDNAs encoding NAE [30] and NAEgv [36] were originally provided from Drs. Raphael Kopan and Jan Naslund, respectively.

FTY720 treatment in AD model mice

All experiments using animals in this study were performed according to the guidelines provided by the Institutional Animal Care Committee of Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo. All animals were maintained on food and water with a 12 h light/dark cycle. A7 transgenic mice overexpressing human APP695 harboring K670N, M671L, and T714I FAD mutations in neurons under the control of Thy1.2 promoter were used as a mouse model of AD [37]. Female A7 mice at 6 months old were used for treatment of FTY720, in which FTY720 dissolved in saline was injected subcutaneously once a day for 6 days (0.5 mg/kg/day). Brain samples were solubilized with 10 mM Tris buffer containing 1% CHAPS, and subjected to the sandwich ELISA for A β (Wako Chemical) [22].

Results

S1P receptor modulators, FTY720 and KRP203, decreased A β production in neuronal cells

To test if the S1PR modulators alter A β production in neuronal cells, we treated mouse primary cortical neurons with FTY720 and KRP203 (structures shown in Figure 1A) and found that FTY720 and KRP203 decreased secretion of both A β 40 and A β 42 in a dose dependent manner (Fig. 1B). To further investigate the effect of these compounds, we tested a mouse neuronal N2a cell line stably expressing GFP, truncated Notch fused with Gal4/VP16 (NAE/gvp) and a luciferase reporter under UAS promoter [32,33,36] (N2aNH cell line), which enables us to simultaneously analyze the effects of compounds on A β production, Notch signaling (as luciferase activity) and cell viability (as GFP fluorescence). Treatment with FTY720 decreased the production of A β 40 and A β 42 in a dose dependent fashion below the toxic concentration (Fig. 1C and S1) without affecting the Notch signaling (Fig. 1D and E).

To further identify the molecular target of S1PR modulators, we analyzed their effect on N2a cells transiently expressing SC100, corresponding to β CTF of human APP that is a direct substrate of γ -secretase. SC100 is endoproteolyzed by γ -secretase at ϵ -site to release the intracellular domain (AICD), and resultant intramembrane stub is trimmed by carboxypeptidase-like activity of the γ -secretase at multiple γ -sites to generate A β . FTY720 and KRP203 decreased secretion of A β 40 and A β 42 from SC100 (Fig. 2A), suggesting that S1PR modulators affected the γ -secretase activity. Recently, small compounds that specifically lower A β 42, and A β 40 to a lesser extent, have been termed as γ -secretase modulators [6,29]. However, FTY720 treatment decreased all A β species with different A β C-termini, including A β 38, A β 39,

A β 40 and A β 42 (Fig. 2B). Concomitantly, a slight accumulation of α CTF (from endogenous mouse APP) and SC100 was observed (Fig. 2C–F), whereas the levels of sAPP α and sAPP β products of α - or β -secretase-mediated APP cleavage of endogenous APP, respectively, were not altered by FTY720 treatment (Fig. 2G). Intriguingly, AICD production was not altered by FTY720 treatment (Fig. 2F) similarly to the processing of NAE, a direct Notch substrate for γ -secretase (see Fig. 1D and E). Because both AICD and NICD are produced from ϵ -cleavage by γ -secretase, these data suggest that S1PR modulators specifically regulate the γ -cleavage irrespective of the substrate.

Mode of action of inhibition of A β production mediated by FTY720

Phosphorylation of FTY720 by SphK2 yields the active metabolite, FTY720-phosphate (FTY720-P), which is known as a potent agonist of the S1P receptors (Fig. 1A). To determine whether FTY720-P is involved in the regulation of A β production, we treated N2a cells with FTY720 after RNAi knock-down of the endogenous expression of SphK2. We observed a ~60% of decrease in SphK2 expression after siRNA treatment (Fig. 3A). As reported previously, knockdown of SphK2 decreased A β secretion [22]. However, additional decrease was not observed in FTY720-treated SphK2 knockdown cells, suggesting that SphK2 is required for lowering A β secretion by FTY720 (Fig. 3B). Next, we examined the effects of overexpression of SphK2 or its dominant negative mutant (G243D) in N2a cells. As reported previously, overexpression of SphK2 increased A β production [22] (Fig. 3C). Intriguingly, FTY720 treatment significantly decreased A β secretion from N2a cells that overexpress wild-type (WT) SphK2, but not dominant negative mutant, to levels lower than those of untransfected cells treated by FTY720. Quantitative comparison of the inhibitory effects of FTY720 revealed that an increase in SphK2 activity significantly sensitized N2a cells to the inhibitory effect of FTY720 on A β production (Fig. 3D). These data strongly suggest SphK2 activity is involved in the mechanism of action of FTY720 to lower A β production, raising the possibility that FTY720-P is the *bona fide* regulator of the γ -secretase activities.

Phosphorylation of FTY720 by SphK takes place in the cytosol, and the resultant FTY720-P translocates to the extracellular side and acts as an agonist for S1PRs [38]. Next we examined whether known downstream signaling pathway of S1PRs was involved in the modulation of A β production. S1PR1, a major target of FTY720-P, is a Gi coupled receptor [39]. FTY720-P caused a significant phosphorylation of ERK1/2, a known downstream event of S1PR1-Gi signaling cascade (Fig. S2) in a similar fashion to that by SEW2871 [40]. Phosphorylation of ERK1/2 induced by SEW2871 was decreased by an authentic S1PR1 antagonist, W123 [41]. However, neither SEW2871 nor W123 affected the A β productions at indicated doses (Fig. S3). Then we tested co-treatment of W123 or suramin, the latter being known to work as a Gi protein inhibitor [42] together with FTY720. We found that both compounds failed to affect the decremental effect of FTY720 on A β production (Fig. 4A and B). In sharp contrast, extracellular addition of FTY720-P did not affect the A β production from N2a cells (Fig. 4C). These results raise the possibility that the molecular mechanism whereby FTY720 lowers A β production is independent of its antagonistic effects neither on S1PR1 nor Gi pathways and that intracellular FTY720-P lowers A β by an as yet identified mechanism.

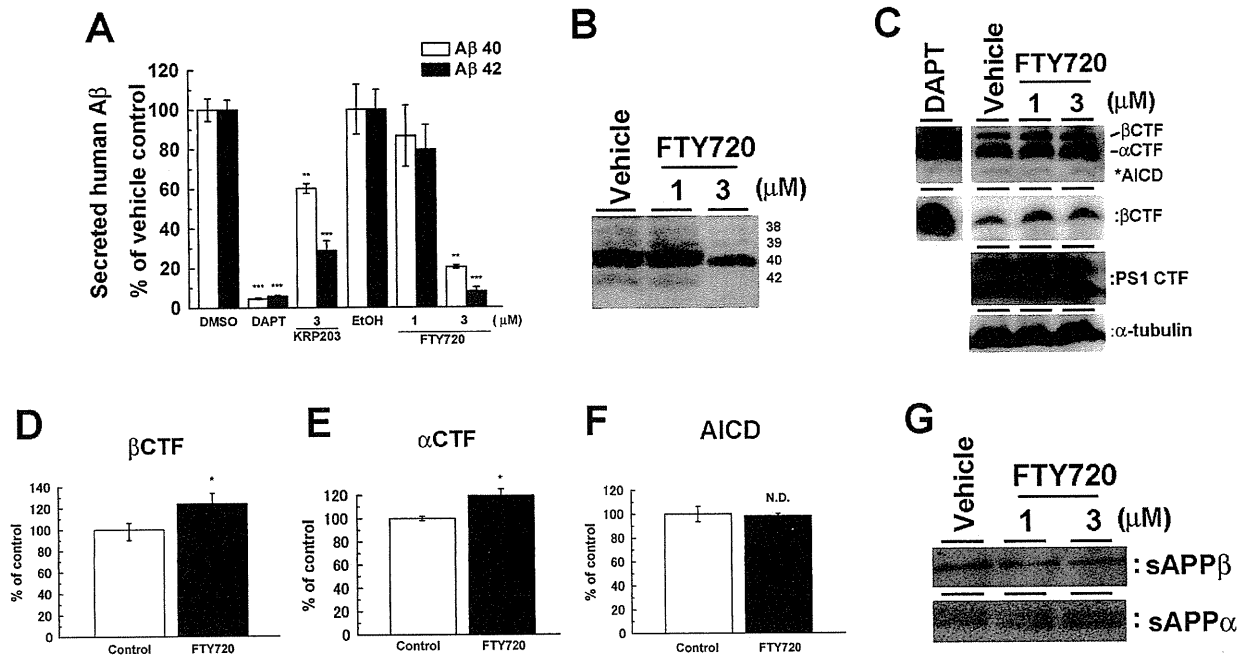


Figure 2. FTY720 decreased the γ -secretase-mediated cleavage of APP. SC100 were transiently transfected in N2a cells. After 24 hrs transfection, cells were treated with FTY720 or KRP203 for 24 hrs. (A) Levels of secreted human A β detected by human A β -specific ELISA ($n=4$, mean \pm SEM ** $P<0.01$, *** $P<0.001$). (B) Immunoblotting analysis of secreted human A β separated by modified Tris/Tricin/8M Urea gel system. (C) Immunoblot analysis of APP CTFs including overexpressed SC100 and endogenous PS1 in FTY720-treated cell lysates. Quantification analysis of (C) for β CTF (D), α CTF (E) and AICD (F) ($n=4$, mean \pm SEM * $P<0.05$). (G) Immunoblot analysis of endogenous sAPP α and sAPP β in the conditioned media of N2a cells.

doi:10.1371/journal.pone.0064050.g002

In vivo effects of FTY720 on A β levels in brains of AD model mice

FTY720 is known to cross the blood brain barrier and be accumulated in brains to suppress the inflammatory response in model mice of MS [19]. These data prompted us to test the *in vivo* effects of FTY720 in AD model mice. We subcutaneously injected FTY720 (0.5 mg/kg/day) for 6 days into 6-month-old female A7 transgenic mice overexpressing human APP carrying Swedish and Austrian double mutations [37]. At 6 months, A7 mice do not show amyloid plaques, whereas the levels of soluble A β are moderately increased compared to those in younger animals. Unexpectedly, we found that the level of soluble A β 40 was decreased, whereas that of A β 42 was significantly increased by a 6-days treatment with FTY720. This suggests that FTY720 treatment impacts on brain A β levels *in vivo*, although with some difference to its cellular effects.

Discussion

In this study, we examined the effect of S1PR modulators, FTY720 and KRP203, on brain A β and showed these compounds decreased A β production in neuronal cells. S1PR modulators decreased A β production also from β CTF, an APP-derived direct substrate of γ -secretase, without affecting AICD production nor the cleavage of Notch, suggesting that these reagents inhibited the carboxypeptidase-like γ -secretase activity. Sph2 activity was required for the FTY720-mediated decrease of A β production, whereas the signaling cascade downstream of S1PR was dispensable for the effects of the FTY720. FTY720 was active also *in vivo* and decreased the levels of A β 40 but increased those of A β 42 in

brains of APP transgenic mice. These results shed light on the complex regulatory function of S1PR modulators on brain A β .

Phosphorylation of FTY720 or KRP203 by SphK2 yields the active metabolite FTY720-P or KRP203-P, respectively, which acts as the ligand for S1PR1 [14,15,38]. It has been shown that phosphorylated S1PR modulators induce endocytosis of S1PR1 from the cell surface after binding to S1PR1, thereby causing the antagonistic effects [14,15]. Our RNAi suppression and overexpression studies showed that the SphK2 level was correlated to the capacity of FTY720 to decrease A β production (Fig. 3), supporting the view that phosphorylated forms of S1PR modulators are the *bona fide* active species that lower A β production. However, neither an authentic S1PR1 receptor agonist SEW2871 nor antagonist W123 altered the A β production (Fig. S3). Moreover, co-treatment with W123 [41] or suramin [42] failed to cancel the inhibitory effect of FTY720 (Fig. 4), raising the possibility that the unconventional GPCR cascade is involved in the modulation of A β production. Interestingly, it has been shown that β 2 adrenergic receptor [43] and an orphan G-protein receptor GPR3, the latter exhibiting a significant homology to S1PRs [44], affect the γ -secretase activity through the β -arrestin pathway [45,46,47]. β -Arrestins redistributes the γ -secretase complex toward detergent-resistant membranes, thereby increasing the catalytic activity of the complex [45,47]. This raises the possibility that S1PR modulators also alter the distribution of γ -secretase to regulate the APP-specific processing to generate A β . Another possibility would be that FTY720-P directly binds to γ -secretase or APP. FTY720 is known to accumulate within endosomes [48], in which mature γ -secretase and APP reside [10]. Interestingly, it has been shown that phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PI(4,5)P₂), a

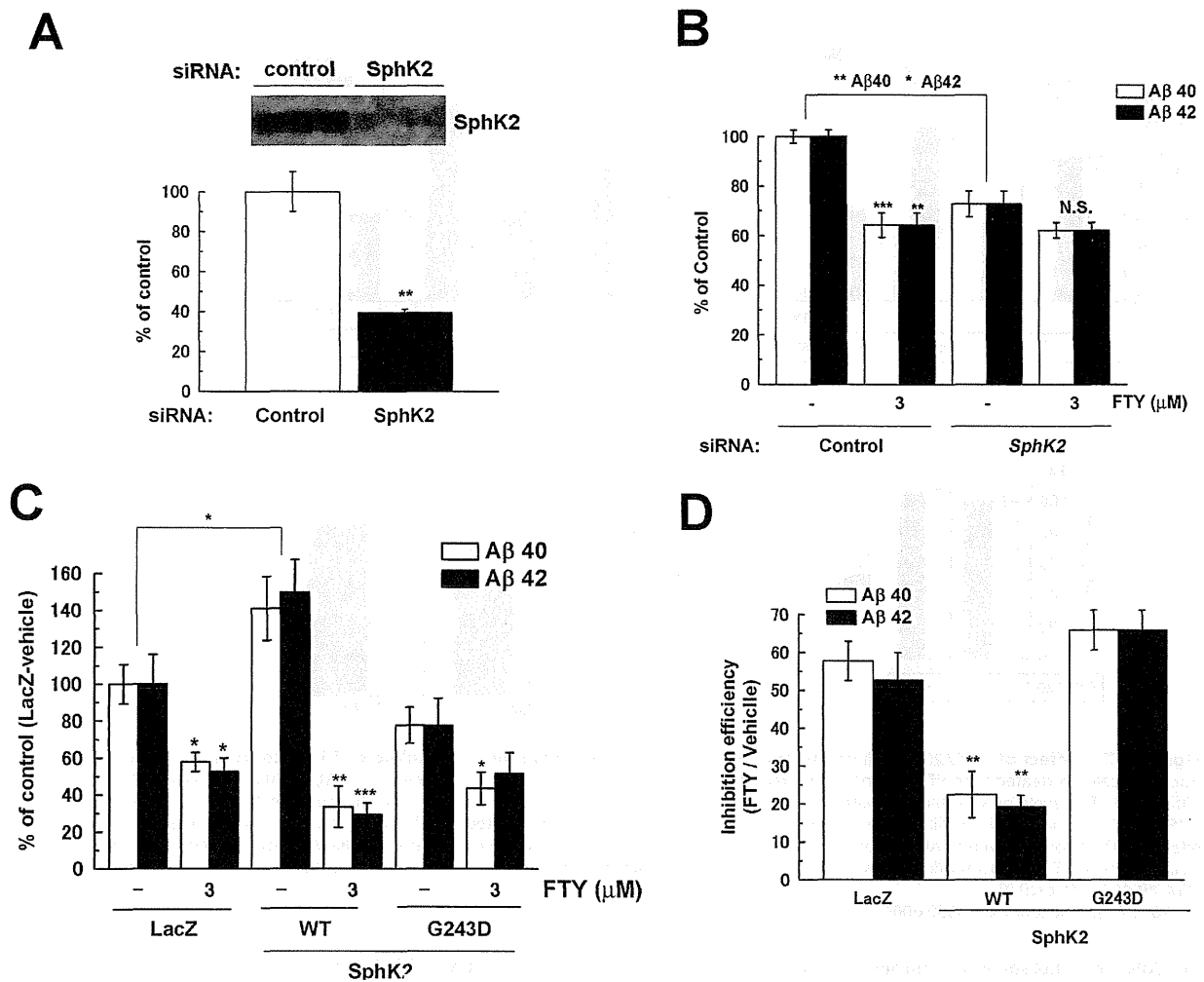


Figure 3. SphK2 activity is required for FTY720 mediated decrease of A β secretion. (A) N2a cells were transfected with siRNA against murine *SphK2*. After 48 hrs transfection of siRNA, levels of SphK2 was detected by immunoblotting (upper panel) and quantified (lower graph n=3, mean \pm SEM). (B) After 48 hrs transfection of siRNA, cells were treated with FTY720 for 24 hrs. Levels of secreted A β were quantified by ELISA (n=3, mean \pm SEM; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with DMSO treatment or siRNA against *SphK2* (indicated by line)). One-way ANOVA with Tukey's post hoc test for individual treatment differences was used for statistical analysis. (C, D) N2a cells were transiently transfected with LacZ, wild-type (WT) or dominant negative mutant (G243D) *SphK2*. After 24 hrs transfection, cells were treated with FTY720 for 24 hrs. (C) Levels of secreted A β (n=4, mean \pm SEM; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 compared with DMSO treatment or *SphK2* (indicated by line)). (D) The inhibitory efficiency of FTY720 on A β secretion compared with DMSO treatment in each transfection of (C). Secreted A β levels of FTY720 were standardized by vehicle control in each group (mean \pm SEM; **P<0.01). doi:10.1371/journal.pone.0064050.g003

representative phospholipid with a second messenger activity, directly binds to γ -secretase and inhibits its activity [49]. However, we observed extracellularly treated FTY720-P did not significantly alter the A β production. It would be important to note that controlled phosphorylation of S1PR modulators at appropriate intracellular locations is critical to their function [50]. Moreover, we are unable to rule out the possibility that other S1PRs or unknown receptor is involved in the FTY720-mediated γ -secretase inhibition. Further study is required to determine the precise intracellular site of phosphorylation, and distribution, of FTY720-P in specific membrane microdomains or organelles. The binding of FTY720-P to γ -secretase or APP should also be examined.

In contrast to the *in vitro* results in cells, a 6-days treatment of FTY720 decreased A β 40, but increased A β 42 in the brains of APP

transgenic mice *in vivo* (Fig. 4D). We used a similar dosage of FTY720 that had been adopted in autoimmune model mice, which is expected to yield submicromolar levels of FTY720 in brains [19]. Thus, the unexpected rise in A β 42 levels caused by FTY720 *in vivo* in brains might have been due to other mechanisms that are distinct from the modulation of the γ -secretase activity in cultured cells. Another possibility is that FTY720 affected the A β 42 levels by negatively regulating the inflammatory responses in the central nervous system. FTY720 has been reported to inhibit the egress of T cell into the spinal cord in autoimmune response [19], as well as into the ischemic lesions in brain ischemia [51]. Interestingly, FTY720 also inhibited the migration of human monocytes induced by A β 42 [52]. It is tempting to speculate that the FTY720 might have impacted on