

東京大学大学院医学系研究科 教授

井原 康夫

「アルツハイマー病における神経細胞死の研究」

## 1. 研究実施の概要

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) の神経病理学的特徴は、老人斑と神経原線維変化 (PHF) である。老人斑は、アミロイド線維塊から成り、その主要成分は分子量約 4,000 の  $\beta$  タンパク ( $A\beta$ ) と同定され、PHF の主要成分は微小管結合タンパクの 1 つである tau と同定された。以上の二つの病変の時系列を決めるために、各年齢のダウン症候群患者の脳が分析され、その結果  $A\beta \rightarrow \dots \rightarrow \text{tau}$  という病理カスケードが確立している。

本プロジェクトの目的は細胞外の  $A\beta$  沈着と細胞内 tau 沈着の意義を解明することである。 $A\beta$  は凝集すると *in vitro* では神経毒性を示すようになる。したがって、 $A\beta$  が何故脳内では細胞外に沈着するのか現在の研究の焦点となっている。本研究ではまずヒトにおいてどのような経過を経て蓄積してくるのか解析するとともに、これまでに注目されていなかった脂質との関連を作業仮説としてとりあげ検証に努めた。神経原線維変化としての tau の細胞内凝集は神経細胞の脱落と直接的な関係があることが知られている。ここでは、この tau の細胞内凝集が神経細胞変性の最終段階の結果であるという仮説を検証することを試みた。

$\beta$  アミロイド沈着は、 $A\beta$  特異抗体を用いて免疫組織化学的に鋭敏に検出できるようになり、老人斑形成は、一般人口ですでに 50 歳台からはじまることが知られるようになった。さらに最近では、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を用いた定量法によって、免疫組織化学的に老人斑が検出できない時期にすでに  $A\beta$  が生化学的には蓄積していることが見出された。これは、老人斑形成はすでに先行する  $A\beta$  のホメオスタシスの破綻の結果であることを示唆する。

20 歳から 80 歳までの (非痴呆患者例の) 剖検脳内の  $A\beta$  の定量をおこなった。その結果、以下のことが判明した。1) 正常脳においても、不溶性画分に  $A\beta$  が存在し、そのレベルは、 $A\beta 40$  は約 5pmol/g、 $A\beta 42$  は約 0.5pmol/g であった。したがって、不溶性画分の  $A\beta$  は、必ずしも異常な産物ではなく、正常脳における正常な代謝産物である。2) この不溶性画分の  $A\beta 42$  が 40 歳台後半から急激に上昇し、この増加は 70 歳位まで続き、その後プラトーとなる。3)  $A\beta 40$  の上昇程度は低い、 $A\beta 42$  値と強い相関がある。4)  $\epsilon 4$  allele が存在すると、 $A\beta 42$  蓄積のカーブが左方にシフトする；すなわち、早期に  $A\beta$  が立ち上がる。以上の観察結果から、第 1 に、脳の不溶性画分に存在する  $A\beta 42$  がアミロイド蓄積のもとになるらしいことが明らかとなった。

$A\beta$  が蓄積を開始した脳の不溶性画分の中には、種々の細胞内コンパートメントが存在するが、その性質がある程度明らかとなっているのは、低密度膜ドメイン (low-density membrane domain, LDM domain) のみであろう。ヒトニューロblastoma (SH-SY5Y) を 1% Triton X-100 中でホモジネートしたものを蔗糖密度勾配法で分画すると、5/35% 界面に低密度膜ドメインが回収され、ここに (Triton-insoluble)  $A\beta$  の約 50% が存在する。正常のヒト脳を同様に分画すると、ニューロblastoma の場合と同じく、低密度膜画分

に A $\beta$  40、42 が検出される。さらに、脳内で不溶性 A $\beta$  42 が蓄積するにつれ、この画分の A $\beta$  42 が高値を呈するようになる。多数例で検討すると、低密度ドメインの A $\beta$  42 の量は細胞外に蓄積した A $\beta$  量と非常によく相関した。さらにこの相関は、PDAPP mice でも確かめられた。このことは、脳内 A $\beta$  42 蓄積の少なくとも一つの pathway は低密度膜ドメインを介してということを示唆する。

PHF の骨格が tau の微小管結合ドメインからなることがすでに 1992 年に示された。これによって PHF の謎の 1 つは明らかになったが、何故 tau 同士が重合するのか、言い替えればどのような細胞内環境の変化によってこのような tau の重合がおこりえるのかは全く不明である。またこの点が (PHF は AD 病変の最終的帰結である神経細胞脱落と密接に関係しているので) AD における神経細胞死を理解する上で非常に重要である。以上を念頭に、ヒト FTDP-17 (Frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17) 脳内の蓄積物質に関してタンパク化学的解析を試みた。対象として、P301L、R406W 脳を選んだ。前者の発症年齢は後者に比して早く、経過も後者に比して進行が早い。解析にて得られた所見は以下のことを示唆すると考えられる。1) Diffuse tangle は早期の神経細胞脱落に、mature tangle はむしろ神経細胞生存・維持に関係しているかもしれない；2) P301L 脳の可溶性画分において mutant tau のレベルが低いのは mutant tau の微小管結合能が低いため、細胞内で分解されやすいためである。一方、沈着が mutant tau からのみ構成されていることは、P301 tau が微小管に結合しない割合が高いこと、また凝集能が高いため、と考えられる；3) R406W tau の Ser-396、404 (微小管結合領域に近い) におけるリン酸化の程度が低いのは、Arg が大きな Trp に置き換わったための steric hindrance のためによるもので、tubulin または微小管が喪失すると、それが解除されて、wild-type tau と同様のランダム構造になるのでリン酸化される。このことは、リン酸化は、細胞変性の原因ではなく、細胞変性の結果であることを示唆している。

柳澤グループは、主に A $\beta$  aggregation の機構および ApoE の作用機序に焦点を当てて研究をすすめた。A $\beta$  の凝集開始時点に seed として働くことが想定される GM1 ガングリオシド結合型 A $\beta$  (GM1-A $\beta$ ) の形成機構について物理化学的検討を加え、GM1 ガングリオシドが存在する膜内のコレステロール濃度が高い条件において GM1-A $\beta$  の形成が促進されること、また GM1-A $\beta$  による可溶性 A $\beta$  の凝集促進作用は抗 GM1-A $\beta$  抗体により特異的に抑制されることを確認した。

ApoE の AD 発症促進作用を本蛋白の生理機能であるコレステロール代謝調節の視点から明らかにすることを目指した。リコンビナント ApoE (ApoE2、ApoE3 および ApoE4) を培養神経細胞に作用させ、その神経細胞コレステロール代謝に及ぼす影響を評価した。次に、ApoE の神経細胞コレステロール代謝調節に関するアイソフォーム特異性は、細胞表面からの脂質分子引き出し (efflux) において発揮されることが確認された。また A $\beta$  産生におけるプレセニリンの役割を  $\gamma$ -セクレターゼ活性調節機構の視点から検討し、これまでに  $\gamma$  secretase 調節因子スクリーニングシステムを確立し、同酵素活性を修飾する遺伝子

を複数クローニングすることに成功した。

岩坪グループは、AD 原因遺伝子のひとつである presenilin (PS) 2 の A $\beta$  分泌への影響を詳細に調べた。さらに PS が  $\beta$  APP を切断する  $\gamma$ -セクレターゼとして作用するにはカルボキシ末端の特定アミノ酸配列に依存して形成される高分子量複合体を形成することが必要であることを明らかにし、複合体形成に必須なアミノ酸配列として Pro-Ala-Leu-Pro からなる高度に保存された PALP 配列を同定した。

上山グループは、各種アルツハイマー関連遺伝子を導入したトランスジェニック、ノックインマウスを作製、飼育した。

## 2. 研究構想

アルツハイマー病の病理学的特徴は、老人斑と神経原線維変化 (PHF) である。老人斑は、アミロイド線維の塊から成り、その主要成分は分子量約 4,000 の  $\beta$  タンパク (A $\beta$ ) と同定され、PHF の主要成分は微小管結合タンパクの 1 つである tau と同定された。以上の二つの病変の時系列を決めるために、各年齢のダウン症候群患者の脳が分析され、その結果  $\beta \rightarrow \dots \rightarrow \text{tau}$  という病理カスケードが確立している。

本プロジェクト開始時 (平成 8 年 10 月) の目的は、細胞外の A $\beta$  沈着と細胞内 tau 凝集の意義を解明することであった。A $\beta$  は凝集すると試験管内では神経毒性を示すようになる。したがって、A $\beta$  が何故脳内では細胞外に沈着するのかが研究の焦点となっている。A $\beta$  は凝集すると *in vitro* では神経毒性を示すようになる。したがって、A $\beta$  が何故脳内では細胞外に沈着するのかが現在の研究の焦点となっている。本研究ではまずヒトにおいてどのような経過を経て A $\beta$  が蓄積してくるか解析するとともに、これまでに注目されていなかった脂質との関連を作業仮説としてとりあげ検証に努めた。Tau 凝集は神経細胞の脱落と直接的な関係があることが知られている。ここでは、この tau 沈着が神経細胞変性の原因ではなく、変性の結果であるという仮説を検証することを目指した。

まず多数のヒト剖検脳を用い、脳内蓄積物をタンパク化学的に分析することによって、老人斑形成から PHF の形成 (さらには神経細胞死) に至る経路を推測する。ついで、得られた推測をトランスジェニックマウスを用いて、*in vivo* で確認することを考えた。AD 発症の時間軸 (発症に数十年かかる) を考えるとこれら二つのアプローチを用いることが必要である。

以下の 4 つの項目の解明および達成を目指した。

- 1 老人斑 ( $\beta$  アミロイド) 形成に先行する変化の解明
- 2 A $\beta$  の intracellular trafficking の解明
- 3 PHF 形成の意義の解明
- 4 AD のモデルとなりうるトランスジェニックマウスの開発

1 - 4 それぞれの項目に関しては、本プロジェクトの開始時に以下のように考えた。

1. APP (amyloid precursor protein; A $\beta$  の前駆体) の点突然変異と AD が連鎖する家系の発見 (1991) 以来、APP の intracellular trafficking の解明が最も重視されてきたが、トランスジェニックマウスの成功 (PDAPP mice; 1995) を除いて AD 発症との関連ではみるべき成果が得られていない。このことは APP の trafficking と A $\beta$  の産生、さらには AD 患者、老人脳に見られる A $\beta$  の沈着とは直接的な関係がないことを示唆している。本プロジェクトでは A $\beta$  の沈着にもっと直接的に関係すると思われる A $\beta$  trafficking に焦点をあてた。

体内のあらゆる細胞が A $\beta$  を産生し、それを細胞外へ分泌している。しかし $\beta$ アミロイド線維が形成され、沈着するのは脳 (脳実質および髄膜・血管) のみである。 $\beta$ アミロイド沈着の初期 (瀰漫性老人斑) は特異抗体で鋭敏に検出できるようになり、一般人口においてすでに 50 歳台からはじまることが知られている。さらに最近では ELISA を用いた定量法によって、免疫組織化学的に $\beta$ アミロイドが検出できない時期にすでに A $\beta$  が (生化学的には) 蓄積していることが当研究室で見出された。これは $\beta$ アミロイド形成はすでに先行する A $\beta$  のホメオスタシスの破綻の結果であることを意味する。この破綻が $\beta$ アミロイド形成にどの程度先行するのかを明らかにするには、多数の、特に 30-60 歳台の、剖検脳についての A $\beta$  の定量が必要である。以上の点は $\beta$ アミロイド形成の意義付けにもかかわってくる AD 研究の根幹である。

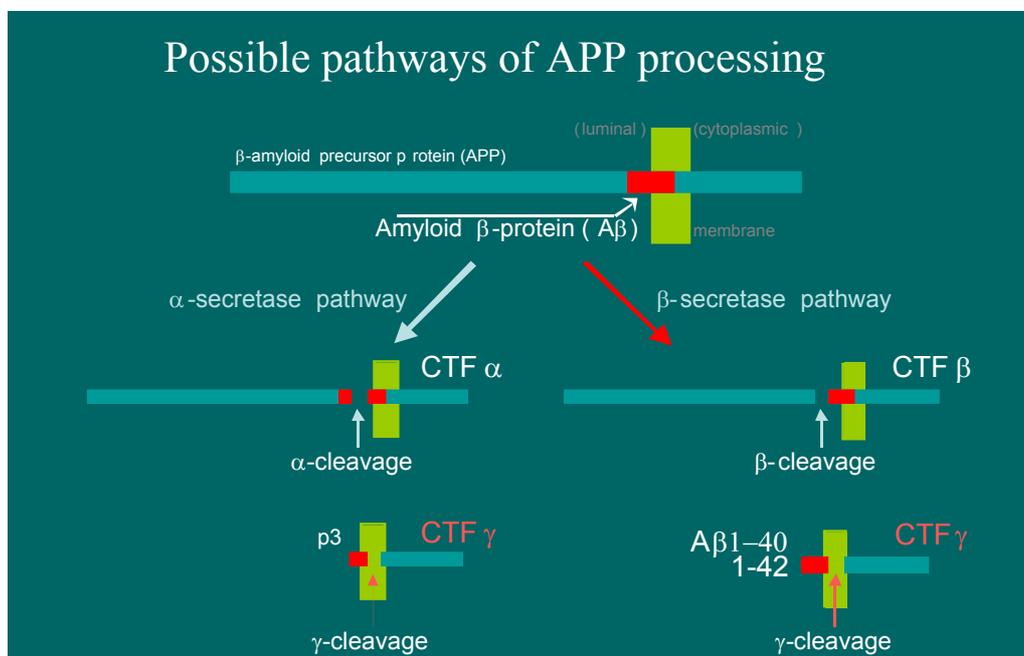


図 1. APP の分解と A $\beta$  の産生

APP は、N 末端が細胞外を向いている type 1 membrane protein である。分解過程は 2 つの経路があると考えられている。第 1 は、 $\alpha$ -セクレターゼによる $\alpha$ 切断の起こる経路、第

2は、 $\beta$ -セクレターゼによる $\beta$ 切断が起こる経路。それぞれがさらに膜内にて $\gamma$ 切断を受ける。 $\alpha$ 切断と $\gamma$ 切断によって p3 が生じる。 $\beta$ 切断と $\gamma$ 切断によって A $\beta$  1-40 または 1-42 が生じる。A $\beta$  1-40 または A $\beta$  1-42 は脳内に蓄積するが、p3 は蓄積しない。このことから、 $\alpha$ 切断を増加させることも治療法として成り立つ。

2. A $\beta$  が細胞内のどこのコンパートメントで産生され、いかに輸送され分泌されるかは未だに不明である。とくに APP の膜貫通ドメイン内でのどのように切断されるのか、A $\beta$  40 (Val-40 で終わる A $\beta$ ) と A $\beta$  42 (Ala-42 で終わる A $\beta$ ) の産生機序、trafficking には相違があるのかどうか、分泌型 A $\beta$  の 90% 以上は A $\beta$  40 であるが、蓄積する A $\beta$  は minor species の A $\beta$  42 であるのは何故か。さらに何故細胞内に A $\beta$  が証明出来ないのか (本プロジェクト開始時には細胞内の A $\beta$  を示す信頼できるデータはなかった) 等、疑問が山積している。

とくに最後の疑問に関連して GM1 ganglioside 結合型 A $\beta$  1-42 の発見は重要であろう (Yanagisawa et al. Nature Med 1: 1062-1066, 1995)。この A $\beta$  には通常の A $\beta$  の抗体 (多くは A $\beta$  の N 末端側を認識する) が反応しない。これは、GM1 結合型が A $\beta$  の細胞内存在様式であり、そのためこれまで検出できなかったのではないかと疑わせる所見である。申請時、この GM1 結合型 A $\beta$  に関しては、主に柳澤グループが研究をすすめていた。また A $\beta$  分泌と原因遺伝子の PS に関しては、すでに岩坪グループが研究をすすめていた。

以上のことを明らかにするために神経細胞の一次培養またはニューロblastoma の系を用い、ELISA を用いて神経細胞のどのコンパートメントに A $\beta$  40 または A $\beta$  42 が存在するのかを明確にする必要がある。A $\beta$  の intracellular trafficking が明らかになれば A $\beta$  の蓄積が細胞にとってどのような意味があるのかが明確になると思われる。

3. PHF の骨格が tau の微小管結合ドメインから成ることが示された。これによって PHF の謎の 1 つは明らかになったが、何故 tau 同士が重合するのか、言い替えればどのような細胞内環境の変化によってこのような tau の重合がおこるのかは全く不明である。またこの点が (PHF は AD 病変の最終的帰結である神経細胞脱落と密接に関係しているので) AD における神経細胞死を理解する上で非常に重要である。

最近までの PHF の研究は、tau のリン酸化を軸として行われてきたが、平成 8 年 10 月時点ですでに、われわれは、異常なリン酸化自体が PHF の形成を促進するという仮説には疑問をもっていた。実際、in vitro ではリン酸化されていない tau から PHF-like fibril が形成される。PHF は種々の神経疾患で見られ、特殊な炎症性筋疾患である inclusion body myositis 中にも発見されている。さらに PHF ではないが、沈着または不溶化は他臓器 (例えば chloroquine myopathy およびアルコール性肝疾患で見られる肝細胞内小体、Mallory body) にも認められる。これらの事実は、tau はこれまで考えられたように神経系特異タンパクではなく (Gu et al., J Neurochem 67: 1235-1244, 1996)、その蓄積あるいは PHF の形成は、原因はともかく、一般の細胞変性と密接に関係していることを示唆する。変性過程でとくに

細胞内タンパク質分解機構に何等かの障害がおきたときに tau はプロテアーゼに比較的耐性であるので、選択的に蓄積していく可能性がある。この仮説を確かめる1つの方法は培養系を用いて種々のプロテアーゼ阻害剤による tau の代謝回転に対する影響を検討することである。

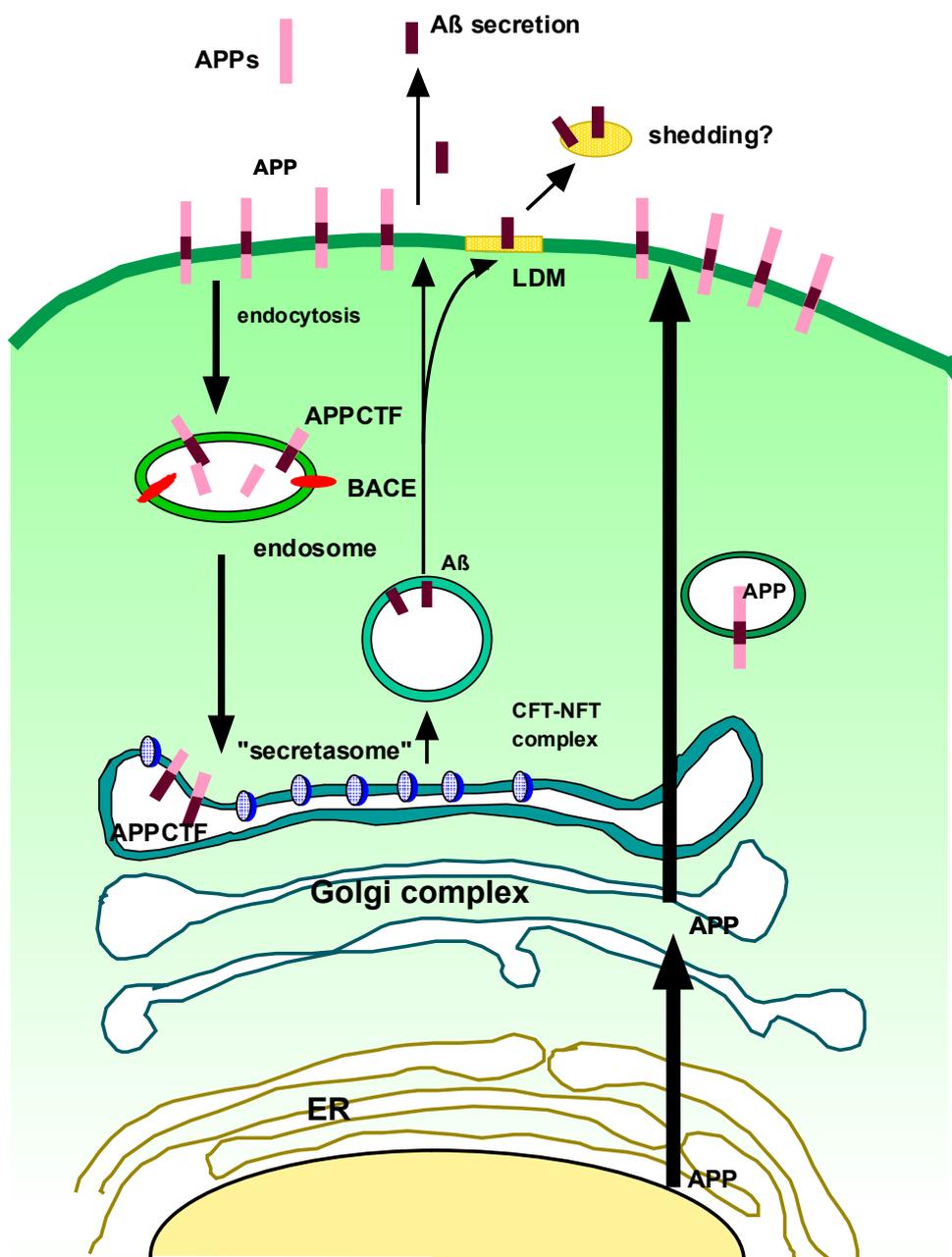


図2. 細胞内 Aβ 産生部位と輸送経路

現時点での知識および想定をもとにまとめた。細胞内で産生される APP のごく一部が A

$\beta$  産生の経路をたどると考えられている。APP 輸送経路と A $\beta$  産生との関係はまだよくわかっていないが、考えられる一つの可能性は、APP が細胞膜に輸送されてからエンドサイトーシスで再び細胞内にとりこまれた APP がエンドソームで  $\beta$  切断を受け、生じた CTF $\beta$  がゴルジ体で  $\gamma$  切断を受け、A $\beta$  が産生されるという経路である。ゴルジ体で産生された A $\beta$  は大部分が分泌されるが、一部は low density membrane domain (LDM) に組み込まれ細胞膜にとどまる。LDM-A $\beta$  の蓄積のレベルは細胞外の A $\beta$  蓄積のレベルと良く相関する (本文参照)。つまり LDM-A $\beta$  は細胞外の不溶性 A $\beta$  蓄積と密接な関係にある。一つの可能性は、LDM ドメインが細胞外に放出される (shedding) ということであろう。

4. 老人斑および神経原線維変化のそれぞれ主要構成成分である A $\beta$ 、tau が蓄積していく過程の解析となると、ヒト剖検脳では種々の制約が出てくる。この点でもし AD のモデルマウスまたはラットがわが国で開発され、それが希望する研究者に広汎に配布されるならば、日本の AD 研究は飛躍的に進歩するだろう。これまで野生株 APP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが作製されたが、明瞭な病理変化を示すものは得られていない。変異 APP 遺伝子を導入したマウスで多数の老人斑の出現が示されたが、このマウスは繁殖力が弱いとされ、研究者間に自由に頒布できるところにまで至っていない。

われわれは以上を考慮にいれ、(家族性アルツハイマー病遺伝子である) presenilin (PS) 1 および 2 のトランスジェニックマウスの作製にとりくむ (現在進行中)。その評価は、病理変化ではなく最も早い変化と考えられる脳組織中の A $\beta$  の含量の増加で行いたい (Shinkai *et al.* Ann Neurol 38:421-428, 1995)。これは病理学的な変化が出現する以前に生化学的な A $\beta$  の蓄積時期があるとの観察に基盤をおいたものである。トランスジェニックマウスにこの生化学的変化がみられたら (変異株でみられ、野生株ではみられなかったら)、遺伝背景の異なるマウスを用いるなどして AD の特徴的病理学的変化を示すマウスモデル、すなわち真のアルツハイマー病モデルの確立を試みる。

変異 APP 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは老人斑の形成は観察されたが、神経原線維変化 (PHF) はまだ観察されていない。主な理由はマウスの寿命および tau の発現量 (さらには可塑性) の違いと思われる。ラットおよびマウスでは tau の 3 リピートの最も短い型 (胎児型) が生後消失するが、ヒトではこのタイプが生涯を通じて発現している。そこでここではこのヒト胎児型 tau のトランスジェニックマウスまたはラットを作製し、このマウスまたはラットにたいして脳室内にプロテアーゼ阻害剤である leupeptin を持続注入を試みる。Leupeptin の脳室内投与は幼若ラット脳内の神経細胞を変性させ、リポフスチン顆粒を大量に産生させる手段として知られている。すでにこの方法によりブルキンエ細胞内に tau の免疫活性が生じることを確かめている (Ivy *et al.*, Brain Res 498: 360-365, 1989)。

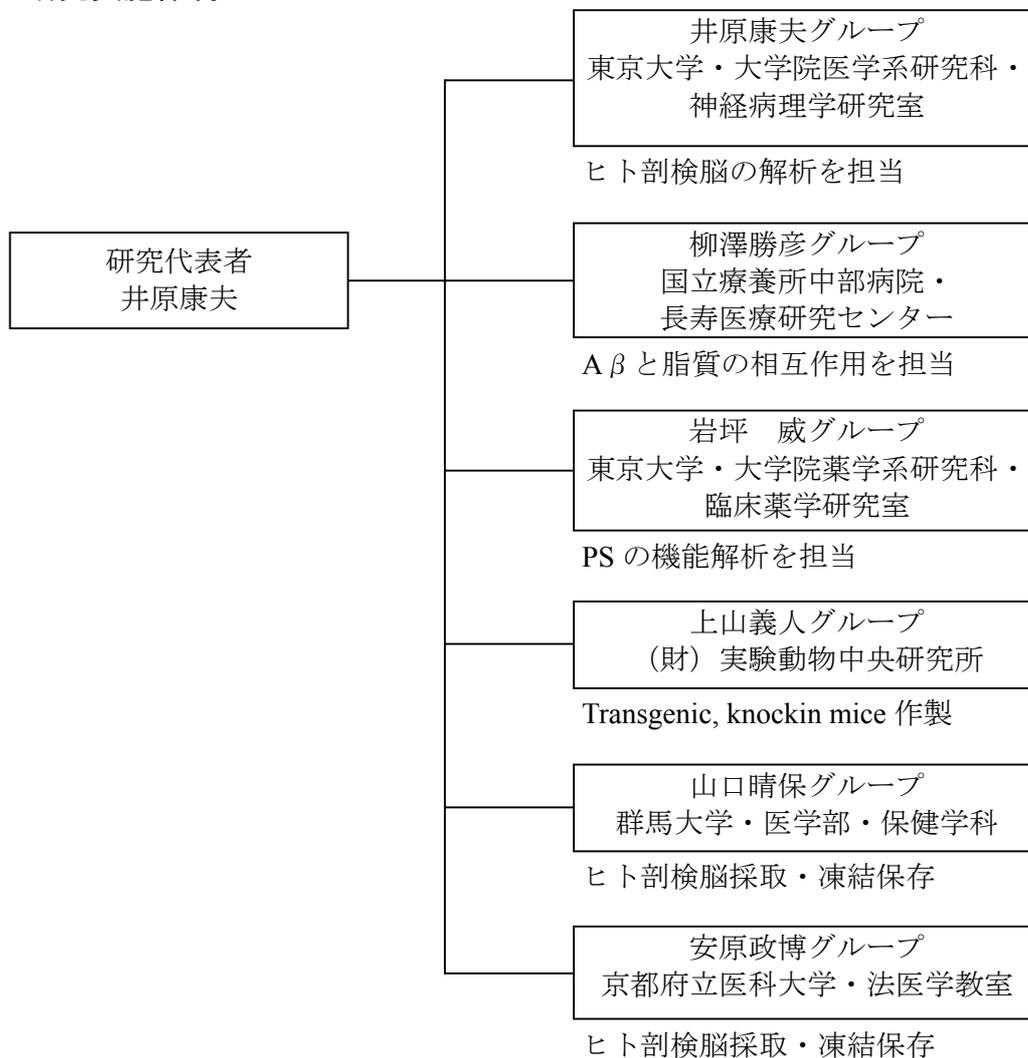
柳澤グループは、AD 脳内における A $\beta$  沈着開始機序を、A $\beta$  と神経細胞膜との interaction

から解明することを主目標に研究を進めた。実施にあたっては、柳澤らが初期 AD 脳に見出した GM1 ガングリオシド結合型 A $\beta$  (GM1-A $\beta$ ) の形成機構およびその seed 作用の解明に焦点をあてた。また、同時に、AD 発症機構を分子細胞生物学的に明らかにすることを旨とし、本疾患発症の主遺伝的要因であるアポリポ蛋白 E (ApoE) やプレセニリン (PS) の病的役割について、A $\beta$  の産生、重合、毒性発現機構の視点から検討を加えた。その内、ApoE については本蛋白分子の生理機能であるコレステロール代謝制御について培養神経細胞を対象に解析を進め、PS については結合蛋白の実態の解明を進めるとともに、A $\beta$  産生の最終段階である  $\gamma$ -cleavage に対する PS の調節作用を検討した。

岩坪グループにおいては、AD において蓄積する異常蛋白質のなかで最も病因的意義の高いと考えられる A $\beta$  に関して、その産生過程の検討に集中し、AD における神経細胞死の原因解明を最終目的として研究を行う。特に A $\beta$  の最終形成段階を担う  $\gamma$ -セクレターゼ、ならびに  $\gamma$ -セクレターゼと深い関連を有する AD 原因遺伝子プレセニリン (PS) の関係に焦点を定めて研究を展開した。まず研究開始当初の 96-97 年にかけては、PS の家族性 AD に連鎖する変異が A $\beta$  産生に及ぼす影響を解析した。98 年には PS のフラグメント形成と A $\beta$  産生の関連を分子細胞生物学的に解析し、99 年から 2000 年にかけて、PS のカルボキシ末端部分にきわめて重要な機能ドメインが存在すること、PS の高分子量複合体型分子種が  $\gamma$ -セクレターゼ機能を有することなどを確証することができた。今後の課題として、(1) PS と  $\gamma$ -セクレターゼの同一性を検証すること (2)  $\gamma$ -セクレターゼ機能発揮に必須の PS 結合因子 (複合体構成因子) を同定すること、そして (3) A $\beta$  蓄積がいかなる過程を経て細胞死を招来するののかを解明すること、がある。

以上のように、本研究は、井原康夫、柳澤勝彦、岩坪 威、上山義人の 4 グループの共同によって行なうことを申請した。井原は、主にヒト剖検脳における蓄積物質のタンパク化学的解析を担当するとともに、上記の研究推進全体に責任を持ち、柳澤は、A $\beta$  凝集における脂質の関与の可能性を明らかにする点で、岩坪は、原因遺伝子である PS の機能解析を主に担当することによって、上山はトランスジェニック動物作製を担当することによって共同研究体制を組むことを企画した。

### 3. 研究実施体制



### 4. ワークショップ・シンポジウムなどの開催

なし

## 5. 主な研究成果

### (1) 原著論文等

#### 井原グループ

- 1) Namekata K, Oyama F, Imagawa M, Ihara Y: Human transferrin (Tf): A single mutation at codon 570 determines the TfC1 or TfC2 variant. *Hum. Genet.* 100, 457-458 (1997)
- 2) Yamazaki T, Haass C, Saido TC, Omura S, Ihara Y: Specific increase in amyloid  $\beta$ -protein 42 secretion ratio by calpain inhibition. *Biochemistry*, 36, 8377-8383 (1997)
- 3) Hamano T, Yoshimura M, Yamazaki T, Shinkai Y, Yanagisawa K, Kuriyama M, Ihara Y: Amyloid  $\beta$ -protein accumulation in the leptomeninges during aging and in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 922-932 (1997)
- 4) Wild-Bode C, Yamazaki T, Capell A, Leimer U, Steiner H, Ihara Y, Haass C: Intracellular generation and accumulation of amyloid  $\beta$ -peptide terminating at amino acid 42. *J. Biol. Chem.* 272, 16085-16088 (1997)
- 5) Shinkai Y, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ito Y, Shimada H, Yanagisawa K, Ihara Y: Amyloid  $\beta$ -protein deposition in the leptomeninges and cerebral cortex. *Ann. Neurol.* 42, 899-908 (1997)
- 6) Namekata K, Imagawa M, Oyama F, Ihara Y: Transferrin C2 allele as a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 101, 126-129 (1997)
- 7) Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T, Saido TC, Ito Y, Yokofujita J, Okeda R, Ihara Y: Astrocytes containing amyloid  $\beta$ -protein-positive granules are associated with A  $\beta$  40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *Am. J. Pathol.* 152, 983- 992 (1998)
- 8) Yoshida H, Watanabe A, Ihara Y: Collapsin response mediator protein (CRMP)-2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 273, 9761-9768 (1998)
- 9) Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Saido TC, Ihara Y: Diffuse plaques associated with astroglial amyloid  $\beta$  protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathol.* 95, 217-222 (1998)
- 10) Nakabayashi J, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ito Y, Funato H, Miyakawa T, Yamazaki T, Ihara Y: Amyloid  $\beta$ -protein accumulation in the putamen and mammillary body during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 343-352 (1998)
- 11) Yamazaki T, Ihara Y: Effects of specific protease inhibitors on amyloid  $\beta$ -protein 42 secretion. *Neurobiol. Aging*, 19, S77-S79 (1998)
- 12) Yanagisawa K, Ihara Y: GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging*, 19, S65-S67 (1998)
- 13) Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grünberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y: Mutant presenilin 2 transgenic mouse: Increased A  $\beta$  levels and a marked age-dependent increase in the A  $\beta$  42 ratio in the brain. *J. Neurochem.* 71, 313-322 (1998)
- 14) Funato H, Yoshimura M, Yamazaki T, Saido TC, Ito Y, Yokofujita J, Okeda R, Ihara Y: Quantitation of amyloid  $\beta$ -protein (A  $\beta$ ) in the cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 152, 1633-1640 (1998)

- 15) Murakami N, Oyama Y, Gu Y, McLennan IS, Nonaka I, Ihara Y: Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 664-673 (1998)
- 16) Morishima-Kawashima M, Ihara Y: The presence of amyloid  $\beta$ -protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, 37, 15247-15253 (1998)
- 17) Enya M, Morishima-Kawashima M, Yoshimura M, Shinkai Y, Kusui K, Khan K, Games D, Schenk D, Sugihara S, Yamaguchi H, Ihara Y: Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid  $\beta$ -protein dimer in the cortex during aging. *Am. J. Pathol.* 154, 271-279 (1999)
- 18) Watanabe A, Takio K, Ihara Y: Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments-unusual properties of the microtubule-binding domain of tau-. *J. Biol. Chem.* 274, 7368-7378 (1999)
- 19) Matsumura N, Yamazaki T, Ihara Y: Stable expression in Chinese hamster ovary cells of mutated tau genes causing frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 (FTDP-17). *Am. J. Pathol.* 154, 1649-1656 (1999)
- 20) Funato H, Enya M, Yoshimura M, Morishima-Kawashima M, Ihara Y: The presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid  $\beta$ -protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation. *Am. J. Pathol.* 155, 23-28 (1999)
- 21) Ren J, Utsunomiya I, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y, Miyatake T: Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res.* 825, 183-188 (1999)
- 22) Kokubo Y, Kuzuhara S, Narita Y, Kikugawa K, Nakano R, Inuzuka T, Tsuji S, Watanabe M, Miyazaki T, Murayama S, Ihara Y: Accumulation of neurofilaments and SOD1-immunoreactive products in a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis with I113T SOD1 mutation. *Arch. Neurol.* 56, 1506-8 (1999)
- 23) Misonou H, Morishima-Kawashima M, Ihara Y: Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid  $\beta$ -protein in human neuroblastoma cells. *Biochemistry*, 39, 6951-6959 (2000)
- 24) Saito Y, Kawai M, Inoue K, Sasaki R, Arai H, Nanba E, Kuzuhara S, Ihara Y, Kanazawa I, Murayama S: Widespread expression of  $\alpha$ -synuclein and tau immuno-reactivity in Hallervorden-Spatz syndrome with protracted clinical course. *J. Neurol. Sci.* 177, 48-59 (2000)
- 25) Gu Y, Hamajima N, Ihara Y: Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518 and Ser-522. *Biochemistry*, 39, 4267-4275 (2000)
- 26) Gu Y, Ihara Y: Evidence that collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is involved in the dynamics of microtubules. *J. Biol. Chem.* 275, 17917-17920 (2000)
- 27) Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Ito M, Oyama F, Ando S, Ihara Y: Mutant-presenilin 2-transgenic mice: A large increase in the levels of A $\beta$  42 is presumably associated with the low-density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J. Biol. Chem.* 275, 27901- 27908 (2000)
- 28) Morishima-Kawashima M, Oshima N, Ogata H, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Ihara Y: Effect of *apolipoprotein E* allele  $\epsilon$  4 on the initial phase of amyloid  $\beta$ -protein accumulation in the human brain. *Am. J. Pathol.* 157, 2093-2099 (2000)
- 29) Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Heutink P, van Swieten JC, Nagashima K,

- Ihara Y: Molecular analysis of mutant and wild-type tau deposited in the brain affected by FTDP-17 R406W mutation. *Am. J. Pathol.* 158, 373-379 (2001)
- 30) Yamazaki T, Chang TY, Haass C, Ihara Y: Accumulation and aggregation of amyloid  $\beta$ -protein in late endosomes of Niemann-Pick Type C cells. *J. Biol. Chem.* 276, 4454-4460 (2001)
  - 31) Yamaguchi H, Sugihara S, Ogawa A, Ihara Y: Alzheimer  $\beta$  amyloid deposition, which is hastened by ApoE  $\epsilon$  4 gene, precedes neurofibrillary pathology in the frontal association cortex of non-demented senior subjects. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 731-739 (2001)
  - 32) Oshima N, Morishima-Kawashima M, Yamaguchi H, Yoshimura M, Sugihara S, Khan K, Games D, Schenk D, Ihara Y: Accumulation of amyloid  $\beta$ -protein in the low-density membrane domain accurately reflects the extent of  $\beta$ -amyloid deposition in the brain. *Am. J. Pathol.* 158, 2209-2218 (2001)
  - 33) Miyasaka T, Morishima-Kawashima M, Ravid R, Kamphorst W, Nagashima K, Ihara Y: Selective deposition of mutant tau in the FTDP-17 brain affected by the P301L mutation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 60, 872-884 (2001)
  - 34) Gu Y, Misonou H, Sato T, Dohmae N, Takio K, Ihara Y: Distinct intramembrane cleavage of the  $\beta$ -amyloid precursor protein family resembling  $\gamma$ -secretase-like cleavage of Notch. *J. Biol. Chem.* 276, 35235-35238 (2001)
  - 35) Utsunomiya I, Ren J, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y, Miyatake T: Immunohistochemical detection of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res. Protoc.* 8, 99-103 (2001)

#### 柳澤グループ

- 1) Yanagisawa K, McLaurin J, Michikawa M, Chakrabartty A, Ihara Y: Amyloid  $\beta$ -protein ( $A\beta$ ) associated with lipid molecules: immunoreactivity distinct from that of soluble  $A\beta$ . *FEBS Lett.* 420, 43-46 (1997)
- 2) Yanagisawa K, Ihara Y: GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging*, 19 (1 Suppl), S65-67 (1998)
- 3) Mizuno T, Haass C, Michikawa M, Yanagisawa K: Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid  $\beta$ -protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1373, 119-130 (1998)
- 4) Michikawa M, Yanagisawa K: Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed de novo cholesterol synthesis. *J. Neurosci. Res.* 54, 58-67 (1998)
- 5) Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R, Yanagisawa K: Implications of presenilin 1 mutations in Alzheimer's disease. *Mech. Ageing. Dev.* 107, 281-298 (1998)
- 6) Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C, Yanagisawa K: Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 274, 15110-15114 (1999)
- 7) Michikawa M, Yanagisawa K: Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J. Neurochem.* 72, 2278-2285 (1999)
- 8) Isobe I, Michikawa M, Yanagisawa K: Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis by amyloid  $\beta$ -protein and chloroquine in cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 266, 129-132 (1999)
- 9) Michikawa M, Yanagisawa K: Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells

- in culture. *Mech. Ageing Dev.*, 107, 233-243 (1999)
- 10) Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C, Yanagisawa K: Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1483, 81-90 (2000)
  - 11) Kawamura Y, Fan QW, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K, Komano H: Expression of the mRNA for two isoforms of neural plakophilin-related arm-repeat protein /delta-catenin in rodent neurons and glial cells. *Neurosci. Lett.* 277, 185-188 (1999)
  - 12) Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K: Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 74, 1008-1016 (2000)
  - 13) Isobe I, Yanagisawa K, Michikawa M: A possible model of senile plaques using synthetic amyloid  $\beta$ -protein and rat glial culture. *Exp. Neurol.* 162, 51-60(2000)
  - 14) Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama K, Komano H, Yanagisawa K: Intracellular site of  $\gamma$ -secretase cleavage for A $\beta$  42 generation in neuro 2a cells harbouring a presenilin 1 mutation. *Eur. J. Biochem.* 267, 2036-2045 (2000)
  - 15) Sawamura N, Gong JS, Garver WS, Heidenreich RA, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K, Michikawa M: Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J. Biol. Chem.* 276, 10314-10319 (2001)
  - 16) Fan QW, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M: Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J. Neurochem.* 76, 391-400 (2001)
  - 17) Isobe I, Yanagisawa K, Michikawa M: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* 77, 274-280 (2001)
  - 18) Kakio A, Nishimoto SI, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K: Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J. Biol. Chem.* 276, 24985-24990 (2001)
  - 19) Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K: A novel action of alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release. *J. Neurosci.* 21, 7226-7235 (2001)

#### 岩坪グループ

- 1) Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiko S, Capell A, Walter J, Grunberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K: The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid  $\beta$  protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *PNAS.* 94, 2025-2030 (1997)
- 2) Tokuhiko S, Tomita T, Iwata H, Kosaka T, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: The presenilin 1 mutation (M146V) linked to familial Alzheimer's disease attenuates the neuronal differentiation of NTERA 2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 751-755 (1998)
- 3) Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T: Aggregation of  $\alpha$ -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol.* 152, 879-884 (1998)
- 4) Tomita T, Chang TY, Kodama T, Iwatsubo T:  $\beta$  APP  $\gamma$ -secretase and SREBP site 2

- protease are two different enzymes. Neuroreport, 9, 911-913 (1998)
- 5) Tomita T, Tokuhiko S, Hashimoto T, Aiba K, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: Molecular dissection of domains in mutant presenilin 2 that mediate overproduction of amyloidogenic forms of amyloid  $\beta$  peptides. Inability of truncated forms of PS2 with familial Alzheimer's disease mutation to increase secretion of A  $\beta$  42. J. Biol. Chem. 273, 21153-21160 (1998)
  - 6) Fukumoto H, Tomita T, Matsunaga H, Ishibashi Y, Saido TC, Iwatsubo T: Primary cultures of neuronal and non-neuronal rat brain cells secrete similar proportions of amyloid beta peptides ending at A  $\beta$  40 and A  $\beta$  42. Neuroreport, 10, 2965-2969 (1999)
  - 7) Tomita T, Takikawa R, Koyama A, Morohashi Y, Takasugi N, Saido TC, Maruyama K, Iwatsubo T: C terminus of presenilin is required for overproduction of amyloidogenic A  $\beta$  42 through stabilization and endoproteolysis of presenilin. J. Neurosci. 19, 10627-10634 (1999)
  - 8) Takeuchi A, Irizarry MC, Duff K, Saido TC, Hsiao Ashe K, Hasegawa M, Mann DM, Hyman BT, Iwatsubo T: Age-related amyloid  $\beta$  deposition in transgenic mice overexpressing both Alzheimer mutant presenilin 1 and amyloid  $\beta$  precursor protein Swedish mutant is not associated with global neuronal loss. Am. J. Pathol. 157, 331-339 (2000)
  - 9) Iwata H, Tomita T, Maruyama K, Iwatsubo T: Subcellular compartment and molecular subdomain of  $\beta$ -amyloid precursor protein relevant to the A  $\beta$  42-promoting effects of Alzheimer mutant presenilin 2. J. Biol. Chem. 276, 21678- 21685 (2001)
  - 10) Tomita T, Watabiki T, Takikawa R, Morohashi Y, Takasugi N, Kopan R, De Strooper B, Iwatsubo T: The first proline of PALP motif at the C terminus of presenilins is obligatory for stabilization, complex formation, and  $\gamma$ -secretase activities of presenilins. J. Biol. Chem. 276, 33273-33281 (2001)

(2) 特許出願

- ・発明の名称 アルツハイマー病モデル動物  
発明者 井原康夫、小山文隆、伊藤 守  
出願番号 特願平 9-315346  
出願日 平成 9 年 11 月 17 日
  
- ・発明の名称 特異的  $\gamma$  プロテアーゼ阻害剤の開発原理  
発明者 井原康夫  
出願番号 特願 2001-376208  
出願日 2001.12.10

(3) 受賞等

なし