

アルツハイマー病モデル動物の認知機能に対する  
 $\gamma$ -セクレターゼモジュレーター薬の改善効果に関する研究

三谷 泰之



## 目 次

序論	1
第一章 AD モデルマウスおよび正常マウスの認知機能に対する GSI、GSM の薬理効果に関する検討	7
1-1. 緒言	7
1-2. 方法	10
1-2.1. 化合物	10
1-2.2. 動物	10
1-2.3. 細胞系 APP プロセッシング実験	10
1-2.4. 細胞系 Notch シグナリング実験	11
1-2.5. 学習行動実験	12
1-2.6. 脳内可溶性 A $\beta$ および $\beta$ -CTF 量の測定	12
1-2.7. <i>In vivo</i> における Notch シグナリング阻害作用の評価	13
1-2.8. ウェスタンブロット	14
1-2.9. 蛍光免疫組織化学	15
1-2.10. 統計解析	16
1-3. 結果	17
1-3.1. 培養細胞における APP プロセッシングに対する GSI、GSM の効果	17
1-3.2. 培養細胞における Notch シグナリングに対する GSI、GSM の効果	20
1-3.3. 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの認知機能障害、および脳内 A $\beta$ 、 $\beta$ -CTF に対する GSI、GSM の効果	22
1-3.4. 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの認知機能障害、および脳内 A $\beta$ 、 $\beta$ -CTF に対する高用量 GSI、GSM の効果	25
1-3.5. 3 カ月齢 Tg2576 マウスの正常認知機能、および脳内 A $\beta$ 、 $\beta$ -CTF に対する GSI の効果	27
1-3.6. Tg2576 マウスの脳および胸腺における Notch シグナリングに対する GSI の効果	29

1-3.7.	Tg2576 マウスの脳における他の $\gamma$ -セクレターゼ基質切断に対する GSI の効果	30
1-3.8.	野生型マウスの正常認知機能に対する GSI、GSM の効果	32
1-3.9.	Tg2576 マウスおよび野生型マウス脳における $\beta$ -CTF の局在と GSI による蓄積効果	34
1-4.	考察	40
1-5.	小括	46
<b>第二章</b>	<b>脳内アミロイド斑沈着後の AD モデルマウスに対する GSM の薬理効果に関する検討</b>	<b>47</b>
2-1.	緒言	47
2-2.	方法	49
2-2.1.	化合物	49
2-2.2.	動物	49
2-2.3.	細胞系内因性 $A\beta$ 産生実験	50
2-2.4.	アミロイド斑の免疫組織化学	50
2-2.5.	学習行動実験	51
2-2.6.	脳内可溶性画分 $A\beta$ 量および総 $A\beta$ 量の測定	51
2-2.7.	安定同位体標識実験	52
2-2.8.	統計解析	54
2-3.	結果	55
2-3.1.	ヒト神経芽細胞株における内因性 $A\beta$ 産生に対する GSM-2、エナンチオマーの効果	55
2-3.2.	Tg2576 マウスにおける加齢依存的な脳内アミロイド沈着	56
2-3.3.	アミロイド斑沈着後の Tg2576 マウスの認知機能障害に対する GSM-2、エナンチオマーの効果	57
2-3.4.	脳内可溶性画分中 $A\beta$ 量および総 $A\beta$ 量に対する GSM-2、エナンチオマーの効果	58

2-3.5. 脳内新規合成 A $\beta$ 量に対する GSM-2 の効果	61
2-4. 考察	63
2-5. 小括	67
<b>総括</b>	<b>69</b>
<b>謝辞</b>	<b>71</b>
<b>論文目録</b>	<b>73</b>
<b>引用文献</b>	<b>75</b>



## 序論

認知症は認知機能の障害を主訴とする高齢者を中心とした脳疾患で、その罹患率は60歳以上で5-7%と報告されている (Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2009)。その半数以上を占めるのが、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease: AD) あるいはアルツハイマー型認知症と呼ばれる進行性の脳変性疾患であり、大脳皮質の顕著な萎縮を特徴とする。AD を発病した患者の認知機能は十数年にわたって徐々に低下していき、遂には寝たきり状態を経て死に至る。さらに周辺症状として、抑うつ、幻覚、妄想、人格変化、行動異常などが現れることから、介護者の負担も極めて大きい。世界規模での高齢化に伴い、患者数は今後 20 年間で倍増すると試算されており (Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2010)、効果的な治療法を確立することは社会的な急務である。現在、AD の治療には塩酸ドネペジルなどのアセチルコリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬のメマンチンが使用されているが、いずれも一時的に症状を緩和する対症療法薬であり、本質的な根本治療薬の開発が強く求められている。

AD 患者の脳では、老人斑および神経原線維変化と呼ばれる異常病理構造物が、特徴的な病理所見として認められる。老人斑はアミロイド  $\beta$  ペプチド ( $A\beta$ ) が細胞外で凝集塊を形成したものでアミロイド斑とも呼ばれ、AD の最初期に起こる病理変化であり、神経原線維変化に比べ疾患特異性が高い。さらに早期発症型家族性 AD (FAD) の原因遺伝子であるアミロイド前駆蛋白 (amyloid precursor protein: APP) およびプレセニリン 1 or 2 (PS1, PS2) が、いずれも  $A\beta$  の生成に直接関わる分子であったことから (De Strooper et al., 1998, Wolfe et al., 1999)、脳内での  $A\beta$  蓄積が AD の発症原因であるとするアミロイド仮説が提唱された (Hardy and Selkoe, 2002)。 $A\beta$  の生成は、その前駆体である APP が、まず  $\beta$ -セクレターゼ (beta-site APP cleaving enzyme 1: BACE1) によって細胞外領域を切断され (Sinha et al., 1999, Vassar et al., 1999, Yan et al., 1999)、その後、膜に残された C 末断片の  $\beta$ -CTF ( $\beta$ -carboxyl terminal fragment, C99 ともいう) が、 $\gamma$ -セクレターゼによって膜内切断される

ことによって達成される (Fig. 1A)。 $\gamma$ -セクレターゼによる切断位置は厳密でなく、結果として 36~43 残基の C 末端長の異なる複数種の  $A\beta$  が生成されるが、疾患との関連性が最も高いと考えられているのは 42 残基からなる  $A\beta_{42}$  である。 $A\beta_{42}$  は凝集性が高く、生成量としては最も多い  $A\beta_{40}$  の 10 分の 1 程度にも関わらず、アミロイド斑の構成量としては  $A\beta_{40}$  より多い。また、FAD の原因遺伝子変異の多くが、 $A\beta_{42}$  の生成量、もしくは  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  の生成比を上昇させるということも、 $A\beta_{42}$  を AD 発症の原因分子とする考えを支持するものといえる (Younkin, 1998, Murayama et al., 1999)。

アミロイド仮説が提唱され始めた 1990 年代は、可溶性の  $A\beta$  が会合して形成される不溶性の  $A\beta$  線維が、神経細胞毒性をもたらすものと考えられていたが、 $A\beta$  線維で構成される老人斑の量は必ずしも AD の臨床重症度と相関しない (Arriagada et al., 1992) など、その因果関係を疑問視する声も多かった。現在では、不溶性の  $A\beta$  線維よりむしろ可溶性の  $A\beta$  が細胞内および細胞外でオリゴマーを形成し、このオリゴマーがシナプス機能障害を引き起こすことで認知機能障害が生じる、という考え方が主流となっている (Klein et al., 2001, Selkoe, 2002, Tomiyama et al., 2008, McDonald et al., 2010)。 $A\beta$  オリゴマーによるシナプス機能障害の機序に関する報告は多岐にわたり、いまだ解明には至っていない。これまでに、 $A\beta$  オリゴマーが興奮性神経細胞シナプス上の複数の蛋白 ( $\alpha 7$  型ニコチン受容体、ephrin B2 受容体、プリオン受容体など) に結合すること、細胞内カルシウム濃度上昇と NMDA 受容体の細胞内在化を引き起こすこと、結果として神経突起スパインの消失とシナプス可塑性の低下が生じるなどが報告されている (Demuro et al., 2005, Lacor et al., 2007a, Shankar et al., 2007, Larson and Lesne, 2012)。これらの作用は可逆的であり、例えば  $A\beta$  の産生を抑制することで、オリゴマー形成が抑制されれば、シナプス機能の回復に繋がることが期待される。

$\gamma$ -セクレターゼは、PS1/2、ニカストリン、Pen-2 (presenilin enhancer-2) および Aph-1 (anterior pharynx defective-1) の 4 つの膜蛋白質を最小構成成分とする蛋白質複合体酵素であり、その活性中心はプレセニリンの第 6 および第 7 膜貫通領域にあるアスパラギン酸で

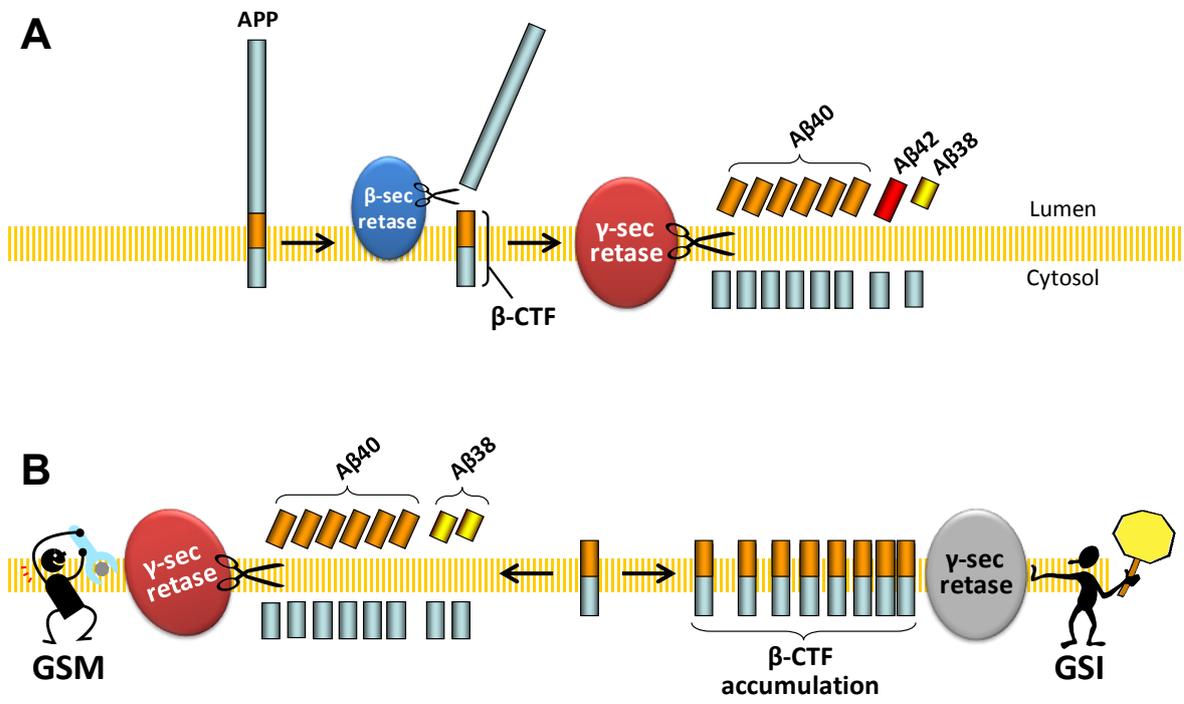
ある (De Strooper, 2003)。 $\gamma$ -セクレターゼを阻害することで  $A\beta$  の生成は顕著に抑えられることから、これまで数多くの  $\gamma$ -セクレターゼ阻害薬 ( $\gamma$ -secretase inhibitor: GSI) が創出され (Kreft et al., 2009)、AD 根本治療薬としての可能性が検討されてきた。しかし、 $\gamma$ -セクレターゼの基質特異性は低く、APP の他にも数十種類の I 型膜貫通蛋白が基質として同定されており (Kopan and Ilagan, 2004, McCarthy et al., 2009)、中には Notch 蛋白のように極めて重要な生理機能を担っている基質もある (De Strooper et al., 1999, Struhl and Greenwald, 1999)。Notch は  $\gamma$ -セクレターゼで切断されることで NICD (notch intracellular domain) とよばれる C 末断片を細胞内に放出し、これが核内に移行して、細胞分化に関わる種々の遺伝子の転写活性を調節する (Notch シグナリング) (Kopan and Ilagan, 2009)。GSI はこの Notch シグナリングを阻害することで、消化管粘膜細胞の異常分化や、免疫系細胞の分化障害といった重篤な副作用を引き起こすことが知られており (Milano et al., 2004, Wong et al., 2004)、これをいかに回避するかが研究の焦点とされてきた。

一方、 $\gamma$ -セクレターゼを阻害するのではなく、その機能を修飾することで、病因分子とされる  $A\beta_{42}$  の産生を選択的に抑制する、 $\gamma$ -セクレターゼモジュレーター ( $\gamma$ -secretase modulator: GSM) という概念の化合物も生み出された。2001 年、Weggen らが sulindac sulfide や ibuprofen などの一部の非ステロイド性抗炎症薬に GSM 活性があることを見出した (Weggen et al., 2001) のを契機に、数多くの GSM が同定、創出されてきた (Oehlrich et al., 2011)。GSM は  $\gamma$ -セクレターゼによる切断位置をシフトさせることで、 $A\beta_{42}$  産生を抑制する代わりに  $A\beta_{38}$  産生を促進し、結果的にトータルの  $A\beta$  産生量は変化させない (Fig. 1B)。また、Notch を含む他の  $\gamma$ -セクレターゼ基質の切断を阻害しないことから、GSI に代わる AD 治療薬候補として研究が進められてきた。

AD の病態・治療薬研究においては、モデル動物として、FAD 変異型の APP や PS1 を導入した遺伝子改変マウスが複数開発され、広く活用されてきた。中でも、 $A\beta$  産生効率を飛躍的に高める Swedish 型 APP (K670N/M671L) は有用性が高く、1996 年に Hsiao らによって開発された Tg2576 マウスは最も汎用されてきた系統である (Hsiao et al., 1996)。こ

れら遺伝子改変マウスでは、明確な脳の委縮までは確認できないものの、加齢依存的な脳内アミロイド斑の沈着と学習行動障害が認められることから、AD の病態をある程度反映していると考えられており、GSI や GSM の研究でも広く活用されてきた。しかし、それらの研究はもっぱら A $\beta$  産生やアミロイド斑形成に対する効果に着目したものであり、結果として本来求められるべき認知機能改善効果についてはほとんど検討されてこなかった。しかも AD 患者の脳内ではすでに無数のアミロイド斑が沈着しているにも関わらず、動物試験ではアミロイド斑形成前の若齢期から投与を開始する予防試験の報告がほとんどであった。

そこで本研究では、Tg2576 マウスを用いて GSI および GSM の認知機能に対する作用を中心とした検討を行い、その研究成果を記述した。第一章では、認知機能に対する GSI と GSM の作用の違いを初めて明らかにし、その機序に関する検討を行うとともに、臨床試験結果との関連性について考察した。第二章では、脳内アミロイド斑沈着後のモデル動物に対する GSM の薬理効果を初めて明らかにし、その機序に関する検討を行うとともに、AD 治療薬としての可能性について考察した。



**Fig. 1** Aβの生成およびGSI、GSMの作用の模式図

(A) APPがβ-セクレターゼで切断されてβ-CTFを生成し、これをγ-セクレターゼが切断することでAβが生成される。(B) GSIは全Aβの生成を抑制するため、β-CTFが蓄積する。GSMはAβ42生成を抑制する代わりにAβ38生成を促進するため、Aβの総生成量には影響せず、β-CTFは蓄積しない。



## 第一章 AD モデルマウスおよび正常マウスの認知機能に対する GSI、GSM の薬理効果に関する検討

### 1-1. 緒言

不溶性の A $\beta$  線維からなる脳内アミロイド斑は AD の特徴的病理像であるが、その量と臨床重症度との相関は低いことが知られている (Arriagada et al., 1992)。一方、もう一つの特徴的病理像である神経原線維変化は臨床重症度と相関するが、MacLean らによると、この神経原線維変化の量は不溶性の A $\beta$  量とは相関せず、可溶性の A $\beta$  量と相関した (McLean et al., 1999)。脳内の可溶性 A $\beta$  量はシナプス密度の低下とも相関することが報告されており (Lue et al., 1999)、可溶性 A $\beta$  と認知機能障害との関連が示唆される。変異型 APP トランスジェニックマウス (APP マウス) において、学習機能の障害がアミロイド斑の形成より先に現れてくることも、可溶性 A $\beta$  と認知機能障害の因果関係を支持するものと言える (Holcomb et al., 1999, Van Dam et al., 2003)。従って、薬剤により可溶性 A $\beta$  を低下させることは、認知機能障害の改善に繋がると期待される。

$\gamma$ -セクレターゼは A $\beta$  生成経路の最終段階を担う酵素であり、GSI はその活性を阻害することで脳内の A $\beta$  量を低下させる。そこで新規 AD 治療薬を目指して、これまで数多くの GSI が創出され、複数の化合物が臨床試験まで進んだ (Kreft et al., 2009)。最初に臨床入りした GSI は LY450139 (semagacestat) で、ヒトでも血漿および脳脊髄液中の A $\beta$  を低下できることを初めて示したが (Siemers et al., 2006, Bateman et al., 2009)、消化器症状や毛髪の脱色など、Notch 阻害作用に基づくと考えられる副作用が認められた (Fleisher et al., 2008)。その後、Notch 阻害作用を乖離させる研究が進み、GSI-953 (Begacestat) (Martone et al., 2009) や BMS-708163 (avagacestat) (Albright et al., 2012) などが臨床入りした。しかし、これまでの GSI 研究では A $\beta$  低下作用と Notch 阻害作用に焦点が置かれ、本来結果として期待されるべき認知機能改善作用については、ほとんど検討されてこなかった。GSI によ

る A $\beta$  生成阻害は、その基質である  $\beta$ -CTF の蓄積を必ず伴うことが分かっているが (Anderson et al., 2005, Abramowski et al., 2008) (Fig. 1B)、実はこの  $\beta$ -CTF は神経細胞毒性やシナプス障害性を有する可能性が示唆されている (Oster-Granite et al., 1996, Nalbantoglu et al., 1997, Suh et al., 2000, Bittner et al., 2009)。従って、GSI によって A $\beta$  が低下しても、必ずしも認知機能改善に繋がらない可能性も考えられる。

一方、GSM は A $\beta$ 42 の生成を抑制するだけで総 A $\beta$  量は低下させないので、 $\beta$ -CTF の蓄積は起こさない (Weggen et al., 2003, Kounnas et al., 2010)。2001 年、Weggen らによって一部の NSAIDs が GSM 作用を有することが発見された (Weggen et al., 2001) ことを契機に、類縁化合物が数多く合成された (Oehlrich et al., 2011)。Tarenflurbil (R-flurbiprofen) もその一つで、GSM として初めて臨床入りし、Phase III まで進んだが、患者の症状進行は抑制されなかった (Green et al., 2009)。これらの GSM は第一世代と呼ばれ、主活性は  $10^{-5}$ ~ $10^{-4}$  オーダーと弱く、また脳内移行性も数パーセント未満と低かった (Eriksen et al., 2003) ことから、臨床効果に結び付かなかつたと考えられている。その後、主活性が  $10^{-7}$ ~ $10^{-8}$  オーダーと強く、脳内移行性も良好な第二世代 GSM として、フェニルイミダゾールタイプ (Kounnas et al., 2010) やカルボキシメチルピペリジンタイプの GSM (Hawkins et al., 2011) が見出され、一部が臨床まで進んでいる。しかし、これら GSM 研究もまた、A $\beta$ 42 低下作用にのみ着目し、本来結果として期待されるべき認知機能改善作用についてはほとんど検討されてこなかった。また、A $\beta$ 42 はその易凝集性 (Jarrett et al., 1993, McGowan et al., 2005) や強いシナプス毒性 (Mucke et al., 2000, Lacor et al., 2007b, Kuperstein et al., 2010)、および病理学的・遺伝学的知見 (Iwatsubo et al., 1994, Younkin, 1998) から AD 病態形成の病因分子と考えられてきたが、実際に総 A $\beta$  量を低下させることなく、A $\beta$ 42 だけを低下させることで、認知機能の改善が達成できることを示した報告はない。

本検討では、GSI および GSM の認知機能に対する作用を明らかにするため、Tg2576 マウスおよび野生型マウスを用いて、Y-maze 学習行動試験を行った。テスト化合物には GSI として LY450139 および BMS-708163、GSM としてカルボキシメチルピペリジンタイ

プの GSM-2 (Fig. 2) を用い、各化合物の行動学的および神経生化学的作用を検討し、GSI と GSM の違い、および臨床試験結果との関連性について考察した。

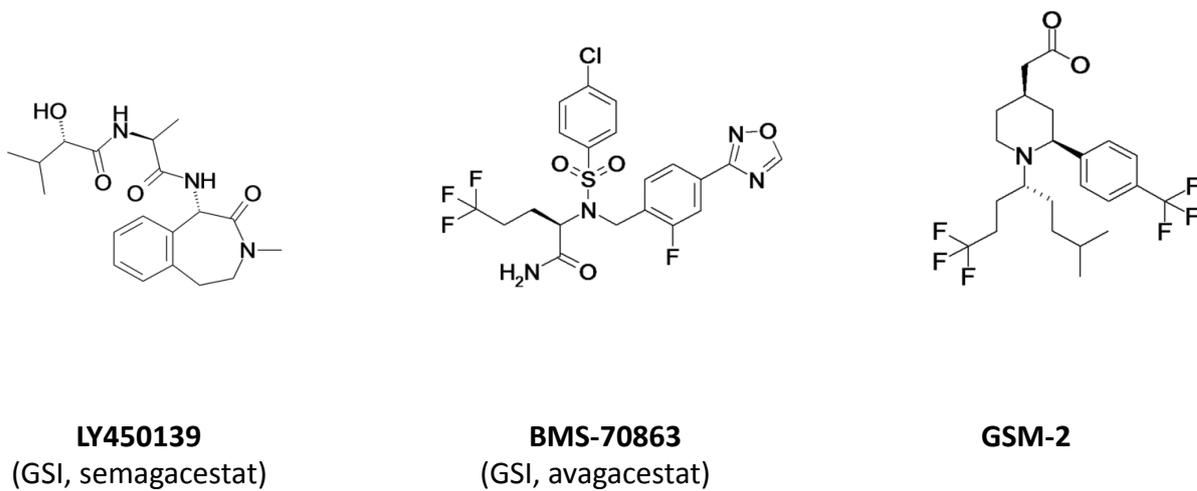


Fig. 2 LY450139、BMS-708163、GSM-2 の化学構造式

## 1-2. 方法

### 1-2.1. 化合物

LY450139、BMS-708163、および GSM-2 は、文献 (Pu et al., 2008, Gillman et al., 2010) または公開特許 (Garcia et al., 2007) の方法に従い合成した。これら化合物は、細胞実験においてはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地で希釈して使用した (最終 DMSO 濃度 0.5%)。動物実験においては 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、10 mL/kg の量で単回もしくは 8 日間反復 (1 日 1 回) 経口投与した。

### 1-2.2. 動物

ヒト APP695 の Swedish 変異体 (K670N/M671L) 遺伝子が導入された Tg2576 マウス (Hsiao et al., 1996) を繁殖し、同腹の野生型マウスとともに、3 カ月齢または 5.5 カ月齢で実験に使用した。繁殖は、Mayo Foundation for Medical Education and Research (Rochester, MN, USA) より雄の Tg2576 マウスを入手し、B6SJLF1/J マウス (日本チャールスリバー) の雌と交配させることで行った。本系統の雄は攻撃性が高く、群飼育で傷害を与えるため、行動試験には不適と考え、本試験では雌のみを使用した。動物は、固形飼料および水を自由摂取させ、室温  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$  および湿度  $55\pm 15\%$ 、12:12 時間の明暗サイクル (明期 : 7 : 30-19 : 30) の条件で飼育した。全ての動物実験は、アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承認を得て、American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) 認定施設にて実施した。

### 1-2.3. 細胞系 APP プロセッシング実験

ヒト神経膠腫細胞株 (H4) を用いて、ヒト野生型 APP695 の安定発現細胞株 (APP-H4)

を作製した。細胞は、10%非働化済ウシ胎児血清、100 units/mL ペニシリン、および 100  $\mu\text{g/mL}$  ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) を用いて、10 cm 培養シャーレ中で維持培養し (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)、実験前日に 96-well、または 6-well プレートに約  $1.5 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。翌日、種々の濃度の化合物を含む培地に交換し、その 24 時間後に培地を回収した。回収した培地中の A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、および A $\beta$ 1-38 濃度を市販の ELISA キット (A $\beta$ 1-42, 和光純薬; A $\beta$ 1-40 および A $\beta$ 1-38, 免疫生物研究所) を用いて測定した。培地回収後の細胞は、Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics) を溶解させた RIPA 緩衝液 (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS; pH 7.6) を用いて溶解し、 $\beta$ -CTF 量の測定 (ELISA キット, 免疫生物研究所)、細胞生存率の測定 (CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit, Promega)、およびウェスタンブロット (1-2.8 項) に使用した。IC<sub>50</sub> 値は Prism 5 software (GraphPad) を用いて非線形回帰分析により算出し、3 回の実験の平均 $\pm$ 標準誤差で表した。

#### 1-2.4. 細胞系 Notch シグナリング実験

恒常活性型 Notch (Notch $\Delta$ E) 発現ベクターの作製は、Kopan らの方法 (Kopan et al., 1996) をもとに、配列をマウス型からヒト型に変更して行った。すなわち、ヒト Notch1 をコードする mRNA 領域 (NM\_017617) のうち、1-60 番塩基、および 5193-6657 番塩基部分を pDNA3.1 ベクターに導入した。実験前日に H4 細胞を 96-well プレートに播種し、翌日、Notch $\Delta$ E 発現ベクター、および市販の RBP-Jk 応答ルシフェラーゼ発現ベクター (Cignal RBP-Jk Reporter Assay Kit, SA Bioscience) を、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて細胞に一過性に導入した (37°C, 4 時間)。ベクター導入後、培地を種々の濃度の化合物を含む培地に交換し、その 16 時間後、細胞中のルシフェラーゼ活性を市販のキット (Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega) を用いて測定した。RBP-Jk は、Nocth から  $\gamma$ -セクレター

ぜによって細胞内に切り出されるフラグメント (Notch intracellular domain, NICD) によって活性化する転写因子であり、本実験系ではその応答活性、すなわちルシフェラーゼ発現量 (=酵素活性) を測定することで、Notch シグナリング活性の指標とした。IC<sub>50</sub> 値は Prism 5 software (GraphPad) を用いて非線形回帰分析により算出し、3 回の実験の平均±標準誤差で表した。

### 1-2.5. 学習行動実験

一群 7-8 例のマウスを用いて、その空間作業記憶能力を Y-maze 試験により評価した。3 本のアームを等角度で接続したポリ塩化ビニル製 (灰色) の Y 字型迷路を作製し (アームの長さ 40 cm, 高さ 13 cm, 底幅 3 cm, 口幅 10 cm)、実験に使用した。1 日目および 8 日目の化合物投与 3 時間後にマウスをアームの先端に入れて、8 分間自由に探索させ、進入したアームの順番および回数を記録した。全てのアームに連続して進入することを自発交替行動と呼び、その総進入回数 (10 回未満の場合は除外) に対する割合 (以下の計算式) をもって空間作業記憶能力の指標とした。

$$\text{自発交替行動の割合 (\%)} = \text{自発交替行動回数} \div (\text{総進入回数} - 2) \times 100$$



### 1-2.6. 脳内可溶性 A $\beta$ および $\beta$ -CTF 量の測定

1 日目または 8 日目の Y-maze 試験終了直後にマウスを断頭し、氷上で海馬を摘出した。摘出後、速やかに液体窒素中で急速冷凍させ、-80°C で保管した。冷凍サンプルを秤量し、

その 10 倍量の TBS 緩衝液 (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl; pH 7.4; Complete Inhibitor Cocktail を含む) と超音波ホモジナイザーを用いて、氷上でホモジナイズした。ホモジネートを 100,000 g、4°C で 1 時間超遠心し、得られた上清中の A $\beta$  x-42 および A $\beta$  x-40 濃度を ELISA キット (和光純薬) を用いて測定した。また、遠心前のホモジネートの一部を 2% SDS で溶解させ、 $\beta$ -CTF 量を ELISA キット (免疫生物研究所) を用いて測定した。その際、キット付属の希釈液で、Tg2576 マウスのサンプルは 730 倍に、野生型マウスのサンプルは 6 倍に希釈した。野生型マウスでは、検量線用標準試料としてマウス型リコンビナント  $\beta$ -CTF (免疫生物研究所より譲受) を用い、最終 SDS 濃度が脳サンプルと同じ 0.33% となるよう調製した。この濃度の SDS は測定反応効率を約 30% 低下させたが、定量性に問題はなかった (両軸対数プロットによる直線性  $r > 0.99$ )。以上の方法により測定した A $\beta$  x-42、A $\beta$  x-40、および  $\beta$ -CTF の溶媒投与群における絶対量は、Tg2576 マウスでそれぞれ、 $1.9 \pm 0.1$ 、 $11.6 \pm 0.6$ 、および  $21.2 \pm 2.5$  pmol/g tissue (9 試験の測定平均  $\pm$  標準誤差)、野生型マウスでそれぞれ、 $0.12 \pm 0.00$ 、 $0.72 \pm 0.02$ 、および  $0.48 \pm 0.03$  pmol/g tissue (6 試験の測定平均  $\pm$  標準誤差) であった。

### 1-2.7. *In vivo* における Notch シグナリング阻害作用の評価

一群 6-7 例のマウスを使用し、Notch シグナリング標的遺伝子として Hes1 および Hey1 の mRNA 発現量を、qPCR 法により測定した。化合物を単回投与 3 時間後に海馬および胸腺を摘出し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。RNeasy kit (QIAGEN) を用いてトータル RNA を抽出し、SuperScript III (Invitrogen) を用いて cDNA を調製した。Power SYBER Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて Hes1、Hey1、および  $\beta$ -actin の cDNA 量を測定し、 $\beta$ -actin の cDNA 量で標準化した。用いたプライマーの配列を以下に示す。

Hes1, forward: CCAGCCAGTGTCAACACGA; reverse: AATGCCGGGAGCTATCTTTCT

Hey1, forward: GCGCGGACGAGAATGGAAA; reverse: TCAGGTGATCCACAGTCATCTG

$\beta$ -actin, forward: CGTGAAAAGATGACCCAGATC; reverse: GCCTGGATGGCTACGTACATG

### 1-2.8. ウェスタンブロット

細胞ライセートおよび脳ホモジネートから、Blue Loading Buffer Pack (Cell Signaling) を用いてローディング用サンプルを調製し、5 分間ボイルした後、SDS-PAGE (15% gel) によりタンパクを展開した。タンパクを PVDF 膜 (0.45  $\mu$ m 孔) に転写し、ブロッッキング処理した後、以下に示す一次抗体および二次抗体と反応させた。

一次抗体：抗 A $\beta$ -N 末端特異的マウスモノクローナル抗体 (clone 82E1, 免疫生物研究所; 100 倍希釈), 抗 A $\beta$ 1-16 領域マウスモノクローナル抗体 (clone 6E10, Covance; 1000 倍希釈), 抗 APP-C 末領域ウサギポリクローナル抗体 (#A8717, Sigma-Aldrich; 1000 または 5000 倍希釈), 抗 N-cadherin マウスモノクローナル抗体 (#610920, BD Biosciences; 200 倍希釈), 抗 EphA4 マウスモノクローナル抗体 (clone 6H7, Merck Chemicals; 200 倍希釈), 抗  $\beta$ -tubulin マウスモノクローナル抗体 (clone AA2, Millipore; 1000 または 5000 倍希釈)

二次抗体：HRP 結合抗マウス IgG ヒツジ抗体 (#NA931, GE Healthcare), HRP 結合抗ウサギ IgG ロバ抗体 (#NA934, GE Healthcare)

バンドを ECL plus (GE Healthcare) を用いて発光させ、発光密度を Quantity One 4.6.5 software (Bio-Rad) を用いて定量した。

### 1-2.9. 蛍光免疫組織化学

一群 7-8 例のマウスに対し化合物を 8 日間投与し、最終投与 3 時間後に、イソフルラン吸入麻酔下、左心室から 10 mM PBS (pH 7.4) を灌流し、脳を摘出した。大脳半球を 4% パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液に漬け、4°C で 2 日間、浸漬固定した後、16% スクロース/リン酸緩衝液に交換し、4°C で 2 日間以上かけて置換した (途中 2 回溶液交換)。CO<sub>2</sub> ガスを用いて脳を急速冷凍した後、クリオスタットを用いて 20  $\mu$ m 厚の冠状切片を作製した。マウス脳アトラス (Paxinos and Watson) を参照しながら、bregma より -1.70 から -1.94 mm 付近の切片を各個体から 1 枚ずつ選択し、10% ヤギ血清 (Vector Laboratories) でブロッキング処理 (室温 2 時間) した後、以下に示す一次抗体で 16 時間、続いて二次抗体で 2 時間、室温で浮遊反応させた。

一次抗体： 抗 A $\beta$ -N 末端特異的マウスモノクローナル抗体 (clone 82E1, 免疫生物研究所; 200 倍希釈), 抗 APP-C 末領域ウサギポリクローナル抗体 (#A8717, Sigma-Aldrich; 2000 倍希釈), 抗 Synaptophysin ウサギモノクローナル抗体 (clone YE269, Millipore; 500 倍希釈), 抗 drebrin A ウサギポリクローナル抗体 (#28023, 免疫生物研究所; 200 倍希釈)

二次抗体： Alexa-Fluor 488 結合抗マウス IgG ヤギ抗体 (#A11011, Invitrogen), Alexa-Fluor 546 結合抗ウサギ IgG ヤギ抗体 (#A11035, Invitrogen)

切片をスライドガラスにマウントした後、ORCA-ER デジタルカメラ (浜松ホトニクス) を搭載した ECLIPSE 80i 蛍光顕微鏡 (ニコン)、または LSM5Pascal 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて染色像を撮影した。海馬の各層 (CA1b 領域の錐体細胞層/放射状層/網状分子層、CA1c 領域の上昇層遠位、CA3a から 3b 領域の錐体細胞層/透明層、顆粒細胞層、分子層、および歯状回門) における染色強度を、歯状回門は全域、その他の層は 750  $\times$  16  $\mu$ m の範囲を Image J 1.44p software (NIH) を用いて選択し、数値化した。デー

タは CA3 錐体細胞層を参照部位とし、その数値で各切片毎に標準化した。標準化前の参照部位の染色強度に群間の差は見られなかった。

#### 1-2.10. 統計解析

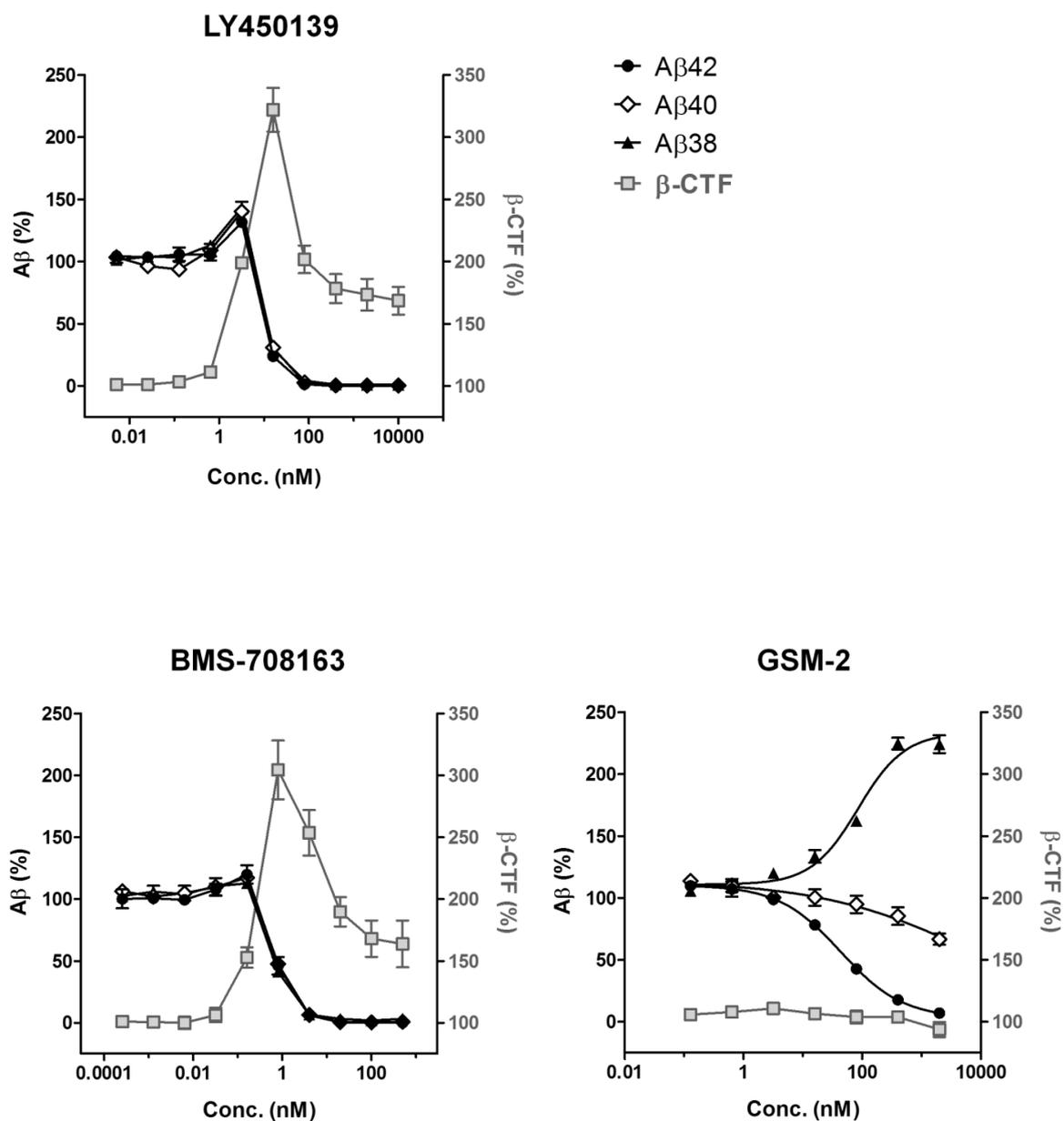
データは平均±標準誤差で表し、SAS software (SAS Institute) を用いて統計解析した。2 群間の解析には Student t 検定、3 群間以上の解析には Dunnett 検定を用い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 1-3. 結果

#### 1-3.1. 培養細胞における APP プロセッシングに対する GSI、GSM の効果

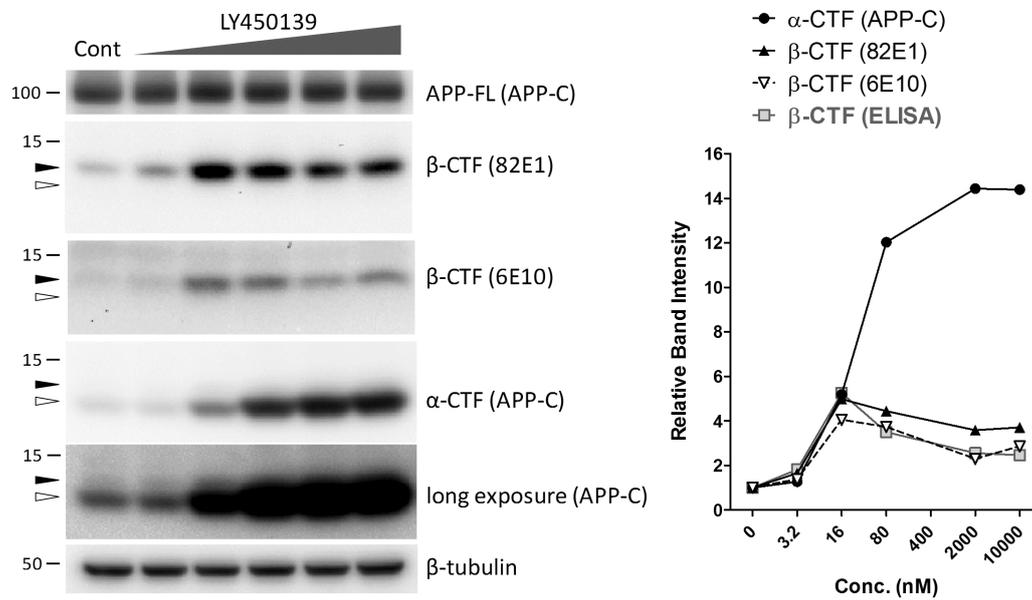
はじめに、化合物の APP プロセッシングに対する作用を、ヒト野生型 APP を安定発現させた H4 細胞を用いて検討した。LY450139 は細胞による A $\beta$ 42、A $\beta$ 40、および A $\beta$ 38 産生をいずれもほぼ同じ作用濃度で阻害し、その IC<sub>50</sub> は 10.9-12.0 nM であった。同様に、BMS-708163 も 3 種の A $\beta$  産生を阻害し、その IC<sub>50</sub> は 0.66-0.79 nM であった。一方、細胞中の  $\beta$ -CTF 量は両化合物によって上昇し、その作用は A $\beta$  産生の IC<sub>50</sub> 付近で最大となったが、さらに高濃度では減弱した。GSM-2 は A $\beta$ 42 産生を選択的に阻害し、A $\beta$ 40 産生は高濃度でのみ阻害した。A $\beta$ 38 産生は逆に増大させ、その EC<sub>50</sub> (81.3 nM) は A $\beta$ 42 産生の IC<sub>50</sub> (65.2 nM) に近い値を示した。 $\beta$ -CTF 量はいずれの濃度においても変化させなかった。(Fig. 3, Table 1)

LY450139 による  $\beta$ -CTF 上昇作用が高濃度で減弱した点については、ウェスタンブロットでも確認した。6-well プレートで培養した細胞中の  $\beta$ -CTF を、A $\beta$  の N 末領域を認識する 2 種類の抗体 (82E1 および 6E10) をそれぞれ用いて検出、定量したところ、いずれの抗体を用いた場合も ELISA とほぼ同様の結果が得られた。APP は  $\beta$ -セクレターゼ以外に、 $\alpha$ -セクレターゼによっても切断され、 $\beta$ -CTF より 16 残基短い  $\alpha$ -CTF が生成されるが、この  $\alpha$ -CTF も  $\gamma$ -セクレターゼの基質となる。そこで、APP の C 末領域を認識する抗体を用いて  $\alpha$ -CTF を検出、定量したところ、 $\alpha$ -CTF はシグモイド型の増大曲線を示し、高濃度での作用減弱は認められなかった。(Fig. 4)



**Fig. 3** 培養細胞における APP プロセシングに対する GSI、GSM の効果

APP 強制発現 H4 細胞を各薬剤に 24 時間曝露させた後、培養液中に分泌された Aβ42、Aβ40、Aβ38 (左軸)、および細胞中の β-CTF (右軸) を ELISA にて測定した。データは 3 回の実験の平均±標準誤差。(IC<sub>50</sub>、EC<sub>50</sub>、EC<sub>max</sub> は Table 1 に記載)

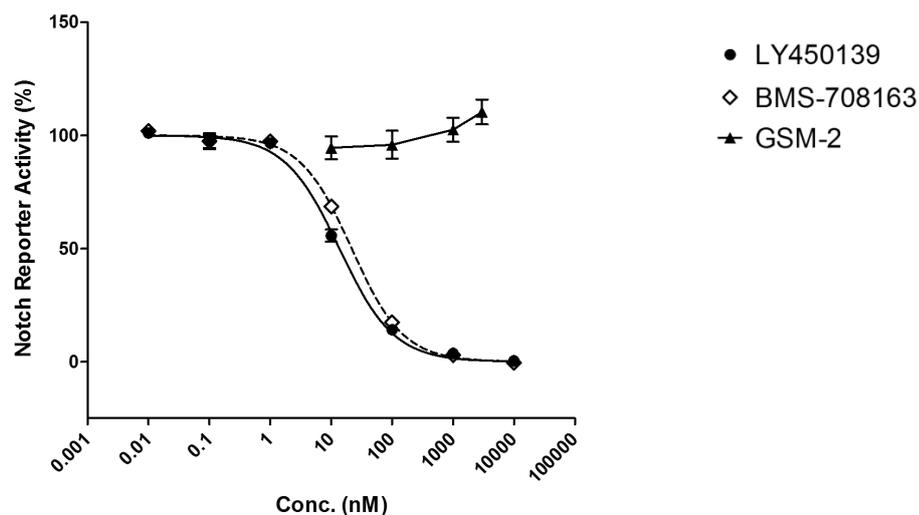


**Fig. 4** 培養細胞における  $\beta$ -および  $\alpha$ -CTF 量に対する GSI の効果

APP 強制発現 H4 細胞を LY450139 (3.2、16、80、2000、および 10,000 nM) に 24 時間暴露させた後、細胞中の  $\beta$ -および  $\alpha$ -CTF をウェスタンブロットにより定量した。82E1 および 6E10 は  $\beta$ -CTF の N 末領域認識抗体。APP-C は  $\beta$ -および  $\alpha$ -CTF の C 末領域認識抗体。APP-FL は全長 APP。

### 1-3.2. 培養細胞における Notch シグナリングに対する GSI、GSM の効果

化合物の Notch シグナリングに対する作用を、ヒト Notch $\Delta$ E を一過性に発現させた H4 細胞、および NICD レポーターアッセイシステムを用いて検討した。本系において、LY40139 および BMS-708163 は Notch シグナリング阻害作用を示し、IC<sub>50</sub> はそれぞれ 14.1 および 20.6 nM であった。一方、GSM-2 は 3  $\mu$ M まで検討したが、阻害は全く認められなかった (Fig. 5)。LY450139 では A $\beta$ 42 産生 IC<sub>50</sub> との乖離をほとんど示さなかったが、BMS-708163 では 26 倍、GSM-2 では 46 倍以上の乖離を示した。(Table 1)



**Fig. 5** 培養細胞における Notch シグナリングに対する GSI、GSM の効果

Notch $\Delta$ E および RBP-Jk 応答ルシフェラーゼを発現させた H4 細胞を各薬剤に 16 時間曝露させた後、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定し、Notch シグナリング活性の指標とした。データは 3 回の実験の平均±標準誤差。(IC<sub>50</sub> は Table 1 に記載)

**Table 1.**

培養細胞における APP プロセッシングおよび Notch シグナリングに対する各薬剤の作用強度

		LY450139	BMS-708163	GSM-2
		<i>nM</i>	<i>nM</i>	<i>nM</i>
Aβ42	IC <sub>50</sub>	10.9 ± 0.6	0.79 ± 0.15	65.2 ± 2.3
Aβ40	IC <sub>50</sub>	12.1 ± 0.5	0.78 ± 0.09	>2000
Aβ38	IC <sub>50</sub>	12.0 ± 0.3	0.66 ± 0.02	-
	EC <sub>50</sub>	-	-	81.3 ± 6.0
β-CTF	EC <sub>max</sub>	16.0 ± 0.0	0.80 ± 0.00	No change
Notch	IC <sub>50</sub>	14.1 ± 2.5	20.6 ± 1.3	>3000
	Notch/Aβ42	1.3	26	>46

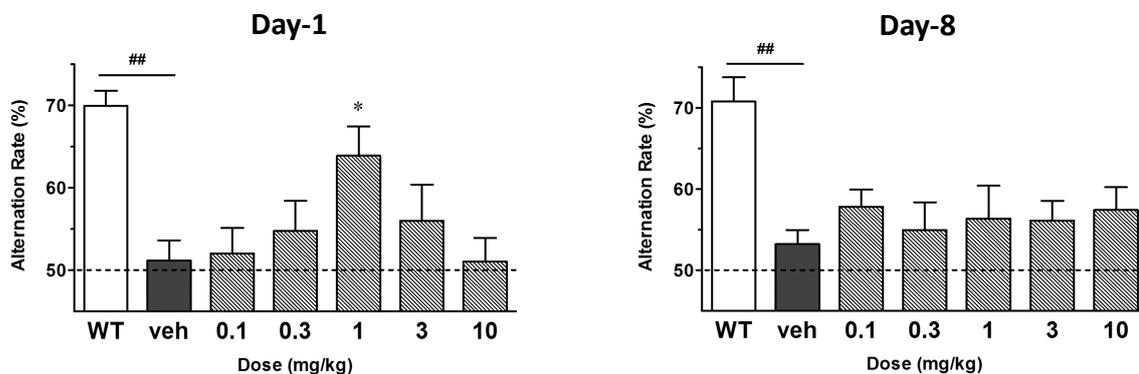
各値は 3 回の実験の平均±標準誤差。EC<sub>max</sub> は β-CTF が最大上昇した時の薬剤濃度。

### 1-3.3. 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの認知機能障害、および脳内 A $\beta$ 、 $\beta$ -CTF に対する GSI、GSM の効果

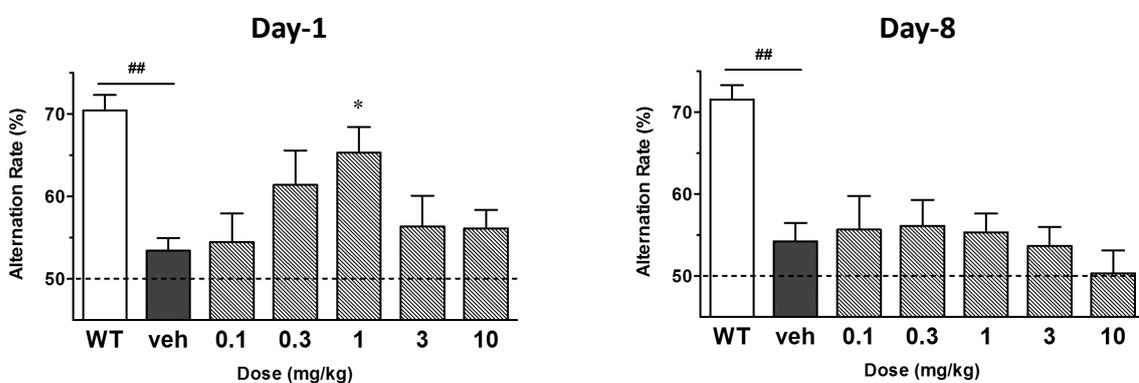
化合物の認知機能に対する作用を明らかにするため、5.5 カ月齢の Tg2576 マウスを用いて Y-maze 試験を行った。本マウスは溶媒投与群において、野生型マウスと比べて有意な自発交替行動割合の低下、すなわち空間作業記憶機能の障害を示した。投与 1 日目では、いずれの化合物もベルシェイプの改善作用を示し、その作用は LY450139 および BMS-708163 では 1 mg/kg、GSM-2 では 0.1 および 0.3 mg/kg において有意であった。しかし反復投与 8 日目では、LY450139 および BMS-708163 投与による改善作用は消失した。一方、GSM-2 は、1 日目で改善が認められた用量に加え、1 および 3 mg/kg でも有意な改善作用を示した (Fig. 6)。いずれの試験においても、化合物投与による総進入回数への影響は認められなかった (data not shown)。

8 日目の Y-maze 試験直後の海馬における可溶性 A $\beta$  および  $\beta$ -CTF 量を測定した結果、LY450139 は 10 mg/kg で有意な A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 低下作用を、1 mg/kg から用量依存的かつ有意な  $\beta$ -CTF 増加作用を示した。BMS-708163 は 3 mg/kg から用量依存的かつ有意な  $\beta$ -CTF 増加作用を示したが、A $\beta$  低下作用は 10 mg/kg まで認められなかった。GSM-2 は 0.3 mg/kg から有意な A $\beta$ 42 低下作用を示し、A $\beta$ 40 および  $\beta$ -CTF 量は変化させなかった。1 日目と 8 日目で化合物の認知機能改善作用に違いが認められたことから、再度別のマウスに化合物を投与し、1 日目の海馬における A $\beta$  および  $\beta$ -CTF 量を測定した。しかし、結果は 8 日目とほぼ同様であった。(Fig. 7)

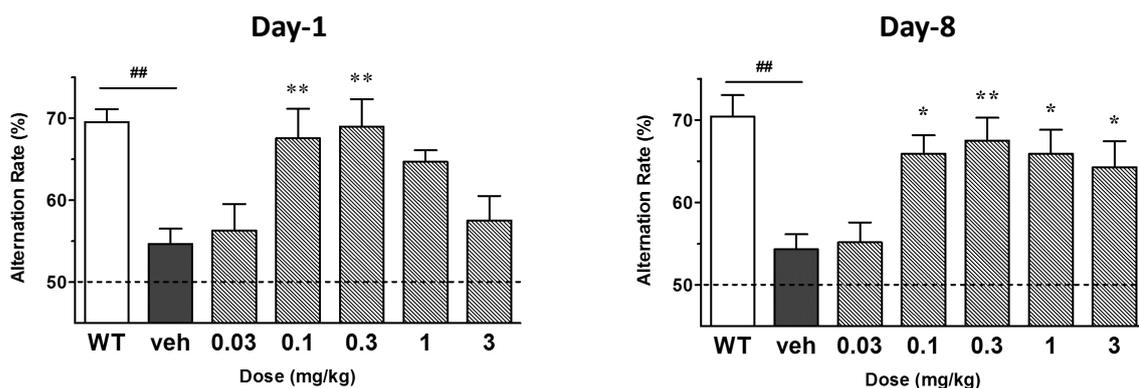
### LY450139



### BMS-708163



### GSM-2

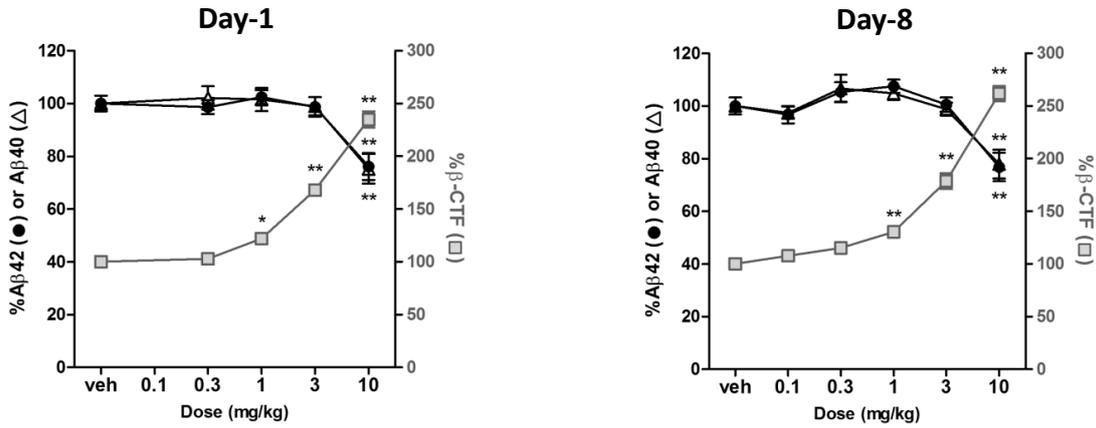


**Fig. 6** 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの認知機能障害に対する GSI、GSM の効果

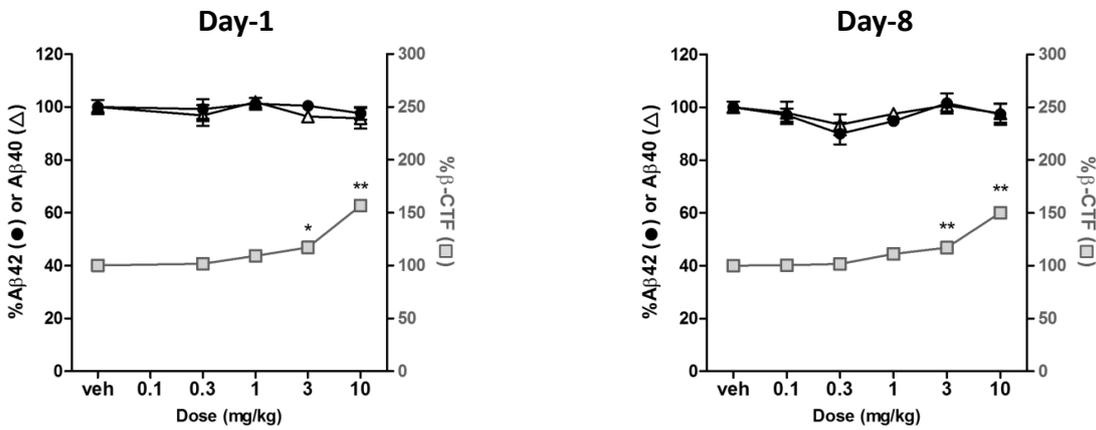
各薬剤を 8 日間反復経口投与し、1 日目 (左図) および 8 日目 (右図) の投与 3 時間後に Y-maze 試験を行った。点線は交替行動のチャンスレベル (=最大障害)。##  $p < 0.01$ : Student's t 検定。

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。平均±標準誤差 (n=7-8)。

LY450139



BMS-708163



GSM-2

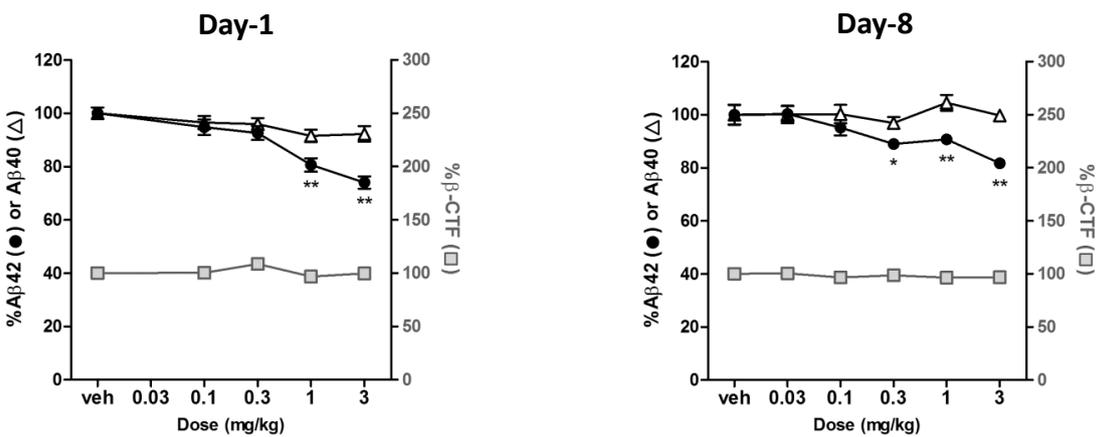


Fig. 7 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの脳内 Aβ、β-CTF に対する GSI、GSM の効果

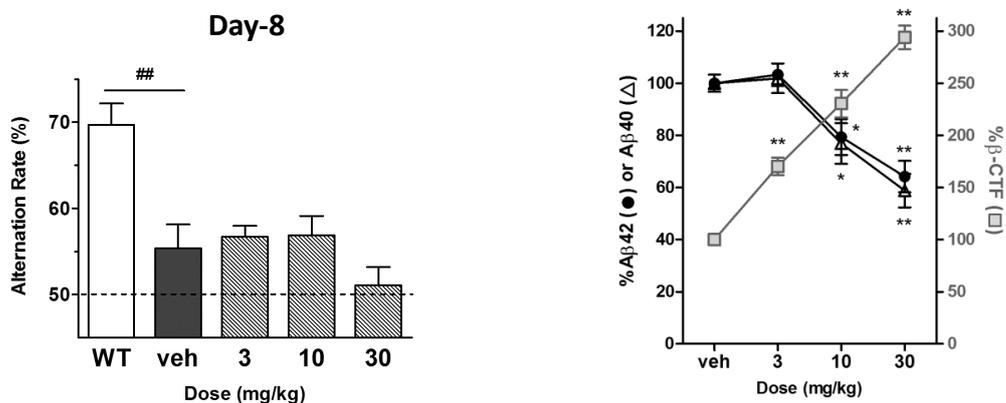
各薬剤を単回投与 3 時間後 (左図)、または 8 日目の Y-maze 試験直後 (右図) に海馬を摘出し、Aβ および β-CTF を ELISA により測定した。\* p<0.05, \*\* p<0.01: Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。平均±標準誤差 (n=7-8)。

#### 1-3.4. 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの認知機能障害、および脳内 A $\beta$ 、 $\beta$ -CTF に対する高用量 GSI、GSM の効果

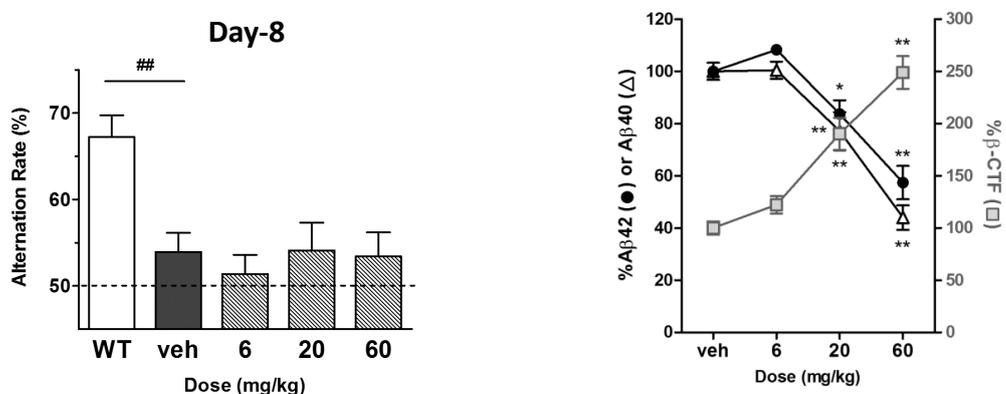
前項で、GSI の反復投与は Tg2576 マウスの認知機能障害を改善しなかったが、さらなる検証のため、より強い脳内 A $\beta$  低下を示す用量まで上げ、再度実験を行った。8 日目の Y-maze 試験直後の海馬における可溶性 A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 は溶媒投与群と比べ、LY450139 の 30 mg/kg でそれぞれ 36 および 41%、BMS-708163 の 60 mg/kg でそれぞれ 43 および 56% の著しい低下を示した。しかし本試験においても、全ての用量群で認知機能障害に改善は認められなかった。このとき海馬の  $\beta$ -CTF は、LY450139 で最大 2.9 倍、BMS-708163 で最大 2.5 倍の著しい増加を示した (Fig. 8)。高用量反復投与による一般状態の悪化は観察されず、総進入回数および体重にも影響は認められなかった (data not shown)。

GSM-2 についても 30 mg/kg まで用量を上げ、再度実験を行った。8 日目の Y-maze 試験直後の海馬における可溶性 A $\beta$ 42 は、最大 51% の著しい低下を示したが、A $\beta$ 40 および  $\beta$ -CTF 量に変化は認められなかった。認知機能障害は 0.3-30 mg/kg で有意な改善を示した。  
(Fig. 8)

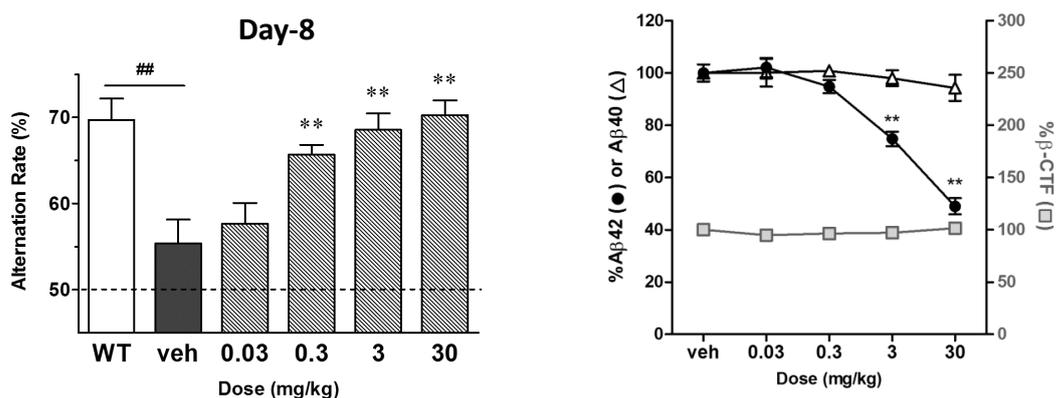
## LY450139



## BMS-708163



## GSM-2



**Fig. 8** 5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの認知機能障害、および脳内 Aβ、β-CTF に対する高用量 GSI、GSM の効果

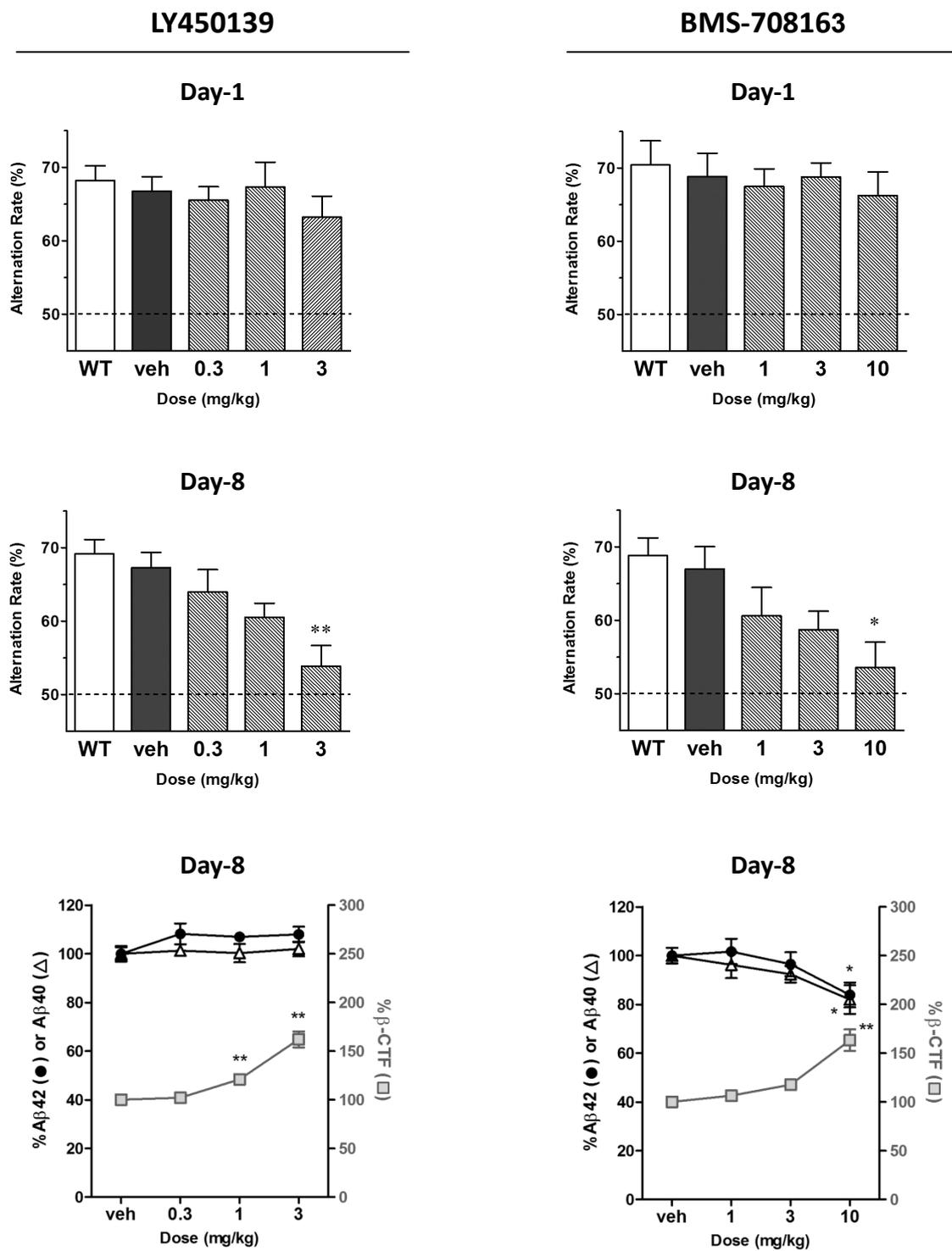
各薬剤を 8 日間反復投与し、8 日目の投与 3 時間後に Y-maze 試験を行った (左図)。Y-maze 試験直後に海馬を摘出し、Aβ および β-CTF を ELISA にて測定した (右図)。## p<0.01: Student's t 検定。

\* p<0.05, \*\* p<0.01: Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。平均±標準誤差 (n=7-8)。

### 1-3.5. 3 カ月齢 Tg2576 マウスの正常認知機能、および脳内 A $\beta$ 、 $\beta$ -CTF に対する GSI の効果

GSI の反復投与で認知機能障害が改善されなかった原因を考察するため、障害を発症する前の 3 カ月齢の Tg2576 マウスを用いて、その正常レベル認知機能に対する作用を検討した。その結果、投与 1 日目の Y-maze 試験では、LY450139 および BM-708163 とともに何ら作用を示さなかったが、投与 8 日目では、いずれの化合物も用量依存的に認知機能を障害し、その作用は LY450139 の 3 mg/kg、および BMS-708163 の 10 mg/kg で有意であった (Fig. 9)。このように、GSI の反復投与はむしろ認知機能を障害し、そのため、5.5 カ月齢マウスの障害を改善できなかった、と考えられた。

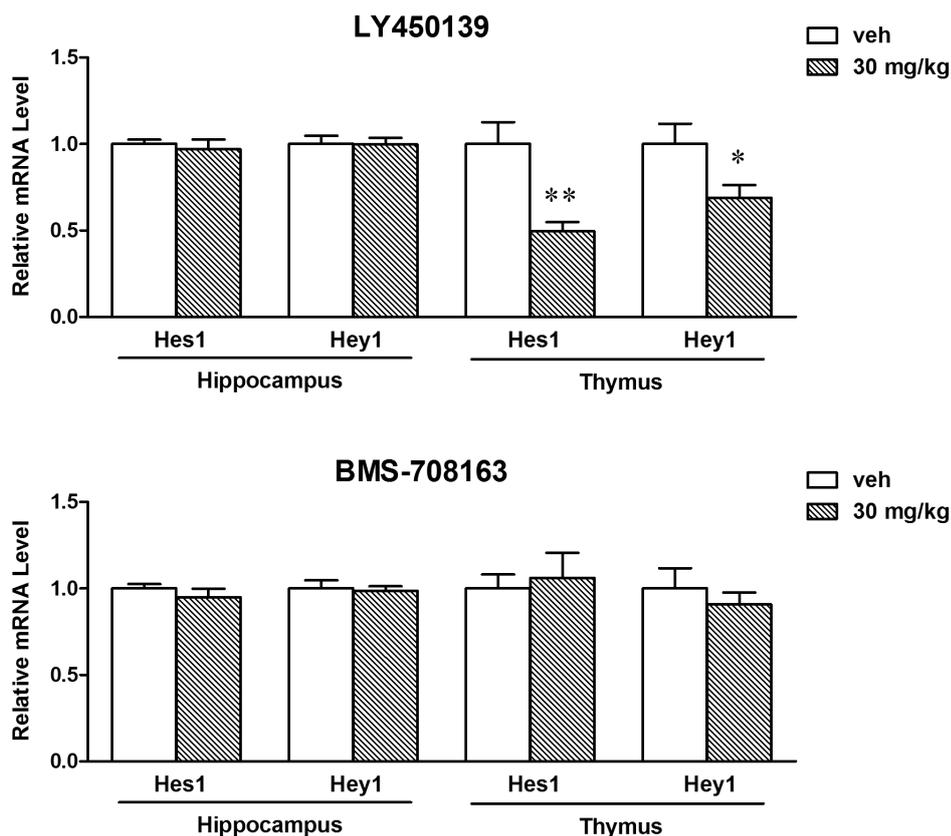
8 日目の Y-maze 試験直後の海馬における可溶性 A $\beta$  は、LY450139 の 3 mg/kg では低下を認めず、BMS-708163 の 10 mg/kg では有意な低下を認めた。一方、 $\beta$ -CTF は両化合物において用量依存的かつ有意な増加を認め、その作用は 5.5 カ月齢マウスに対する作用と同等であった。(Fig. 9)



**Fig. 9** 3カ月齢 Tg2576 マウスの正常認知機能、および脳内 Aβ、β-CTF に対する GSI の効果  
 各薬剤を 8 日間経口投与し、1 日目 (上段) および 8 日目 (中段) の投与 3 時間後に Y-maze 試験  
 を行った。8 日目の Y-maze 試験直後に海馬を摘出し、Aβ、β-CTF を ELISA にて測定した (下段)。  
 # p<0.01: Student's t 検定。\* p<0.05, \*\* p<0.01: Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。平均±標準誤差  
 (n=7-8)。

### 1-3.6. Tg2576 マウスの脳および胸腺における Notch シグナリングに対する GSI の効果

GSI による認知機能障害の機序を考察するため、まずは Notch シグナリング阻害が関与する可能性を検討した。4 カ月齢の Tg2576 マウスを用い、Notch 標的遺伝子である Hes1 および Hey1 の mRNA 発現量を、海馬および Notch 関連副作用の標的臓器である胸腺について検討した。その結果、LY450139 の 30 mg/kg 単回投与により、胸腺における Hes1 および Hey1 の mRNA 発現量は有意に低下したが、海馬においては何ら変動は見られなかった。また BMS-708163 の 30 mg/kg では、胸腺、海馬ともに mRNA 発現量の変動は見られない、すなわち Notch 阻害作用は認められなかった。(Fig. 10)

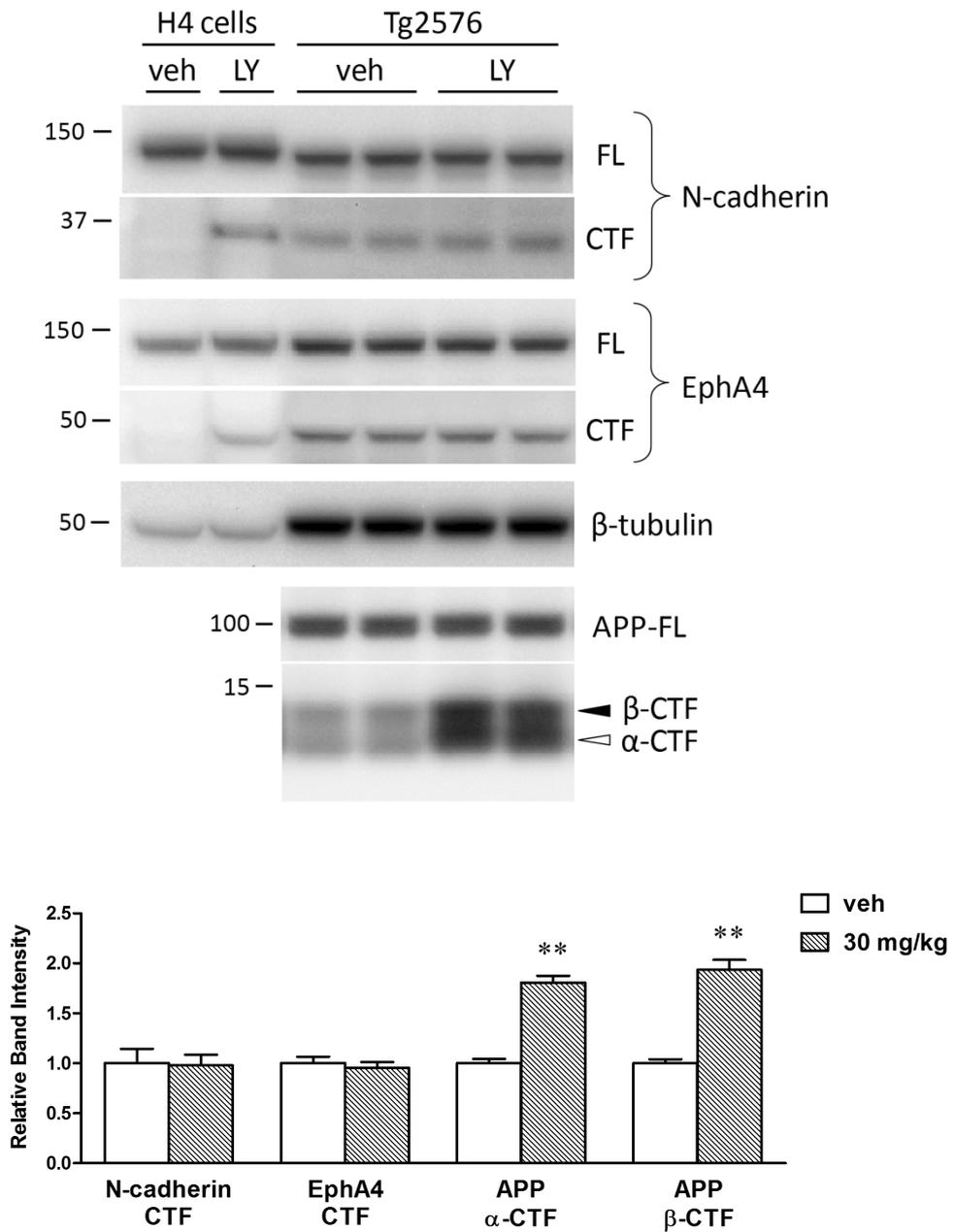


**Fig. 10** Tg2576 マウスの脳および胸腺における Notch シグナリングに対する GSI の効果

各薬剤 (30 mg/kg) を経口投与 3 時間後に海馬および胸腺を摘出し、Hes1 および Hey1 の mRNA レベルを定量的 RT-PCR にて測定した。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Student's t 検定 (対溶媒投与群)。平均 ± 標準誤差 (n=6-7)。

### 1-3.7. Tg2576 マウスの脳における他の $\gamma$ -セクレターゼ基質切断に対する GSI の効果

次に、APP や Notch 以外の  $\gamma$ -セクレターゼ基質のプロセッシング阻害が関与する可能性を検討した。N-cadherin および EphA4 はシナプス機能との関連が示唆されている基質であり、sheddase により細胞外ドメインが切り出された後の C 末側フラグメント (CTF) を  $\gamma$ -セクレターゼが切断する。この CTF のプロセッシングが LY450139 投与で阻害されるかどうかを、1-3.4 項で採取した海馬 (5.5 カ月齢 Tg2576 マウスの投与 8 日目) を用いてウェスタンブロットにより評価した。陽性対照として同時ブロットした APP-H4 細胞ライセートでは、2  $\mu$ M LY450139 処置による N-cadherin-CTF および EphA4-CTF の顕著な上昇が認められ、プロセッシング阻害作用が確認された。しかし海馬では、LY450139 の 30 mg/kg 投与により APP- $\alpha$ -および  $\beta$ -CTF は顕著に上昇したが、N-cadherin-CTF および EphA4-CTF は何ら変動を示さず、プロセッシング阻害は認められなかった。(Fig. 11)

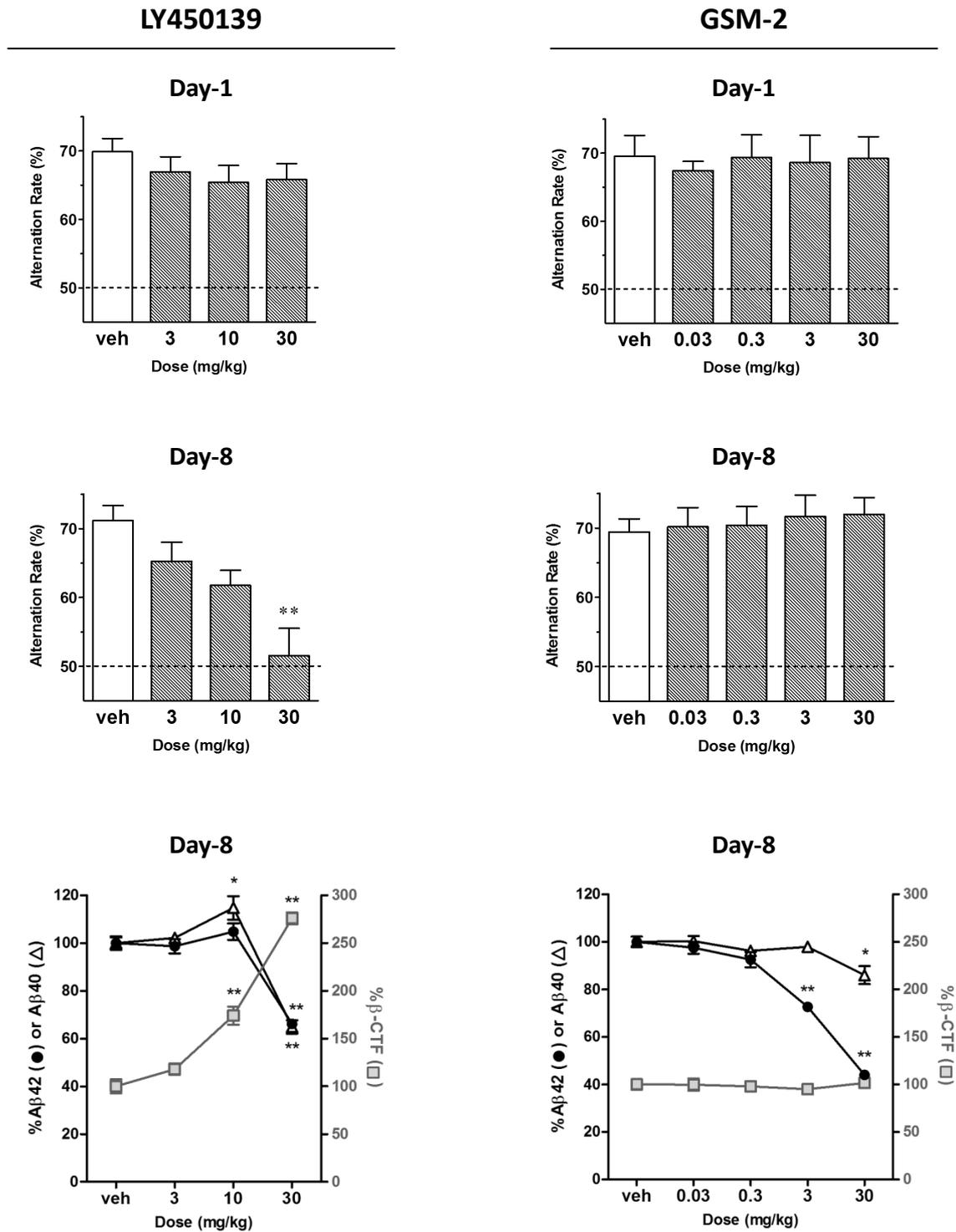


**Fig. 11** Tg2576 マウスの脳における N-cadherin および EphA4 のプロセッシングに対する GSI の効果

LY450139 (30 mg/kg) を 8 日間経口投与後の海馬サンプル (Fig. 8 と同一サンプル) を用いて、ウェスタンブロットにより各種  $\gamma$ -セクレターゼ基質の C 末断片 (CTF) を定量した。陽性対照として、LY450139 (2  $\mu$ M) を処置した APP-H4 細胞サンプル (Fig. 4 と同一サンプル) を同時にプロットした。FL は全長蛋白。\*\* p < 0.01: Student's t 検定 (溶媒投与群)。平均  $\pm$  標準誤差 (n=7-8)。

### 1-3.8. 野生型マウスの正常認知機能に対する GSI、GSM の効果

ここまでの検討は全て Tg2576 マウス、すなわち Swedish 変異型 APP を過剰発現し、 $\beta$ -CTF および  $A\beta$  を過剰産生している条件下での結果であった。これら過剰な APP 関連蛋白が、GSI による認知機能障害の機序に関与している可能性を調べるため、野生型マウスの正常認知機能に対する LY450139 の作用を検討した。その結果、LY450139 は野生型マウスに対して、投与 1 日目の Y-maze 試験では何ら作用を示さなかったが、投与 8 日目では用量依存的かつ有意にその認知機能を障害した。しかし、障害作用の発現には 30 mg/kg を必要とし、Tg2576 マウスの時 (3 mg/kg で障害) と比べ、そのポテンシーは 10 倍弱いものであった。このことは、LY450139 による障害作用の機序に APP 関連蛋白の gain of function が関与する可能性を示唆するものである。8 日目の Y-maze 試験直後の海馬における可溶性  $A\beta_{42}$  および  $A\beta_{40}$  は、LY450139 の 30 mg/kg において 34-35% の有意な低下を示し、 $\beta$ -CTF は用量依存的に最大 2.8 倍の著しい増加を示した。一方、GSM-2 は野生型マウスに対し、海馬の  $A\beta_{42}$  を最大 56% 低下させる用量 (最大 30 mg/kg) において、 $\beta$ -CTF 量は変動させず、認知機能にも影響を与えなかった (Fig. 12)。このことから、障害作用に関与する APP 関連蛋白の候補として  $\beta$ -CTF が考えられた。



**Fig. 12** 野生型マウスの正常認知機能、および脳内 Aβ、β-CTF に対する GSI、GSM の効果

各薬剤を 8 日間経口投与し、1 日目（上段）および 8 日目（中段）の投与 3 時間後に Y-maze 試験を行った。8 日目の Y-maze 試験直後に海馬を摘出し、Aβ、β-CTF を ELISA にて測定した（下段）。

## p<0.01: Student's t 検定。\* p<0.05, \*\* p<0.01: Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。平均±標準誤差 (n=7-8)。

### 1-3.9. Tg2576 マウスおよび野生型マウス脳における $\beta$ -CTF の局在と GSI による蓄積効果

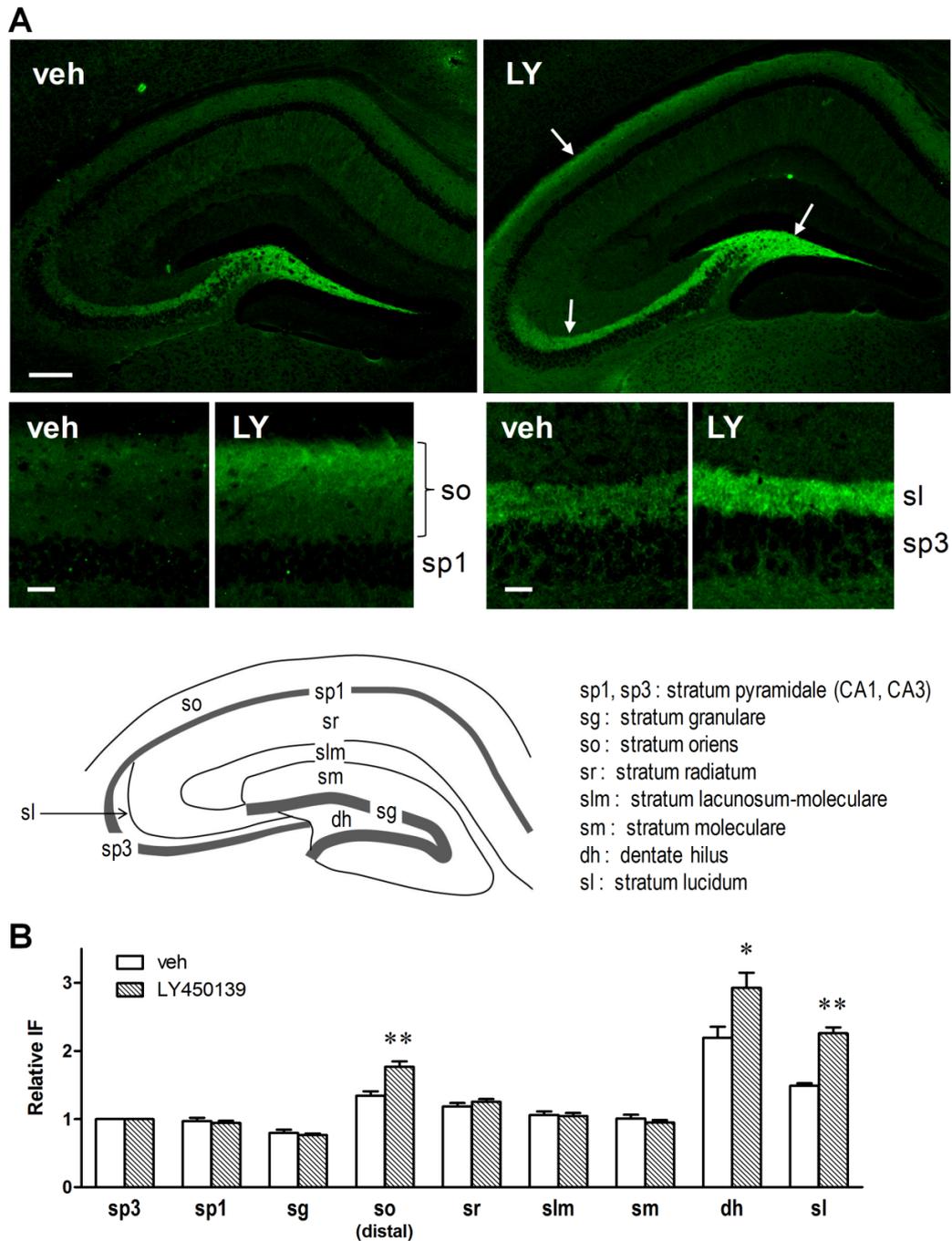
認知機能に対する  $\beta$ -CTF 蓄積の影響を考察する上で、蓄積する部位を調べることは重要である。そこで、 $\beta$ -CTF の N 末端を特異的に認識するモノクローナル抗体 82E1 を用いて、3 カ月齢 Tg2576 マウス脳（投与 8 日目）の蛍光免疫染色を行った。その結果、溶媒投与群において海馬の歯状回門および透明層に特異的な免疫シグナルが認められ、このシグナルは LY450139 投与群（3 mg/kg）で増大した。さらに LY450139 投与群では、CA1c 領域の上昇層（特に遠位）においても免疫シグナルの増大が認められた（Fig. 13A）。 $\beta$ -CTF 蓄積の部位特異性を定量的に評価するため、CA3 錐体細胞層を参照領域として各部位の相対蛍光強度を算出し、部位毎に溶媒投与群と LY450139 投与群との差を解析した結果、前述の 3 部位においてのみ、有意な  $\beta$ -CTF の蓄積変化が認められた（Fig. 13B）。

これら  $\beta$ -CTF の蓄積がシナプス部位で起きているかどうかを調べるため、シナプスマーカータンパクとの免疫二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、透明層および歯状回門において、 $\beta$ -CTF と synatophysin（プレシナプスマーカー）の高度な共染色像が観察された。一方、drebrin A（ポストシナプスマーカー）との共染色性は低かった（Fig. 14）。このことから、LY40139 による  $\beta$ -CTF 蓄積は主に、顆粒細胞神経軸索束（苔状線維）末端の巨大プレシナプス内に生じると考えられた。尚、上昇層ではいずれのマーカーとも明確な共染色像は得られなかった（data not shown）。

ここまで  $\beta$ -CTF の染色に 82E1 抗体を用いてきたが、APP の C 末端領域を認識する抗体を用いても矛盾のない結果が得られるかどうか検討した。本抗体による染色では、全長 APP の発現を反映すると思われる強い免疫シグナルが、錐体細胞層全域に認められた。歯状回門および透明層の免疫シグナルは中程度であったが、このシグナルは LY450139 投与群で有意に増大した。また上昇層（遠位）においても、LY450139 による有意な免疫シグナルの増大が認められた（Fig. 15）。これらの結果は、82E1 抗体における結果と一致するものであった。

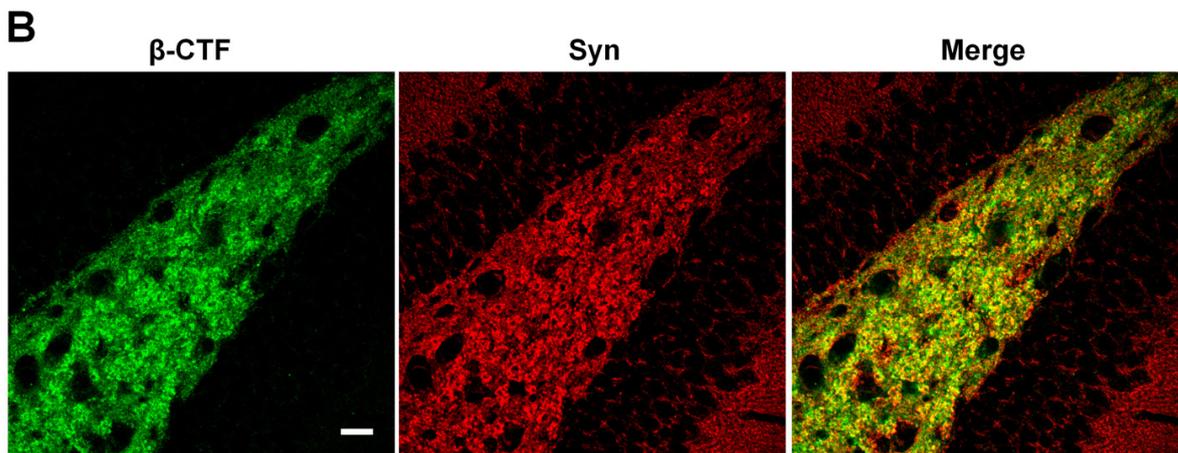
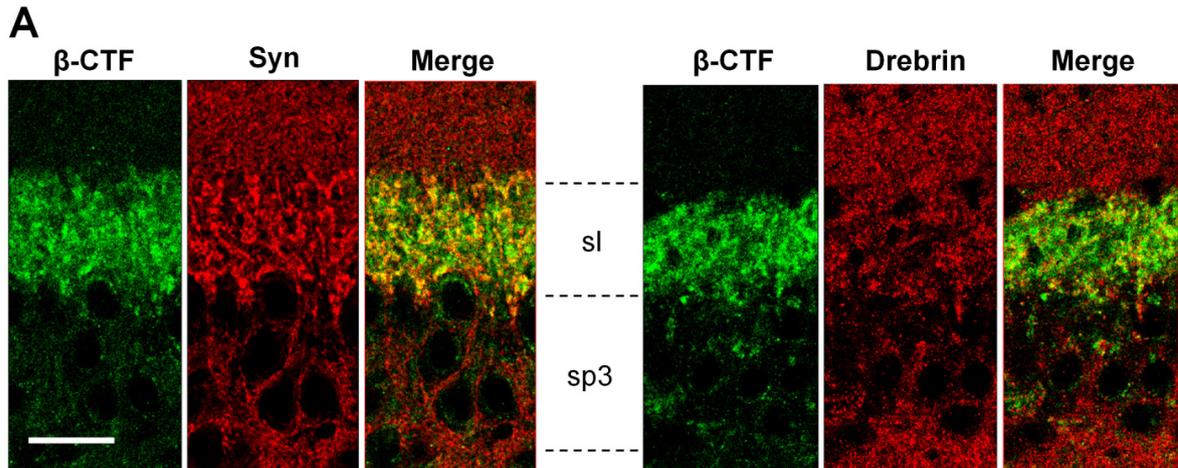
ここまで Tg2576 マウスの脳について検討してきたが、野生型マウスの脳についても

同様の結果が得られるかどうか検討した。APP-C 末抗体によって得られる免疫染色パターンは、Tg2576 マウスの場合とほぼ同じであった。LY450139 投与群 (30 mg/kg) では溶媒投与群と比べ、歯状回門、透明層、および上昇層 (遠位) において有意な免疫シグナルの増大が認められたが、GSM-2 投与群 (30 mg/kg) では全く変化は認められなかった。(Fig. 16)



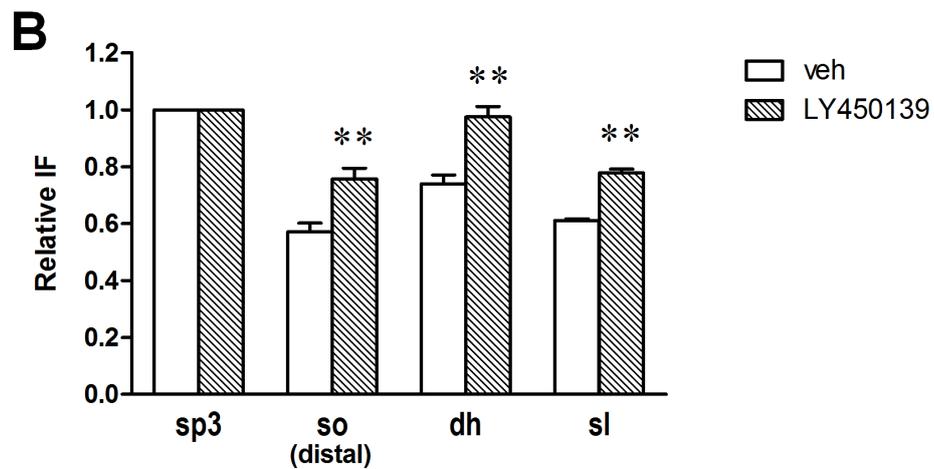
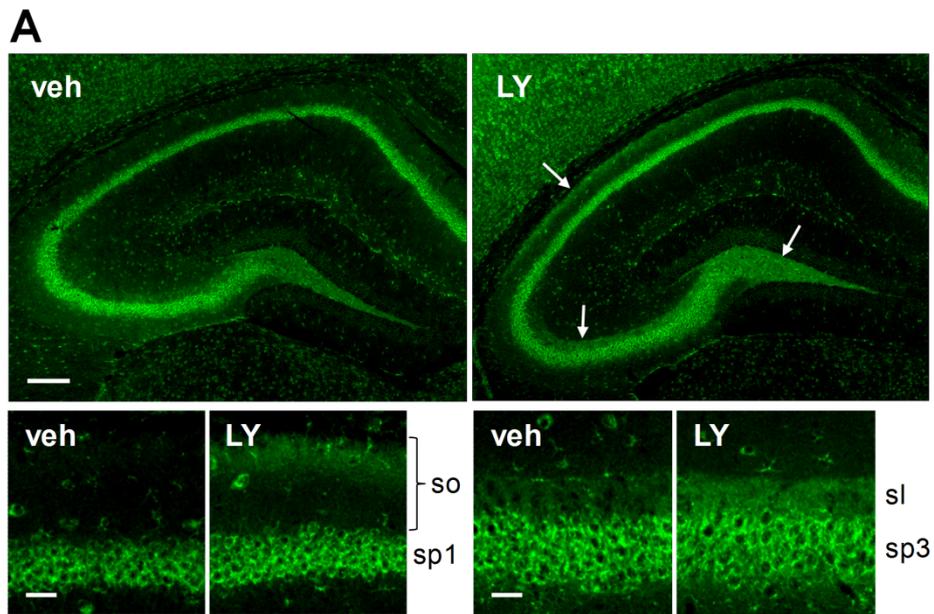
**Fig. 13** Tg2576 マウス脳におけるヒト  $\beta$ -CTF の局在と GSI 投与による蓄積効果

LY450139 (3 mg/kg) または溶媒を 3 カ月齢 Tg2576 マウスに 8 日間経口投与後、脳切片を作成し、82E1 抗体を用いて免疫染色を行った。(A) LY 投与マウスで上昇層 (so) 遠位部、透明層 (sl)、および歯状回門 (dh) の染色強度の増大が認められた (矢印)。Scale bars: 200  $\mu$ m (上段)、30  $\mu$ m (下段)。(B) 各層の相対染色強度を CA3 錐体細胞層 (sp3) を基準に算出した。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Student's *t* 検定 (対溶媒投与群)。平均  $\pm$  標準誤差 (n=7-8)。



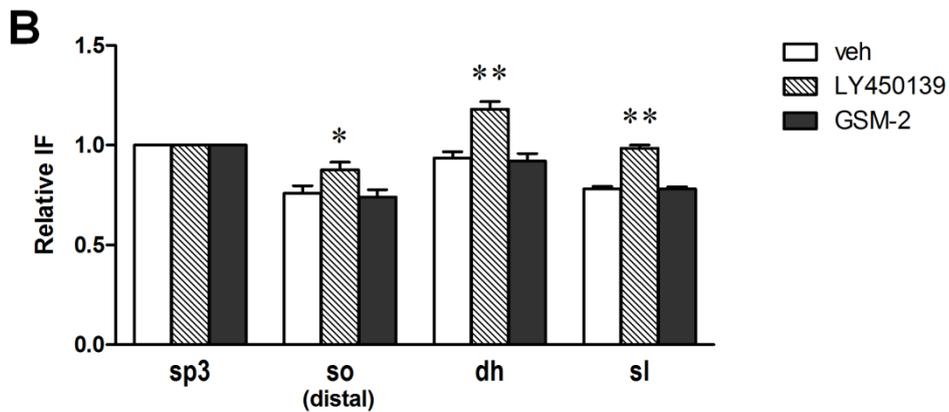
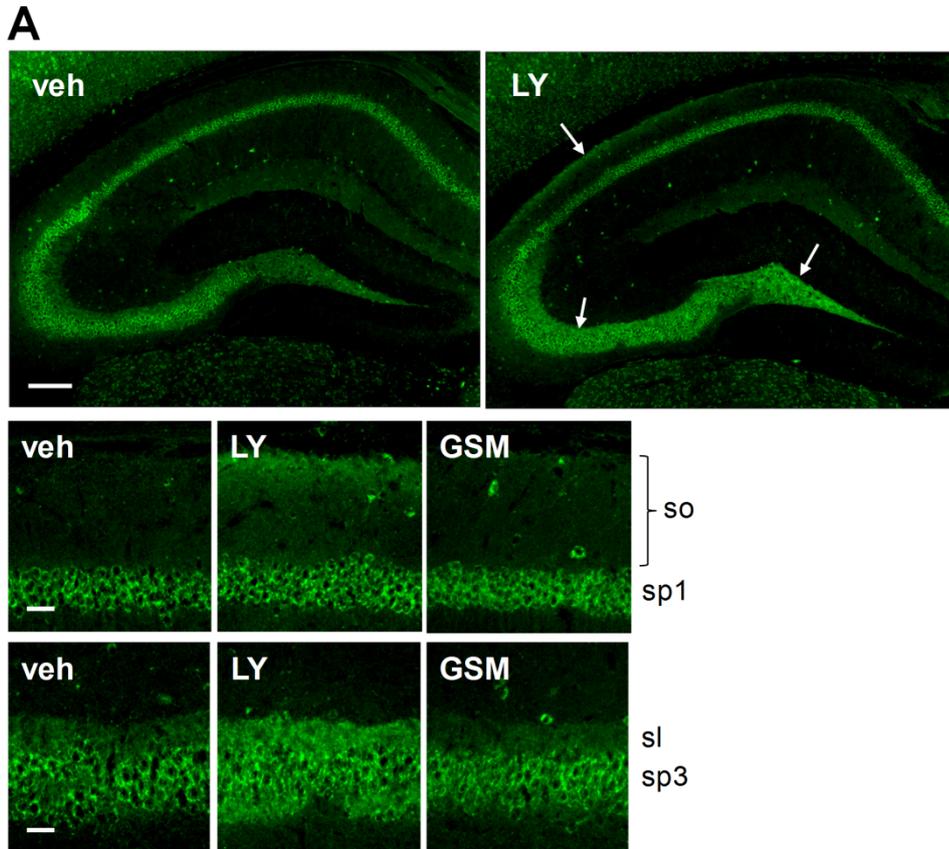
**Fig. 14 GSI 投与による海馬苔状線維神経終末への  $\beta$ -CTF 蓄積**

LY450139 投与マウスの脳切片 (Fig. 13 と同一群) を 82E1 抗体、および抗 synaptophysin 抗体 (Syn, プレシナプスマーカー)、または抗 drebrin A 抗体 (ポストシナプスマーカー) を用いて免疫二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した。 $\beta$ -CTF は透明層 (A) および歯状回門 (B) において synaptophysin と共局在した。Scale bars: A、B とも 30  $\mu$ m



**Fig. 15** Tg2576 マウス脳における APP-CTF の局在と GSI 投与による蓄積効果

LY450139 または溶媒投与マウスの脳切片 (Fig. 13 と同一群) を、APP の C 末領域認識抗体を用いて免疫染色した。(A) LY 投与マウスで上昇層 (so) 遠位部、透明層 (sl)、および歯状回門 (dh) の染色強度の増大が認められた (矢印)。Scale bars: 200  $\mu$ m (上段)、30  $\mu$ m (下段)。(B) 各層の相対染色強度を CA3 錐体細胞層 (sp3) を基準に算出した。\*\*  $p < 0.01$ : Student's t 検定 (対溶媒投与群)。平均  $\pm$  標準誤差 (n=7-8)。



**Fig. 16** 野生型マウス脳における APP-CTF の局在と GSI 投与による蓄積効果

LY450139、GSM-2（ともに 30 mg/kg）、または溶媒を 8 日間経口投与後、脳切片を作成し、APP の C 末領域認識抗体を用いて免疫染色した。（A）LY 投与マウスで上昇層（so）遠位部、透明層（sl）、および歯状回門（dh）の染色強度の増大が認められた（矢印）。Scale bars: 200  $\mu$ m（上段）、30  $\mu$ m（下段）。（B）各層の相対染色強度を CA3 錐体細胞層（sp3）を基準に算出した。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Student's *t* 検定（対溶媒投与群）。平均  $\pm$  標準誤差（ $n = 7-8$ ）。

#### 1-4. 考察

本検討では、GSIおよびGSMの認知機能に対する作用をY-maze試験を用いて評価し、Tg2576マウスへの8日間反復投与において、GSMはその認知機能障害を改善するが、GSIは改善しないことを明らかにした。またその原因として、GSIはマウスの正常認知機能を障害する作用を有することを明らかにした。

検討に用いた化合物の薬理学的特徴については、はじめに培養細胞を用いた実験により確認した。LY450139およびBMS-708163については、A $\beta$ 産生阻害および $\beta$ -CTF上昇というGSIを特徴づける作用が確認された一方、高濃度域で $\beta$ -CTF上昇作用が減弱するというこれまでに報告のない現象が観察された (Fig. 3, 4)。原因は明らかでないが、高濃度域では $\beta$ -CTFの反対側であるN末側APPフラグメント (sAPP  $\beta$ ) の減少と、 $\alpha$ -セクレターゼ切断によるN末側APPフラグメント (sAPP  $\alpha$ ) の上昇も観察された (data not shown) ことから、 $\beta$ 切断から $\alpha$ 切断へのシフトが生じた可能性が考えられる。一方、GSM-2は $\beta$ -CTFを上昇させることなくA $\beta$ 42産生を阻害するというGSMに特徴的な作用を示した。また、A $\beta$ 40産生に対する阻害作用は極めて弱く、A $\beta$ 38産生に対しては逆に促進した (Fig. 3)。GSM-2の分子メカニズムについては未検討であるが、類似構造のGSM-1を用いた検討結果がOhkiらによって報告されている (Ohki et al., 2011)。それによると、GSM-1はPS1の第1膜貫通領域に結合することで、catalytic poreの立体構造をopen-formに変化させた。これは、PS1のFAD変異 (A $\beta$ 42/40比を上昇させる) による変化 (closed form) と逆である。また、A $\beta$ 38はA $\beta$ 42がさらなる切断を受けて生成する (Takami et al., 2009) ことから、open-form変化によってA $\beta$ 42がcatalytic poreから遊離しづらくなり、さらなる切断を受けやすくなる結果、A $\beta$ 38の生成が促進されるというモデルが考えられる。

GSIの脳内A $\beta$ 低下作用を検討した報告は数多くあるが、結果として期待されるべき認知機能改善作用まで検討した報告は極めて少ない。Comeryらは、5カ月齢のTg2576マウスの認知機能障害がGSIであるDAPTの単回投与により改善されることを、恐怖条件づ

け文脈テストを用いて示した (Comery et al., 2005)。Martone からも同じ手法を用いて、GSI-953 の単回投与による認知機能改善作用を報告している (Martone et al., 2009)。本検討においても、LY450139、BMS-708163 とともに単回投与では、Y-maze 試験において認知機能改善作用を示した (Fig. 6)。ただし、この作用を示す用量において海馬の TBS 可溶性 A $\beta$  は減少しておらず、その因果関係は明確でない (Fig. 7)。しかし、 $\beta$ -CTF の上昇は検出できていることから、シナプス間隙 (Cirrito et al., 2005, Wei et al., 2010) や脂質ラフト (Kawarabayashi et al., 2004, Rushworth and Hooper, 2010) など、シナプス機能への影響が大きい局所では A $\beta$  低下が起きている可能性は否定できない。

本検討においてより重要な発見は、この認知機能改善作用が 8 日間反復投与により消失したこと (Fig. 6, 8)、さらにはその原因追究として行った 3 カ月齢 Tg2576 マウスの Y-maze 試験において、正常な認知機能が GSI 投与によりむしろ悪化したこと (Fig. 9) である。Dewachter からも、PS1 の conditional KO による  $\gamma$ -セクレターゼ機能抑制は、V717I 変異型 APP トランスジェニックマウスの脳内 A $\beta$  を低下させたが、学習障害は改善しなかったと報告しており (Dewachter et al., 2002)、本検討結果と矛盾しない。GSI の反復投与や PS1 発現抑制による持続的な  $\gamma$ -セクレターゼ機能抑制は、何らかの機序により認知機能障害を引き起こし、結果として本来 A $\beta$  低下によって得られるはずの機能面での benefit が消失したという可能性が考えられる。GSI による認知機能障害の機序を考察するため、本検討では、Notch シグナリング阻害、その他の基質プロセッシング阻害、および  $\beta$ -CTF 蓄積の 3 つの作用に着目し、実験を行った。

Notch シグナリングは発生期の神経形成に必須であることが知られているが、成熟後は神経可塑性や記憶形成に関与すると報告されている (Costa et al., 2003, Wang et al., 2004, Alberi et al., 2011)。しかし本検討では、Tg2576 マウスの海馬において LY450139 や BMS-708163 投与による Notch 標的遺伝子の発現阻害は認められなかった (Fig. 10)。よって、GSI による認知機能障害の機序に Notch が関与する可能性は低いと考えられた。Notch 関連副作用の標的臓器である胸腺では、LY450139 による有意な阻害が認められたことは、

本実験系の妥当性を示すものといえる。臓器による反応性の違いについては、LY450139 は脳内移行性が低いため（脳／血漿比で 7%）、曝露量の違いに起因する可能性が考えられる。

$\gamma$ -セクレターゼは APP や Notch 以外にも、数多くのタイプ I 膜貫通タンパクを基質とすることが知られており (Kopan and Ilagan, 2004, McCarthy et al., 2009)、中には N-cadherin や EphA4 など、そのプロセッシング阻害が記憶機能に影響する可能性が予想されているものもある (Marambaud et al., 2003, Inoue et al., 2009, Allison et al., 2011, Bot et al., 2011)。しかし本検討では、Tg2576 マウスの海馬において LY450139 投与による N-cadherin および EphA4 のプロセッシング阻害は認められなかった (Fig. 11)。よって、GSI による認知機能障害の機序にこれら基質が関与する可能性は低いと考えられた。

$\gamma$ -セクレターゼ機能低下に伴う  $\beta$ -CTF 蓄積は、シナプス機能や記憶機能に障害を与える可能性が予想されてきた (Dewachter et al., 2002, Saura et al., 2005, Bittner et al., 2009)。Saura らの報告によると、Swedish/V717F 変異型 APP トランスジェニックマウス (J20) の学習障害は、PS1 の conditional KO によって一過性には改善するが、その後 APP-CTF の蓄積とともに再燃した。また Bittner らは、APP 欠損および非欠損マウスを用いた検討により、DAPT および LY450139 の反復投与が APP 発現依存的に神経スパインを減少させることを報告し、APP-CTF 蓄積の関与を示唆した。本検討において、3 カ月齢 Tg2576 マウスで見られた LY450139 の学習障害作用が野生型マウスで大きく減弱した (Fig. 12) ことは、その作用が APP 発現量、あるいは APP の Swedish 変異 ( $\beta$  切断されやすい) に依存した APP プロセッシングパスウェイ上の gain of function であることを示唆する。さらに、GSM-2 には障害作用がなかったことから、GSI にあって GSM にはない APP プロセッシングパスウェイ上の gain of function として、 $\beta$ -CTF の蓄積が関与する可能性が示唆された。尚、Tg2576 マウスには、 $\gamma$  セクレターゼ活性や GSI の作用に影響するような APP 変異 (V717F/I など) や PS1 変異がないことも、上述の考察に至る上で重要である。ただし、学習障害作用と  $\beta$ -CTF 蓄積の因果関係を証明するには、APP 欠損マウスに対する作用実験や、 $\beta$ -セクレターゼ阻

害薬 ( $\beta$ -CTF を低下させる) によるレスキュー実験など、さらなる検討が必要である。また、 $\alpha$ -CTF の関与も否定はできないが、 $\beta$ -セクレターゼ阻害薬 ( $\beta$ -CTF を減らして  $\alpha$ -CTF を増やす) に障害作用がなかったことから、その関与は小さいと考えられる (data not shown)。

マウス脳の免疫染色試験の結果、 $\beta$ -CTF は海馬の透明層および歯状回門に局在した (Fig. 13)。これらの部位は、 $\beta$ -CTF の生成酵素である  $\beta$ -セクレターゼの発現分布と一致している (Laird et al., 2005)。また、PS1 発現および GSI 結合が高いことも報告されており (Lee et al., 1996, Yan et al., 2004)、これら部位で特異的に LY450139 による  $\beta$ -CTF 蓄積が認められたことと矛盾しない。さらにこの  $\beta$ -CTF 蓄積は苔状線維終末の巨大プレシナプスに局在した (Fig. 14) ことから、シナプス機能への影響が予想される。また Tg2576 マウスと野生型マウスで、 $\beta$ -CTF は全く同じ発現局在を示した (Fig. 15, 16) ことから、GSI による学習障害の感受性の違いは、外来 APP の非生理的発現局在によるアーチファクトではない。例えば J20 マウスでは、PS1 の conditional KO による APP-CTF 蓄積が海馬の放射状層で認められており (Saura et al., 2005)、その行動異常に外来 APP の非生理的発現局在が影響している可能性を否定できない。

$\beta$ -CTF 蓄積による神経機能障害の機序については、今後の検討課題である。Kim らは、人工合成した  $\beta$ -CTF が脂質二重膜上で非選択的陽イオンチャネルを形成することを示し、神経細胞毒性の原因と考えた (Kim et al., 1999)。また、Jiang らはヒト線維芽細胞を用いて、 $\beta$ -CTF 上昇がエンドソーム機能異常を引き起こすことを証明し、ダウン症患者の線維芽細胞で見られるエンドソーム機能異常の原因とした (Jiang et al., 2010)。これらの知見は、 $\beta$ -CTF 蓄積による神経機能障害の機序を考察する上でヒントになると考えられる。

GSI 投与による認知機能低下は臨床でも報告されている。本研究を開始した時、LY450139 はフェーズ III 試験を実施中であったが、その後発表された中間解析では、AD 患者の認知スコアは改善されず、むしろ用量依存的に有意に悪化した (Siemers et al., 2011, Doody et al., 2013)。さらに副作用として、Notch シグナリング阻害に基づくと思われる皮

膚癌発生率の有意な上昇が認められ、試験は中止された。臨床での LY450139 の血漿中濃度は 1,000 ng/ml に達しており (Fleisher et al., 2008)、本検討で野生型マウスに 30 mg/kg 投与した際の血漿中濃度、336 ng/ml を上回っていた。よって、マウスで認められた認知機能障害作用がヒトでも再現されたという可能性は十分考えられる。さらにその後、BMS-708163 についても、フェーズ II 試験でやはり用量依存的かつ有意な認知スコアの悪化が認められ、開発中止が発表された (Coric et al., 2012)。

GSI とは対照的に、GSM-2 は Tg2576 マウスの海馬において、A $\beta$ 40 や  $\beta$ -CTF を変動させることなく、A $\beta$ 42 のみを低下させた (Fig. 7, 8)。さらに、投与 1 日目で認められた学習障害改善作用は、8 日目でも消失することはなかった (Fig. 6, 8)。GSM についても認知機能に対する作用を検討した報告は少ない。報告によると、第一世代の NSAIDs 型 GSM である R-flurbiprofen は、Tg2576 マウスへの 4 ヶ月間の予防投与でモリス水迷路試験における学習障害を改善し (Kukar et al., 2007)、またその誘導体である CHF-5074 も、9 ヶ月間の予防投与で恐怖条件づけ文脈テストにおける学習障害を改善した (Imbimbo et al., 2010)。しかしこれら化合物は *in vitro* 薬理活性が  $10^{-5} \sim 10^{-4}$  オーダーと弱く、*in vivo* での A $\beta$ 42 低下作用については一貫したデータが得られていない (Lanz et al., 2005, Imbimbo et al., 2007)。本検討では、*in vitro* 活性が  $10^{-8}$  オーダーと強く、かつ A $\beta$ 42 選択性が極めて高い第二世代 GSM を用いることで、A $\beta$ 40 を低下させることなく、その 10 分の 1 量しかない A $\beta$ 42 を低下させるだけで、Tg2576 マウスの認知機能障害を改善できることを初めて明確にした。A $\beta$  は神経活動依存的にプレシナプスから放出され、抑制性に働くことで活動のバランスをとっていると考えられているが (Kamenetz et al., 2003, Cirrito et al., 2005, Wei et al., 2010)、Tg2576 マウスではその放出量が過剰になっている。GSM-2 はこのシナプス間隙に放出される A $\beta$ 42 を低下させることで、神経活動のバランスを回復させると考えられる。GSM-2 の作用としてはもう一つ、A $\beta$ 38 上昇作用があるが、これが認知機能に与える影響は不明である。ただし、A $\beta$ 42 と同時に A $\beta$ 38 も低下させる  $\beta$ -セクレターゼ阻害薬も、Tg2576 マウスの学習障害を改善できることから (unpublished data)、A $\beta$ 38 上昇が GSM-2 の認知機能

改善作用に関与する可能性は低いと考えられる。さらに GSM-2 は、計 57 種類の受容体、イオンチャネル、および酵素（いずれも中枢関連）に対する結合阻害試験において何ら強い作用を示さなかったことから（data not shown）、オフターゲット効果が関与する可能性も低いと考えられる。

今回評価した 3 化合物はいずれも、投与 1 日目の学習改善作用はベルシェイプを示した。行動薬理試験において、中枢症状改善薬の急性効果がベルシェイプを示すことは一般的で、過度な作用は神経活動のバランスを崩し、目的の薬効を得られないことがある (Tokita et al., 2005, Rutten et al., 2006, Mihara et al., 2007, Castro et al., 2008, Boccia et al., 2011)。興味深いことに、GSM-2 の投与 8 日目ではベルシェイプを示さず、高用量においても有意な改善作用を認めた。詳細は不明であるが、 $A\beta_{42}$  低下が継続することでシナプスが再構築され、新たな神経活動バランスを獲得した可能性が考えられる。

本検討により、GSI と GSM が認知機能に対して全く異なる作用を示すことが初めて明らかとなった。GSI はマウスの認知機能を障害することが判明し、臨床で認知スコアを悪化させたこととの関連性が示唆された。一方、GSM に障害作用はなく、むしろ Tg2576 マウスの認知機能障害を改善したことから、その臨床効果も GSI とは異なってくるのが期待される。

## 1-5. 小括

- ① GSI の LY450139 および BMS-708163 は、Tg2576 マウスへの 8 日間反復投与において脳内 A $\beta$  を顕著に低下させたにも関わらず、その認知機能障害を改善できず、むしろ若齢 Tg2576 マウスの正常認知機能を障害した
- ② GSI は Tg2576 マウス脳内において、APP プロセッシング阻害に基づく  $\beta$ -CTF 上昇を引き起こしたが、Notch や N-cadherin、EphA4 といった他の基質プロセッシングには影響しなかったことから、GSI の認知機能障害作用に APP 以外の基質プロセッシング阻害が関与する可能性は低いと考えられた
- ③ LY450139 は野生型マウスに対しても認知機能障害を引き起こしたが、そのポテンシーは Tg2576 マウスに対する作用より 10 倍弱かったことから、機序として  $\beta$ -CTF 蓄積など、APP プロセッシングパスウェイ上の gain of function が関与する可能性が示唆された
- ④ LY450139 による  $\beta$ -CTF 蓄積は、海馬の歯状回門、透明層、および上昇層遠位部に見られ、特に苔状線維プレシナプスへの局在が認められたことから、シナプス機能への影響が推察される
- ⑤ 脳内の A $\beta$ 42 を低下させ、A $\beta$ 40 および  $\beta$ -CTF 量は変化させない GSM-2 は、野生型マウスの認知機能を障害せず、Tg2576 マウスの認知機能障害を改善した。GSI と異なり AD 治療薬としての可能性が期待される

## 第二章 脳内アミロイド斑沈着後のADモデルマウスに対するGSMの薬理効果に関する検討

### 2-1. 緒言

第一章では、GSM-2 投与により Tg2576 マウスの脳内可溶性 A $\beta$ 42 が低下し、認知機能障害が改善することを示したが、これは脳内アミロイド斑が形成される前の 5.5 カ月齢のマウスを用いた結果であった。同様に、これまで多くの GSI、GSM、および  $\beta$ -セクレターゼ阻害薬が創出され、その脳内 A $\beta$  低下作用が検討されてきたが、そのほとんどはアミロイド斑を形成しない正常動物、もしくは形成前の若齢 APP トランスジェニックマウスを用いた報告であった。この中には、アミロイド斑が現れる月齢まで長期間投与することで、アミロイド斑形成に対する予防効果を検討したものもあるが、AD 患者の脳内ではすでにアミロイド斑が沈着、拡大した状態であることから、臨床適用を想定した検討とは言いがたい。唯一、Abramowski らは、すでにアミロイド斑が沈着している月齢のマウスに GSI (LY-411575) を 2 カ月間投与し、その間にアミロイド斑が急増していくスピードを有意に抑制したと報告したが、AD 発症後の患者脳内ではそのようなアミロイド斑の急増は見られない。またこの時、可溶性 A $\beta$  量や認知機能に対する作用は検討していない (Abramowski et al., 2008)。

初期の AD 患者における認知機能低下は、可溶性 A $\beta$  によるシナプス機能障害の寄与が大きいと考えられるが、可溶性 A $\beta$  の脳内動態は、アミロイド斑の有無に影響されることが報告されている。Cirrito らは A $\beta$  マイクロダイアリシス法を用いて、アミロイド斑沈着後のマウス脳内で細胞間隙中 A $\beta$  のクリアランス速度が低下していることを示し、可溶性 A $\beta$  と不溶性 A $\beta$  プールとの間に新たな平衡関係が生じていると考察した (Cirrito et al., 2003)。また Hong らは、GSI (Compound E) による細胞間隙中 A $\beta$ 42 の低下作用が、アミロイド斑沈着後のマウスで大幅に減弱することを示し、アミロイド斑が可溶性 A $\beta$ 42 の新

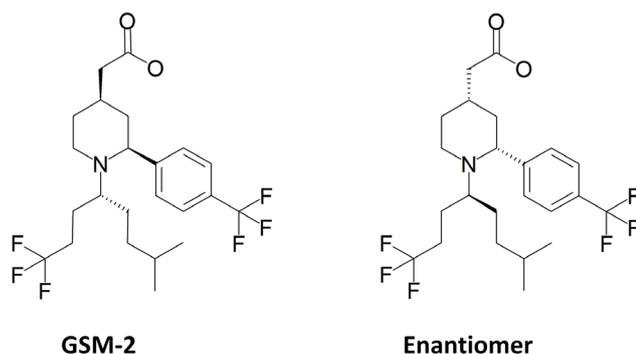
たな供給源になっていると考察した (Hong et al., 2011)。もし、このようなアミロイド斑由来の可溶性 A $\beta$ 42 が認知機能障害に寄与しているとする、GSM のような A $\beta$ 42 産生抑制という機序ではこれを減少できないため、認知機能も改善できない、ということが懸念される。

本検討ではこれらの課題を明らかにするため、アミロイド斑沈着後の Tg2576 マウスを用いて、脳内可溶性 A $\beta$ 42 量および認知機能障害に対する GSM-2 の作用を検討した。Kawarabayashi らの解析によると、Tg2576 マウスの脳内で最初にアミロイド斑が確認されるのは 8 カ月齢で、その数および大きさは 12 カ月齢を過ぎてから急速に増大し、15~23 カ月齢の間に AD 患者脳内で見られる病理像と同程度の量になるという (Kawarabayashi et al., 2001)。そこで本検討では、10、14、および 18 カ月齢のマウスを用いて、アミロイド斑沈着の程度が GSM-2 の認知機能改善効果に与える影響を、Y-maze 試験により評価した。さらに、安定同位体標識法 (Bateman et al., 2006, Castellano et al., 2011) を用いることで、アミロイド斑由来を含む既存の可溶性 A $\beta$ 42 と、新規合成された A $\beta$ 42 を区別して測定し、それらの認知機能障害に対する寄与について考察した。

## 2-2. 方法

### 2-2.1. 化合物

GSM-2 およびそのエナンチオマーは公開特許 (Garcia et al., 2007) の方法に従い合成した。化合物は、細胞実験においてはジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、培地で希釈して使用した (最終 DMSO 濃度 0.5%)。動物実験においては 0.5%メチルセルロース溶液に懸濁し、10 mL/kg の量で 8 日間反復 (1 日 1 回) 経口投与した。各化合物の化学構造式を以下に示す。



### 2-2.2. 動物

ヒト APP695 の Swedish 変異体 (K670N/M671L) 遺伝子が導入された Tg2576 マウス (Hsiao et al., 1996) を繁殖し、同腹の野生型マウスとともに、6、10、14、または 18 カ月齢で実験に使用した。繁殖は、Mayo Foundation for Medical Education and Research (Rochester, MN, USA) より雄の Tg2576 マウスを入手し、B6SJLF1/J マウス (日本チャールスリバー) の雌と交配させることで行った。本系統の雄は攻撃性が高く、群飼育で傷害を与えるため、行動試験には不適と考え、本試験では雌のみを使用した。動物は、固形飼料および水を自由摂取させ、室温 23±3°C および湿度 55±15%、12:12 時間の明暗サイクル (明期: 7:30-19:30) の条件で飼育した。全ての動物実験は、アステラス製薬株式会社動物実験委員会の承

認を得て、American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) 認定施設にて実施した。

### 2-2.3. 細胞系内因性 A $\beta$ 産生実験

ヒト神経芽細胞株の SK-N-BE(2)を、10%非働化済ウシ胎児血清、100 units/mL ペニシリン、および 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む RPMI1640 を用いて 10 cm 培養シャーレ中で維持培養し (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)、実験前日に poly-D-lysine でコーティングされた 96-well プレートに約  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種した。翌日、種々の濃度の化合物を含む培地に交換し、その 6 時間後に培地を回収した。回収した培地中の A $\beta$ 1-40 濃度を市販の ELISA キット (免疫生物研究所) で、A $\beta$ 1-42 濃度を後述する ELISA 系を用いて測定した。培地回収後の細胞から、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega) を用いて細胞生存率を測定した。IC<sub>50</sub> 値は Prism 5 software (GraphPad) を用いて非線形回帰分析により算出し、3 回の実験の平均±標準誤差で表した。

A $\beta$ 1-42 の ELISA 系は、A $\beta$ 42 の C 末端特異的マウスモノクローナル抗体 (clone 44A3, 免疫生物研究所) をキャプチャー抗体、N 末端特異的マウスモノクローナルービオチン結合抗体 (clone 82E1, 免疫生物研究所) を検出抗体として、384-well プレート (#781061, greiner) 上に構築した。検出は HRP 結合ストレプトアビジン (Invitrogen) および TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) を用いた発色により行った。

### 2-2.4. アミロイド斑の免疫組織化学

Tg2576 マウスを断頭し、脳を摘出した。大脳半球を 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液に浸し、4°C で 2 日間、浸漬固定した後、16%スクロース/リン酸緩衝液に交換し、4°C で 2 日間以上かけて置換した (途中 2 回溶液交換)。CO<sub>2</sub> ガスを用いて脳を急速冷凍し

た後、クリオスタットを用いて 20  $\mu\text{m}$  厚の冠状切片を作製した。切片を 10% ヤギ血清 (Vector Laboratories) でブロッキング処理 (室温 2 時間) した後、抗 A $\beta$ 42 ウサギポリクローナル抗体と抗 A $\beta$ 40 ウサギポリクローナル抗体 (ともに免疫生物研究所; 1000 倍希釈) の 1:1 混合液で 16 時間、続いてビオチン結合抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) で 2 時間、室温で浮遊反応させた。染色は Vector Elite horseradish-peroxidase ABC kit (Vector Laboratories) および DAB (3,3'-diaminobenzidine) を用いて行った。

### 2-2.5. 学習行動実験

一群 6-7 例のマウスを用いて、その空間作業記憶能力を Y-maze 試験により評価した。3 本のアームを等角度で接続したポリ塩化ビニル製 (灰色) の Y 字型迷路を作製し (アームの長さ 40 cm, 高さ 13 cm, 底幅 3 cm, 口幅 10 cm)、実験に使用した。8 日目の化合物投与 3 時間後にマウスをアームの先端に入れて、8 分間自由に探索させ、進入したアームの順番および回数を記録した。全てのアームに連続して進入することを自発交替行動と呼び、その総進入回数 (10 回未満の場合は除外) に対する割合 (以下の計算式) をもって空間作業記憶能力の指標とした。

$$\text{自発交替行動の割合 (\%)} = \text{自発交替行動回数} \div (\text{総進入回数} - 2) \times 100$$

### 2-2.6. 脳内可溶性画分 A $\beta$ 量および総 A $\beta$ 量の測定

Y-maze 試験終了直後にマウスを断頭し、氷上で海馬を摘出した。摘出後、速やかに液体窒素中で急速冷凍させ、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。冷凍サンプルを秤量し、Complete Inhibitor Cocktail (Roche Diagnosis) を溶解させた 10 倍量の TBS 緩衝液 (25 mM Tris, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl; pH 7.4) と超音波ホモジナイザーを用いて、氷上でホモジナイズした。ホモ

ジネートの一部を分取し、塩酸グアニジンを終濃度 5 M になるよう添加後、室温で 1 時間置くことにより可溶化させた。残りのホモジネートを 100,000 g、4°C で 1 時間超遠心し、得られた上清中（可溶性画分）、およびグアニジン可溶化液中（総画分）の A $\beta$  x-42 および A $\beta$  x-40 濃度を ELISA キット（和光純薬）を用いて測定した。

### 2-2.7. 安定同位体標識実験

Tg2576 マウス脳内の新規合成 A $\beta$  量測定は、Bateman らの方法 (Bateman et al., 2006, Castellano et al., 2011) を一部改変して行った。一群 5-6 例のマウスに、20 mg/mL の濃度で生理食塩水に溶解した <sup>13</sup>C<sub>6</sub> 標識ロイシン (Cambridge Isotope Laboratories) を 300 mg/15 mL/kg の用量で腹腔内投与し、直後に GSM-2 を 10 mg/kg で経口投与した。投与 2 時間後にマウスを断頭し、脳を摘出後、嗅球および小脳を取り除いた大脳半球を速やかに液体窒素中で急速冷凍させ、-80°C で保管した。冷凍サンプルを秤量し、Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific) および Triton X-100 (1%) を含む TBS 緩衝液 1 mL とテフロンホモジナイザーを用いて、氷上でホモジナイズした。ホモジネートを 100,000 g、4°C で 1 時間超遠心し、得られた上清から 2  $\mu$ L 分取し、A $\beta$  x-42 濃度を ELISA キット（和光純薬）を用いて測定した。残りの上清に抗 A $\beta$ 42 抗体 (44A3) 5  $\mu$ g と Protein G-Sepharose 4 fast flow beads (GE Healthcare) 100  $\mu$ g を加え、4°C で 16 時間反応させた後、スピнкаラムを用いてビーズを回収した。回収後の反応液から 2  $\mu$ L 分取し、A $\beta$  x-40 濃度を ELISA キット（和光純薬）を用いて測定した。残りの反応液に抗 A $\beta$ 40 ポリクローナル抗体 5  $\mu$ g と Protein G-Sepharose 4 fast flow beads 100  $\mu$ g を加え、4°C で 16 時間反応させた後、ビーズを回収した。1 回目 (A $\beta$ 42 結合) および 2 回目 (A $\beta$ 40 結合) に回収した各ビーズを TBS 200  $\mu$ L で 2 回、続いて 25 mM 炭酸水素アンモニウム 200  $\mu$ L で 2 回洗浄した後、A $\beta$  を 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol 75  $\mu$ L で 2 回溶出し、溶出液を遠心濃縮機を用いて乾固 (60°C、30 分) した。乾固したサンプルに 25 mM 炭酸水素アンモニウム/アセトニトリ

ル (4:1) 25  $\mu$ L と Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega) 1  $\mu$ g を添加し、37°C で 18 時間かけてトリプシン消化させた。

トリプシン消化後の A $\beta$  断片のうち A $\beta$ 17-28 断片を、液体クロマトグラフィー／四重極型質量分析計 (Agilent 1100 HPLC／API 2000 ESI-MS) を用いて分析した。質量分析計の分析条件は、A $\beta$ 17-28 合成ペプチド (LVFFAEDVGSNK, ペプチド研究所) を用いて自動最適化した。10-20  $\mu$ L のサンプルを HPLC に注入し、以下の条件で分離した。

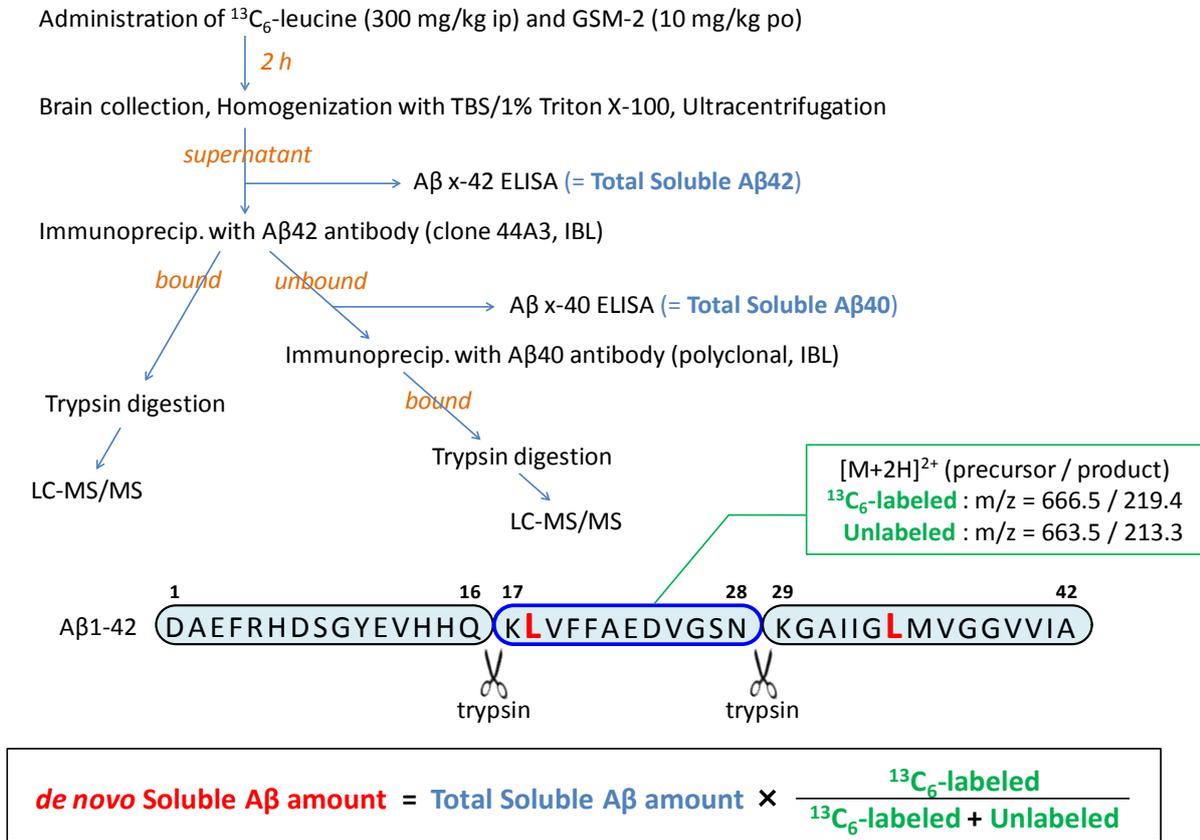
カラム	: CAPCELL PAK C18 (2.0 $\times$ 35 mm, 粒径 3 $\mu$ m, 資生堂)	
移動相	: 水／アセトニトリル／ギ酸=95/ 5/ 0.1 (A) および 5/ 95/ 0.1 (B)	
流速	: 0.5 mL/min	
グラジエント	: Time	%B
	0.0'	10
	1.0'	10
	1.1'	30
	3.0'	30
	3.1'	90
	5.5'	90

検出はMRMモードで行い、二価イオンの m/z 663.5 $\rightarrow$ 213.3 を非標識 A $\beta$ 17-28、m/z 666.5 $\rightarrow$ 219.4 を  $^{13}\text{C}_6$  ロイシン標識 A $\beta$ 17-28 としてそれぞれ測定した。A $\beta$ 17-28 合成ペプチドの測定ピーク高さは、全サンプルをカバーする 2-10,000 fmol の範囲で良好な比例性 ( $r^2=0.999$ ) を示したことから、以下の計算式により、 $^{13}\text{C}_6$  ロイシン標識率および新規合成 A $\beta$  量を算出した。

$$^{13}\text{C}_6 \text{ロイシン標識率} = \frac{^{13}\text{C}_6 \text{標識 A}\beta 17\text{-28 ピーク高さ}}{(^{13}\text{C}_6 \text{標識 A}\beta 17\text{-28 ピーク高さ}) + (\text{非標識 A}\beta 17\text{-28 ピーク高さ})}$$

$$\text{新規合成 A}\beta \text{量} = \text{ELISA 測定 A}\beta \text{量} \times ^{13}\text{C}_6 \text{ロイシン標識率}$$

これら一連の操作を下図にまとめた。



### 2-2.8. 統計解析

データは平均±標準誤差で表し、SAS software (SAS Institute) を用いて統計解析した。  
 2 群間の解析には Student t 検定、3 群間以上の解析には Dunnett 検定を用い、有意水準は  $p < 0.05$  とした。

## 2-3. 結果

### 2-3.1. ヒト神経芽細胞株における内因性 A $\beta$ 産生に対する GSM-2、エナンチオマーの効果

GSM-2 の A $\beta$  産生抑制作用について、第一章ではヒト APP を過剰発現させた神経膠細胞株を用いて評価したが、本章ではより生理環境に近い条件として、ヒト神経芽細胞株の SK-N-BE(2)を用い、その内因性の A $\beta$  産生能力に対する作用を検討した。さらに、本作用が光学立体構造に特異的かどうかを確認するため、GSM-2 の鏡像体（エナンチオマー）についても同時に評価した。GSM-2 は SK-N-BE(2)細胞における内因性 A $\beta$ 42 産生を強力に阻害し、その IC<sub>50</sub> は 0.045  $\mu$ M と、APP 過剰発現細胞における値と同等であった。エナンチオマーも A $\beta$ 42 産生を抑制したが、その IC<sub>50</sub> は 1.24  $\mu$ M と、GSM-2 より 28 倍弱かったことから、本作用の光学立体構造特異性が確認された。内因性 A $\beta$ 40 産生に対する作用は、両化合物とも非常に弱く、IC<sub>50</sub> は 10  $\mu$ M 以上であった。(Fig. 17)

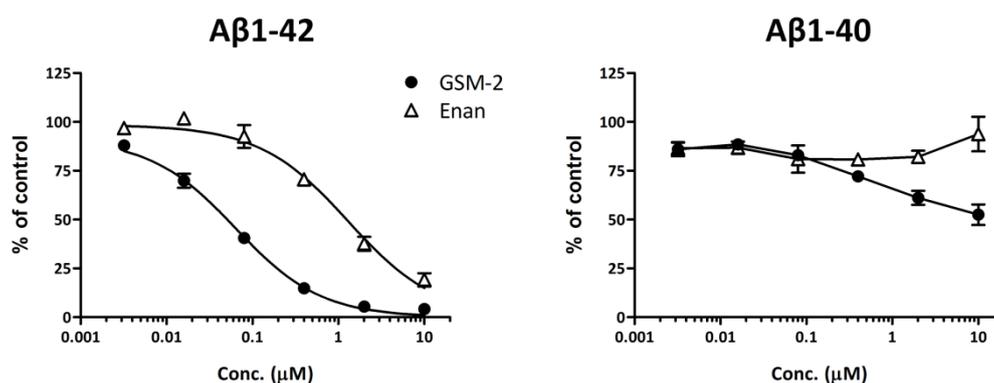


Fig. 17 ヒト神経芽細胞株における内因性 A $\beta$  産生に対する GSM-2、エナンチオマー (Enan) の効果

SK-N-BE(2)細胞を各薬剤に 6 時間曝露させた後、培養液中に分泌された A $\beta$ 1-42 (左図) および A $\beta$ 1-40 (右図) を ELISA にて測定した。データは 3 回の実験の平均 $\pm$ 標準誤差。

### 2-3.2. Tg2576 マウスにおける加齢依存的な脳内アミロイド沈着

6、10、14、および18カ月齢のTg2576マウスについて、その脳内アミロイド沈着を、抗A $\beta$ 42および抗A $\beta$ 40の混合抗体を用いた免疫染色により確認した。A $\beta$ プラークは、6カ月齢では全く認められなかったが、10カ月齢でわずかに検出され、14、18カ月と加齢に伴いその数と大きさは増大した (Fig. 18)。これは Kawarabayashi らによる以前の報告 (Kawarabayashi et al., 2001) と一致する結果であった。

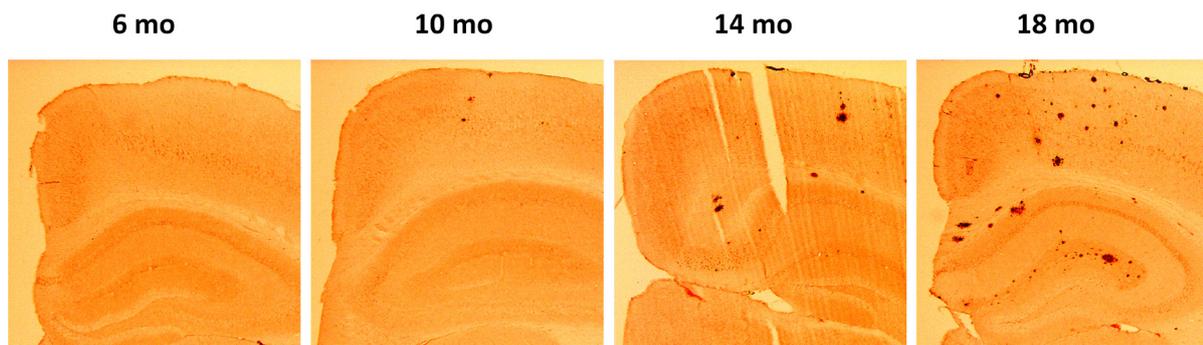


Fig. 18 Tg2576 マウスにおける加齢依存的な脳内アミロイド沈着

### 2-3.3. アミロイド斑沈着後の Tg2576 マウスの認知機能障害に対する GSM-2、エナンチオマーの効果

学習行動試験には、10、14、および 18 カ月齢の Tg2576 マウスを用いた。検討する用量は、第一章での結果から 40%程度の脳内 A $\beta$ 42 低下が予想される 10 mg/kg とした。各月齢のマウスに化合物を 8 日間投与し、最終投与 3 時間後に Y-maze 試験を実施した。いずれの月齢も、Tg2576 マウスの溶媒投与群では同腹の野生型マウスに比べ有意な自発交替正解率の低下を示し、空間作業記憶の障害が認められた。これら障害に対し、GSM-2 投与群ではいずれの月齢においても有意な改善効果を示した。一方、エナンチオマーは 10 および 14 カ月齢のみを検討したが、いずれも改善効果は認められなかったことから、GSM-2 による学習改善効果は A $\beta$ 42 産生抑制に基づくものと推察される (Fig. 19)。いずれの試験においても、化合物投与による総進入回数への影響は認められなかった (data not shown)。

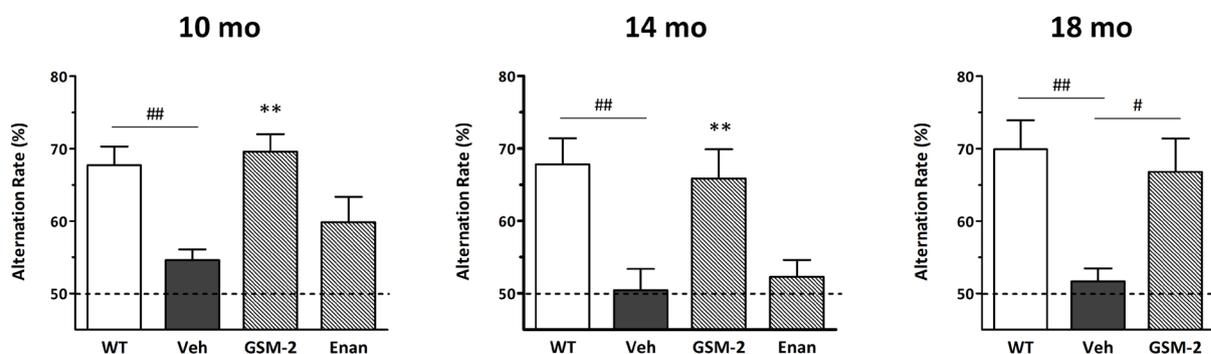


Fig. 19 アミロイド斑沈着後の Tg2576 マウスの認知機能障害に対する GSM-2、エナンチオマー (Enan) の効果

各薬剤 (10 mg/kg) を 8 日間経口投与し、最終投与 3 時間後に Y-maze 試験を行った。18 カ月齢については GSM-2 のみ評価した。点線は交替行動のチャンスレベル (= 最大障害)。#  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ : Student's t 検定。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。平均 ± 標準誤差 (n=6-7)。

#### 2-3.4. 脳内可溶性画分中 A $\beta$ 量および総 A $\beta$ 量に対する GSM-2、エナンチオマーの効果

GSM-2 による脳内 A $\beta$ 42 低下作用と学習障害改善作用との関係を考察するため、Y-maze 試験直後に摘出した海馬を用いて、TBS 可溶性画分中の A $\beta$ 42 量を測定し、自発交替正解率との関係を各個体毎にプロットした。その結果、10 カ月齢では両者の間に有意な負の相関が認められたが、14 および 18 カ月齢では相関は認められなかった (Fig. 20)。群間比較においても、10 カ月齢では GSM-2 投与群で溶媒投与群に比べ 34%の有意な可溶性 A $\beta$ 42 の低下が認められたが、14 および 18 カ月齢では低下は認められなかった。溶媒投与群における可溶性画分中の A $\beta$ 42 量を月齢間で比較したところ、10 カ月齢に比べ 14 カ月齢で 5 倍、18 カ月齢で 12 倍と大きく上昇していた。一方、エナンチオマー投与群では予想どおり、10 および 14 カ月齢ともに溶媒投与群との間に差は見られなかった (Fig. 21A)。同じ可溶性画分中の A $\beta$ 40 についても測定したが、予想どおり、いずれの月齢においても、溶媒投与群と各化合物投与群との間に差は認められなかった (Fig. 21B)。

続いて、海馬のホモジネートを 5M の塩酸グアニジンで可溶化することにより、TBS に不溶性の画分も含めた総 A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 量を測定した。10 カ月齢において総 A $\beta$ 42 量は可溶性 A $\beta$ 42 量の 62 倍と高い値を示し、さらにその量は 14 および 18 カ月齢でそれぞれ 10 カ月齢の 20 および 53 倍と、大きく上昇した。これら総 A $\beta$ 42 量は、いずれの月齢においても GSM-2 およびエナンチオマー投与によって影響を受けなかった (Fig. 22A)。総 A $\beta$ 40 量についても結果は同様であった (Fig. 22B)。

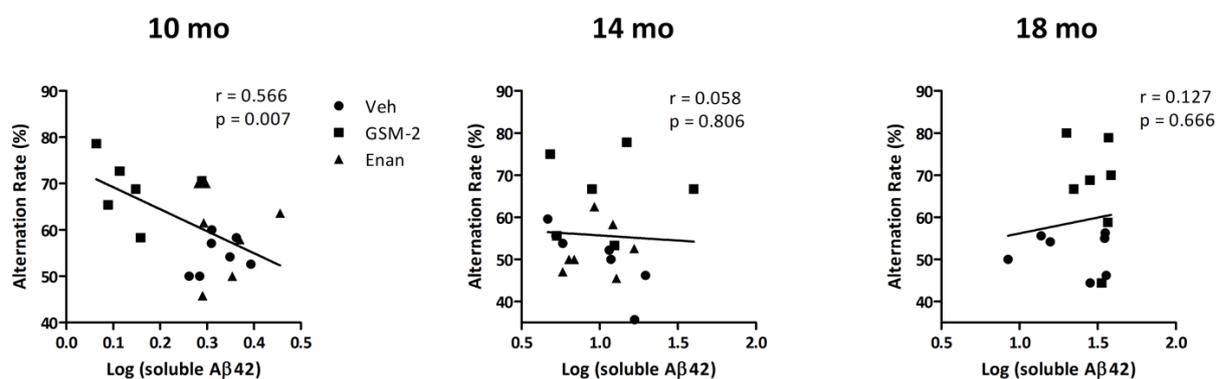


Fig. 20 Y-maze 試験成績と脳内可溶性画分中 Aβ42 量との相関

Fig. 19 の Y-maze 試験直後に海馬を摘出し、TBS 可溶性画分中 Aβ1-42 を ELISA にて測定した。Aβ1-42 量に対して自発交替行動の割合をプロットし、相関性を解析した。

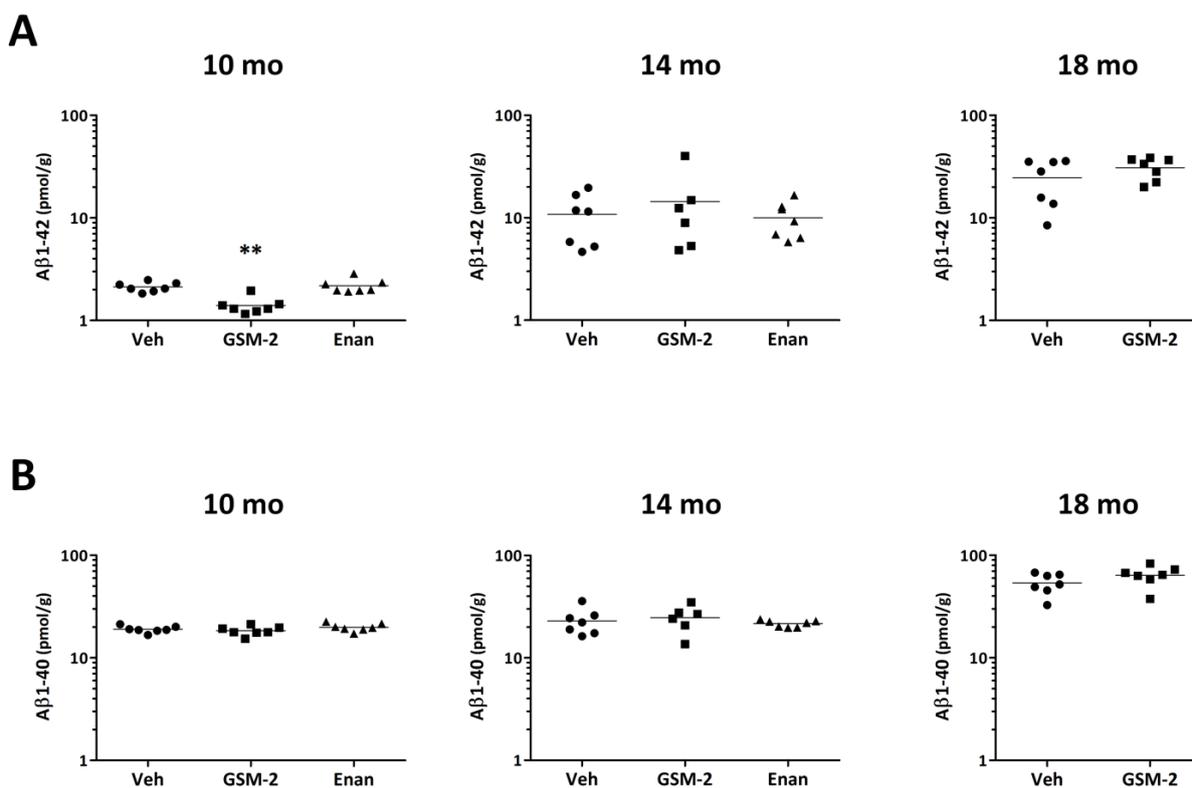
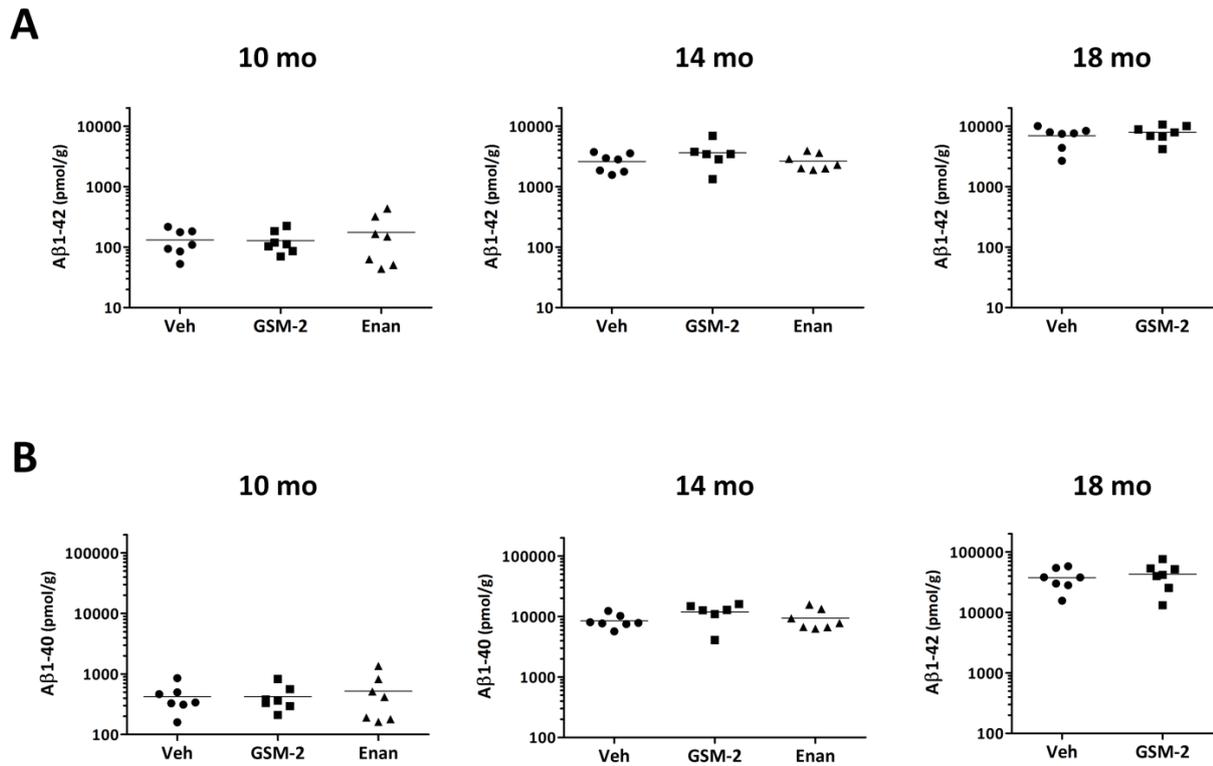


Fig. 21 アミロイド斑沈着後の Tg2576 マウス脳内可溶性画分中 Aβ 量に対する GSM-2、エナンチオマー (Enan) の効果

Fig. 19 の Y-maze 試験直後に海馬を摘出し、TBS 可溶性画分中 Aβ1-42 (A) および Aβ1-40 (B) を ELISA にて測定した。\*\* p<0.01: Dunnett 検定 (対溶媒投与群)。

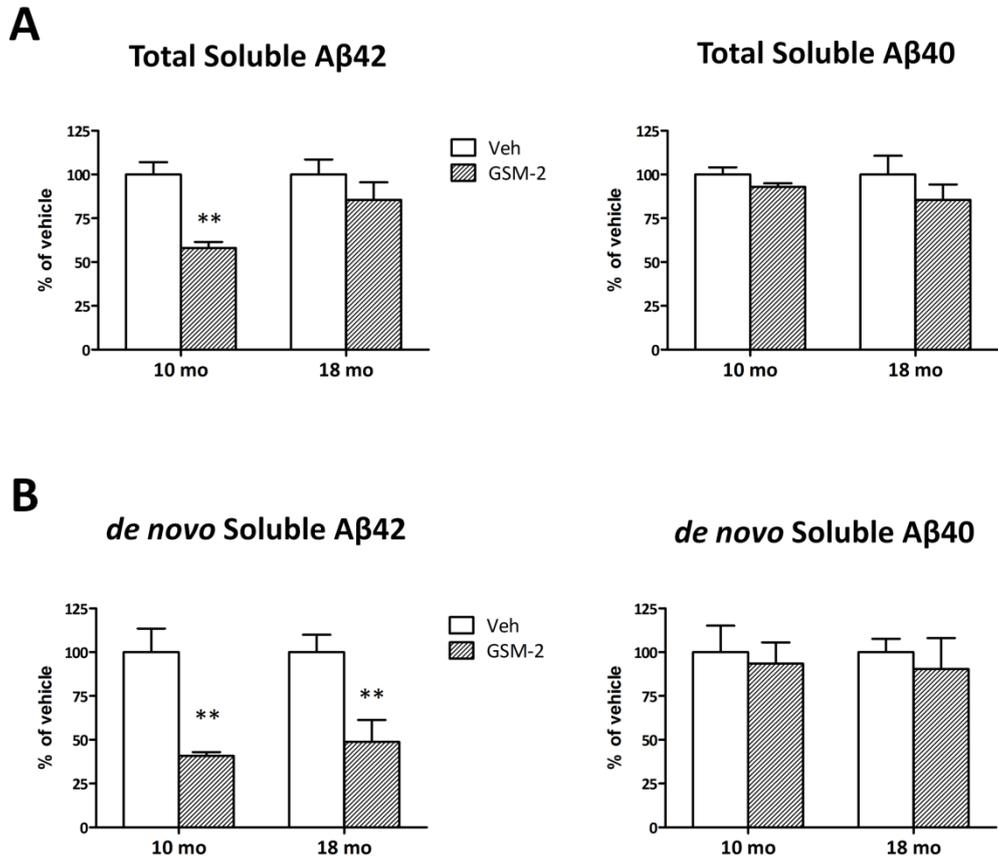


**Fig. 22** アミロイド斑沈着後の Tg2576 マウス脳内総 A $\beta$ 42 および総 A $\beta$ 40 量に対する GSM-2、エナンチオマー (Enan) の効果

Fig. 21 で調製した海馬ホモジネート (遠心前) の一部を塩酸グアニジン溶液で可溶化させた後、A $\beta$ 1-42 (A) および A $\beta$ 1-40 (B) を ELISA にて測定した。

### 2-3.5. 脳内新規合成 A $\beta$ 量に対する GSM-2 の効果

14 および 18 カ月齢では、ベースの脳内可溶性画分中 A $\beta$ 42 が 10 カ月齢に比べ大きく上昇していたことから、通常の ELISA 法では GSM-2 投与による変化を検出することは難しいと考えられた。そこで安定同位体標識法を用いて、脳内で新たに産生された A $\beta$ 42 のみを測定することで、GSM-2 の作用を検出できるか検討した。10 および 18 カ月齢の Tg2576 マウスに  $^{13}\text{C}_6$  ロイシン (300 mg/kg, ip) および GSM-2 (10 mg/kg, po または溶媒) を投与し、2 時間後の脳内可溶性画分中 A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 における  $^{13}\text{C}_6$  ロイシン標識率を、そのトリプシン消化断片の LC-MS/MS 測定により算出した。その結果、10 カ月齢での溶媒投与群の A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 の  $^{13}\text{C}_6$  標識率はそれぞれ、 $6.7 \pm 0.6\%$  および  $6.9 \pm 1.0\%$  (mean  $\pm$  SEM; n=6) であった。一方、18 カ月齢での標識率は、ベースの可溶性画分中 A $\beta$  (=標識されない A $\beta$ ) が多いことを反映して、それぞれ  $0.82 \pm 0.13\%$  および  $2.1 \pm 0.3\%$  と低い値を示した。ELISA により測定される総可溶性 A $\beta$ 42 は、GSM-2 投与により 10 カ月齢でのみ有意に低下し ( $\Delta 42\%$ )、前項の実験結果が再現された (Fig. 23A)。しかし、この総可溶性 A $\beta$ 42 量に  $^{13}\text{C}_6$  ロイシン標識率を乗じることで算出される新規合成 A $\beta$ 42 量は、GSM-2 投与により 10 カ月齢で  $\Delta 58\%$ 、18 カ月齢で  $\Delta 53\%$  と、両月齢で同等の有意な低下が認められた (Fig. 23B)。A $\beta$ 40 については予想どおり、総可溶性および新規合成ともに GSM-2 投与による変動は見られなかった。



**Fig. 23** Tg2576 マウスの脳内新規合成 A $\beta$  量に対する GSM-2 の効果

$^{13}\text{C}_6$ -ロイシンおよび GSM-2 を投与 2 時間後に脳を摘出し、1% Triton X-100 含有 TBS を用いて A $\beta$  を抽出した。(A) 可溶性画分中の A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 を ELISA にて測定した。(B) 可溶性画分中の A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 をそれぞれ免疫沈降により精製し、トリプシン消化後の A $\beta$  断片について  $^{13}\text{C}_6$ -ロイシン標識量 (=新規合成 A $\beta$  量) を LC-MS/MS にて測定した。 \*\*  $p < 0.01$ : Student's t 検定 (対溶媒投与群)。平均  $\pm$  標準誤差 (n=5-6)。

## 2-4. 考察

本検討ではアミロイド斑沈着後の高月齢 Tg2576 マウスを用いて、その脳内 A $\beta$  量および認知機能に対する GSM-2 投与の効果を検討し、GSM-2 の 8 日間投与によって脳内総可溶性 A $\beta$ 42 は低下しないが、新規の A $\beta$ 42 生成量は減少すること、そして認知機能障害が改善することを明らかにした。

ヒト神経芽細胞を用いた A $\beta$  産生実験において、GSM-2 はそのエナンチオマー体に比べ 28 倍強い A $\beta$ 42 産生抑制作用を示した (Fig. 17)。これは GSM の分子機序が、細胞膜の流動性変化のような非特異的作用によるもの (Gamerding et al., 2007) ではなく、蛋白質との立体特異的相互作用によるものであることを示唆する。本研究では第一章において、GSM-2 による認知機能改善効果はオフターゲットによるものではなく、A $\beta$ 42 産生抑制という主活性に基づくものであると考察したが、本検討ではそれをさらに補強するため、このエナンチオマー体を陰性コントロールとして *in vivo* 試験を行った。10、14、および 18 カ月齢の Tg2576 マウスを用いた Y-maze 試験の結果、GSM-2 はマウス脳内のアミロイド斑沈着の程度に関わらず、その認知機能障害を有意に改善した (Fig. 19)。このように、GSM などの A $\beta$  産生抑制薬をアミロイド斑沈着後から投与開始しても、学習障害に対して治療効果が得られることを示した報告はこれまでなく、臨床応用の可能性という観点からも重要な知見といえる。また、エナンチオマーには治療効果が認められなかったこと (Fig. 19)、薬剤投与後の 10 カ月齢マウスの脳内可溶性 A $\beta$ 42 量が学習成績と有意に逆相関した (Fig. 20) ことは、GSM-2 による治療効果が A $\beta$ 42 産生抑制に基づくものであるという考えを支持する。しかし 14 および 18 カ月齢では、治療効果は得られたにも関わらず、A $\beta$ 42 量の低下は検出されなかった (Fig. 21A)。GSM-2 はその機序から、新規に合成される A $\beta$ 42 を減らすことはできても、既に存在している A $\beta$ 42 を減らすことはできない。14 および 18 カ月齢では、投与前の可溶性 A $\beta$ 42 量が 10 カ月齢に比べて大きく上昇しており、そのため GSM-2 による産生抑制効果が全体量の低下としては検出できなかった、と考えられる。

14 および 18 カ月齢マウスにおいて、GSM-2 による脳内 A $\beta$ 42 低下が検出できなかった原因としては、加齢による細胞膜環境（脂質組成や酸化レベルなど）の変化によって、GSM-2 の A $\beta$ 42 産生抑制作用が減弱したという可能性も否定できない。これを検証するためには、脳内で新たに合成された A $\beta$  と既に存在する A $\beta$  を区別して定量することで、in vivo での A $\beta$ 42 産生に対する作用を評価する必要がある。Bateman らは 13C6 ロイシンによる安定同位体標識法を用いて、ヒトの脳脊髄液中に現れた新規合成 A $\beta$  を定量し、ヒト脳内での A $\beta$  生成およびクリアランス速度を推定した (Bateman et al., 2006)。また、Castellano らはこの方法を用いて ApoE knock-in マウス脳内の新規合成 A $\beta$  量を測定している (Castellano et al., 2011)。本法を用いた薬剤評価としては、GSI (LY450139 または MK-0752) がヒトまたはサル の脳脊髄液中の新規合成 A $\beta$  量を低下したという報告がある (Bateman et al., 2009, Cook et al., 2010)。しかしこれらの報告は全て、A $\beta$  x (=全 A $\beta$  種) としての新規合成量を測定したものであり、GSM-2 のように A $\beta$ 42 産生のみを抑制する化合物の評価には使えない。そこで本検討では、既報で用いている A $\beta$  の中央部分を認識する抗体の代わりに、A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 それぞれの C 末端を特異的に認識する抗体を用いて、二段階の免疫沈降を行うことにより、同一サンプルから A $\beta$ 42 および A $\beta$ 40 それぞれの新規合成量を測定する方法を構築した。本法を用いて GSM-2 の作用を検討した結果、GSM-2 は 10 カ月齢と 18 カ月齢で同等の脳内 A $\beta$ 42 産生抑制作用を示し、加齢によって作用は減弱しないことが確認された (Fig. 23B)。このことと、18 カ月齢でも認知機能改善作用が認められたことから、Tg2576 マウスの認知機能障害には新規に合成された A $\beta$ 42 が大きな寄与を果たしている可能性が示唆された。

アミロイド斑沈着後のマウス脳内では、細胞間隙中の可溶性 A $\beta$ 42 はアミロイド斑に引き寄せられて合流・凝集化するため、その濃度は沈着前よりむしろ低いと報告されている (Hong et al., 2011)。もしこの A $\beta$ 42 が認知機能障害に寄与しているとすれば、アミロイド斑沈着後ではむしろ障害が弱くなるはずだが、実際はそうになっていない (Fig. 19)。一方、新規合成後にプレシナプスからシナプス間隙に遊離されたばかりの A $\beta$ 42 はすぐにはアミ

ロイド斑に合流せず、ポストシナプス側の各種受容体に結合することで神経機能を障害すると考えられる (Fig. 24)。GSM-2 はこのシナプス間隙に遊離される A $\beta$ 42 を減少させることで、アミロイド斑の沈着量に関係なく、シナプス機能障害を改善した可能性が考えられる。尚、本検討ではアミロイド斑の沈着量に依存して可溶性画分に回収される A $\beta$ 42 量が大きく増加した。これは、抽出過程での物理的操作の影響で、アミロイド斑周辺における凝集化—可溶化の平衡が可溶化側にシフトしたことによると考えられる (Shankar et al., 2008)。

本研究では第一章、第二章とあわせて、マウスの認知機能評価法として Y-maze 試験を用いた。このような動物の自発行動習性を利用した試験は簡便で、かつ動物へのストレス負荷がほとんどないという点で優れている。本試験で測定される機能は短期作業記憶能力で、その障害は AD の発症初期から認められる。臨床で効果が確認されている塩酸ドネペジルおよびメマンチンは、いずれも本試験に有効であり、一定の臨床予測性があるものと考えている (unpublished data)。一方、モリス水迷路試験などで評価される長期記憶に対する GSM-2 の作用については未検討であり、今後の課題と言える。ただし、 $\beta$ -セクレターゼ阻害薬については、Y-maze 試験とモリス水迷路試験において同等の有効性を確認しており (unpublished data)、A $\beta$ 42 産生抑制という共通機序から考えると、GSM-2 は長期記憶に対しても改善効果を示すものと期待される。

本検討の結果、Tg2576 マウスに対してアミロイド斑沈着後から GSM の投与を開始しても、その認知機能を改善できることが初めて明らかとなった。よって、すでにアミロイド斑が沈着している AD 患者においても、GSM 投与によってその認知機能が改善される可能性はあると考えられる。

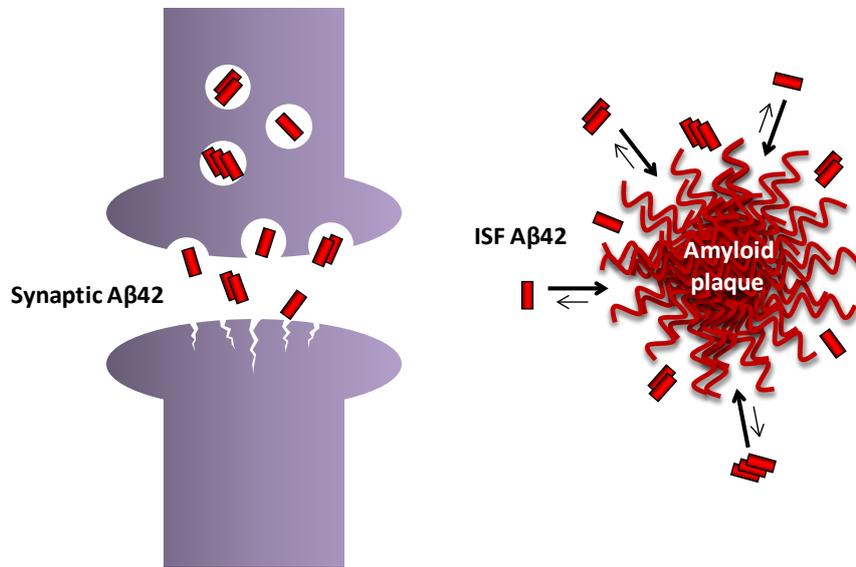


Fig. 24 Tg2576 マウスにおける新規合成および既存 Aβ42 の脳内ダイナミクスの想定模式図

## 2-5. 小括

- ① GSM-2 の 8 日間投与は、アミロイド斑沈着量の異なる 10、14、および 18 カ月齢のいずれの Tg2576 マウスに対しても、その認知機能障害を有意に改善した
- ② GSM-2 は、アミロイド斑沈着がごくわずかの 10 カ月齢に対しては、その脳内可溶性 A $\beta$ 42 量を有意に低下させた。しかし、沈着量が多い 14 および 18 カ月齢では、GSM-2 による A $\beta$ 42 低下は検出できなかった
- ③ GSM-2 は、脳内の新規合成 A $\beta$ 42 量については、10 カ月齢と 18 カ月齢でほぼ同程度低下させた。Tg2576 マウスの認知機能障害には、新規に合成された A $\beta$ 42 が重要な役割を担っていると考えられた



## 総括

ADの発症機序としてアミロイド仮説が提唱されるようになってから20年が経過した今もなお、病態進行の抑制に有効な薬剤は誕生していない。これまでにA $\beta$ の凝集や産生を阻害する薬剤が複数、臨床で試されてきたが、いずれも失敗に終わっていることから、A $\beta$ アプローチは少なくともAD発症後から開始しても効果がないと考えられるようになってきた。しかし、いずれの薬剤もA $\beta$ アプローチを検証するツールとしては適切でなかった可能性が考えられる。例えばGSMのtareflurbilは活性が弱い上に脳内移行性も低く、臨床で血中A $\beta$ の低下すら確認できていない。一方、GSIのLY450139およびBMS-708163は、臨床で血中および脳脊髄液中のA $\beta$ 低下を確認しているが、認知機能スコアはむしろ悪化した。本研究において、これら2化合物がマウスでも認知機能を悪化させたことは、ヒトとマウスで共通のメカニズムが働いている可能性を示唆する。本研究では $\beta$ -CTF蓄積をそのメカニズムとして提唱したが、その証明にはさらなる検討が必要である。しかし、より重要なことは、機序的に $\beta$ -CTF蓄積を起こさないGSM-2は認知機能を悪化させず、むしろ病態マウスの機能障害を改善させたことである。すなわち、A $\beta$ 産生抑制というアプローチの検証にGSIは適切でなく、第二世代GSMもしくは $\beta$ -セクレターゼ阻害薬によって初めて検証されるものと考えられる。

もう一つ考えるべき点は、すでに大量のアミロイド斑が沈着するほどA $\beta$ が蓄積しているAD患者に対し、新たなA $\beta$ 産生を抑えることが果たしてどれほどの意味を持つのか、という点である。本研究では、アミロイド斑沈着後の高月齢モデルマウスに対するGSM-2の作用を検証することで、新たなA $\beta$ 42産生を抑えることが認知機能改善に効果的であることを示した。モデルマウスではADで見られる神経細胞死までは模倣できておらず、必ずしも患者での効果を保証するものではないが、シナプス機能改善という観点では一定の効果が得られる可能性はあると考えられる。

以上、本研究ではGSIおよびGSMの認知機能に対する作用を中心に検討を行い、そ

の作用の違いを報告するとともに、GSM の AD 治療薬としての可能性について考察した。現在、第二世代 GSM の臨床試験が進行中であり、今後その可能性が検証されることが期待される。

## 謝辞

本論文の発表および作成に関しまして、有益なご助言ならびにご指導を賜りました東京大学大学院薬学系研究科 岩坪威教授、富田泰輔准教授に深く感謝いたします。

本研究に関し、直接のご指導ならびにご鞭撻を賜りましたアステラス製薬株式会社 松岡信也博士（当時）、志鷹義嗣博士に厚くお礼申し上げます。また、本研究に多大なるご協力を頂きましたアステラス製薬株式会社 鎌水順子修士、赤芝洋紀博士、内野裕史博士、倪健偉博士、山崎真五博士に心より感謝いたします。最後に、本研究にご協力頂きました共著者の方々をはじめ、アステラス製薬株式会社薬理研究所神経科学研究室の皆様にご感謝申し上げます。



## 論文目録

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

### 第一章

Mitani Y, Yarimizu J, Saita K, Uchino H, Akashiba H, Shitaka Y, Ni K, and Matsuoka N.

Differential effects between  $\gamma$ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice.

*J. Neurosci.* 2012, 32: 2037-2050.

### 第二章

Mitani Y, Yarimizu J, Akashiba H, Shitaka Y, Ni K, and Matsuoka N.

Amelioration of cognitive deficits in plaque-bearing Alzheimer's disease model mice through selective reduction of nascent soluble A $\beta$ 42 without affecting other A $\beta$  pools.

*J. Neurochem.* 2013, 125: 465-472.



## 引用文献

- Abramowski D, Wiederhold KH, Furrer U, Jatton AL, Neuenschwander A, Runser MJ, Danner S, Reichwald J, Ammaturo D, Staab D, Stoeckli M, Rueeger H, Neumann U, Staufenbiel M (2008) Dynamics of A $\beta$  turnover and deposition in different beta-amyloid precursor protein transgenic mouse models following gamma-secretase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 327:411-424.
- Alberi L, Liu S, Wang Y, Badie R, Smith-Hicks C, Wu J, Pierfelice TJ, Abazyan B, Mattson MP, Kuhl D, Pletnikov M, Worley PF, Gaiano N (2011) Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks. *Neuron* 69:437-444.
- Albright C, Dockens RC, Meredith J, Olson R, Slemmon R, Lentz K, Wang JS, Denton RR, Pilcher G, Rhyne P, Raybon JJ, Barten DM, Burton C, Toyn J, Sankaranarayana S, Polson C, Guss V, White R, Simutis F, Sanderson T, Gillman K, Starrett J, Bronson J, Sverdlow O, Huang SP, Castaneda L, Feldman H, Coric V, Zaczek R, Macor J, Houston J, Berman R, Tong G (2012) Pharmacodynamics of Selective Inhibition of gamma-Secretase by Avagacestat. *J Pharmacol Exp Ther* 344:686-695.
- Allison JG, Das PM, Ma J, Inglis FM, Jones FE (2011) The ERBB4 intracellular domain (4ICD) regulates NRG1-induced gene expression in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 70:155-163.
- Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, Turner M, Rowe B, Wang B, Kounnas MZ, Lamb BT, Barten D, Felsenstein K, McDonald I, Srinivasan K, Munoz B, Wagner SL (2005) Reductions in beta-amyloid concentrations in vivo by the gamma-secretase inhibitors BMS-289948 and BMS-299897. *Biochem Pharmacol* 69:689-698.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631-639.
- Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM (2006) Human amyloid- $\beta$  synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med* 12:856-861.
- Bateman RJ, Siemers ER, Mawuenyega KG, Wen G, Browning KR, Sigurdson WC, Yarasheski KE, Friedrich SW, DeMattos RB, May PC, Paul SM, Holtzman DM (2009) A  $\gamma$ -secretase

- inhibitor decreases amyloid- $\beta$  production in the central nervous system. *Ann Neurol* 66:48-54.
- Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Jung CKE, Volbracht C, Steiner H, Mitteregger G, Kretzschmar HA, Haass C, Herms J (2009)  $\gamma$ -Secretase Inhibition Reduces Spine Density In Vivo via an Amyloid Precursor Protein-Dependent Pathway. *J Neurosci* 29:10405-10409.
- Boccia MM, Blake MG, Krawczyk MC, Baratti CM (2011) Sildenafil, a selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, enhances memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice. *Behav Brain Res* 220:319-324.
- Bot N, Schweizer C, Ben Halima S, Fraering PC (2011) Processing of the Synaptic Cell Adhesion Molecule Neurexin-3  $\beta$  by Alzheimer Disease  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Secretases. *J Biol Chem* 286:2762-2773.
- Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C, Goate AM, Bales KR, Paul SM, Bateman RJ, Holtzman DM (2011) Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- $\beta$  Peptide Clearance. *Sci Transl Med* 3:89ra57.
- Castro NG, Costa RS, Pimentel LS, Danuello A, Romeiro NC, Viegas C, Jr., Barreiro EJ, Fraga CA, Bolzani VS, Rocha MS (2008) CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. *Eur J Pharmacol* 580:339-349.
- Cirrito JR, May PC, O'Dell MA, Taylor JW, Parsadanian M, Cramer JW, Audia JE, Nissen JS, Bales KR, Paul SM, DeMattos RB, Holtzman DM (2003) In Vivo Assessment of Brain Interstitial Fluid with Microdialysis Reveals Plaque-Associated Changes in Amyloid- $\beta$  Metabolism and Half-Life. *J Neurosci* 23:8844-8853.
- Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, Schoepp DD, Paul SM, Mennerick S, Holtzman DM (2005) Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- $\beta$  levels in vivo. *Neuron* 48:913-922.
- Comery TA, Martone RL, Aschmies S, Atchison KP, Diamantidis G, Gong X, Zhou H, Kreft AF, Pangalos MN, Sonnenberg-Reines J, Jacobsen JS, Marquis KL (2005) Acute  $\gamma$ -Secretase Inhibition Improves Contextual Fear Conditioning in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 25:8898-8902.
- Cook JJ, Wildsmith KR, Gilberto DB, Holahan MA, Kinney GG, Mathers PD, Michener MS, Price EA, Shearman MS, Simon AJ, Wang JX, Wu G, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Acute gamma-secretase inhibition of nonhuman primate CNS shifts amyloid precursor protein

(APP) metabolism from amyloid-beta production to alternative APP fragments without amyloid-beta rebound. *J Neurosci* 30:6743-6750.

Coric V, van Dyck CH, Salloway S, Andreasen N, Brody M, Richter RW, Soininen H, Thein S, Shiovitz T, Pilcher G, Colby S, Rollin L, Dockens R, Pachai C, Portelius E, Andreasson U, Blennow K, Soares H, Albright C, Feldman HH, Berman RM (2012) Safety and tolerability of the  $\gamma$ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease. *Arch Neurol* 69:1430-1440.

Costa RM, Honjo T, Silva AJ (2003) Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Curr Biol* 13:1348-1354.

De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.

De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert W, Von Figura K, Van Leuven F (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 391:387-390.

Demuro A, Mina E, Kaye R, Milton SC, Parker I, Glabe CG (2005) Calcium Dysregulation and Membrane Disruption as a Ubiquitous Neurotoxic Mechanism of Soluble Amyloid Oligomers. *J Biol Chem* 280:17294-17300.

Dewachter I, Reverse D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den Haute C, Spittaels K, Umans L, Serneels L, Thiry E, Moechars D, Mercken M, Godaux E, Van Leuven F (2002) Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 22:3445-3453.

Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, Kieburtz K, He F, Sun X, Thomas RG, Aisen PS, Siemers E, Sethuraman G, Mohs R (2013) A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease. *N Engl J Med* 369:341-350.

Eriksen JL, Sagi SA, Smith TE, Weggen S, Das P, McLendon DC, Ozols VV, Jessing KW, Zavitz KH, Koo EH, Golde TE (2003) NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target gamma-secretase and lower A $\beta$  42 in vivo. *J Clin Invest* 112:440-449.

- Fleisher AS, Raman R, Siemers ER, Becerra L, Clark CM, Dean RA, Farlow MR, Galvin JE, Peskind ER, Quinn JF, Sherzai A, Sowell BB, Aisen PS, Thal LJ (2008) Phase 2 safety trial targeting amyloid beta production with a gamma-secretase inhibitor in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 65:1031-1038.
- Gamerding M, Clement AB, Behl C (2007) Cholesterol-like effects of selective cyclooxygenase inhibitors and fibrates on cellular membranes and amyloid-beta production. *Mol Pharmacol* 72:141-151.
- Garcia Y, Hannam JC, Harrison T, Hamblett CL, Hubbs JL, Kulagowski JJ, Madin A, Ridgill MP, Seward E (2007) Piperidines and related compounds for treatment of Alzheimer's disease. In: WO2007/125364.
- Gillman KW, Starrett JE, Parker MF, Xie K, Bronson JJ, Marcin LR, McElhone KE, Bergstrom CP, Mate RA, Williams R, Meredith JE, Burton CR, Barten DM, Toyn JH, Roberts SB, Lentz KA, Houston JG, Zaczek R, Albright CF, Decicco CP, Macor JE, Olson RE (2010) Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable  $\gamma$ -Secretase Inhibitor. *ACS Med Chem Lett* 1:120-124.
- Green RC, Schneider LS, Amato DA, Beelen AP, Wilcock G, Swabb EA, Zavitz KH (2009) Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 302:2557-2564.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353-356.
- Hawkins J, Harrison DC, Ahmed S, Davis RP, Chapman T, Marshall I, Smith B, Mead TL, Medhurst A, Giblin GM, Hall A, Gonzalez MI, Richardson J, Hussain I (2011) Dynamics of A $\beta$ 42 reduction in plasma, CSF and brain of rats treated with the gamma-secretase modulator, GSM-10h. *Neurodegener Dis* 8:455-464.
- Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D (1999) Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 29:177-185.
- Hong S, Quintero-Monzon O, Ostaszewski BL, Podlisny DR, Cavanaugh WT, Yang T, Holtzman DM, Cirrito JR, Selkoe DJ (2011) Dynamic Analysis of Amyloid  $\beta$ -Protein in Behaving Mice Reveals Opposing Changes in ISF versus Parenchymal A $\beta$  during Age-Related Plaque Formation. *J Neurosci* 31:15861-15869.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996)

Correlative Memory Deficits, A $\beta$  Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* 274:99-103.

Imbimbo BP, Del Giudice E, Cenacchi V, Volta R, Villetti G, Facchinetti F, Riccardi B, Puccini P, Moretto N, Grassi F, Ottonello S, Leon A (2007) In vitro and in vivo profiling of CHF5022 and CHF5074 Two beta-amyloid1-42 lowering agents. *Pharmacol Res* 55:318-328.

Imbimbo BP, Giardino L, Sivilia S, Giuliani A, Gusciglio M, Pietrini V, Del Giudice E, D'Arrigo A, Leon A, Villetti G, Calzà L (2010) CHF5074, a Novel  $\gamma$ -Secretase Modulator, Restores Hippocampal Neurogenesis Potential and Reverses Contextual Memory Deficit in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 20:159-173.

Inoue E, Deguchi-Tawarada M, Togawa A, Matsui C, Arita K, Katahira-Tayama S, Sato T, Yamauchi E, Oda Y, Takai Y (2009) Synaptic activity prompts  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage of EphA4 and dendritic spine formation. *J Cell Biol* 185:551-564.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45-53.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT, Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry (Mosc)* 32:4693-4697.

Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A, Ginsberg SD, Cataldo AM, Mathews PM, Nixon RA (2010) Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A $\beta$ -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1630-1635.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R (2003) APP processing and synaptic function. *Neuron* 37:925-937.

Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW, Murakami T, Matsubara E, Abe K, Ashe KH, Younkin SG (2004) Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24:3801-3809.

Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG (2001) Age-Dependent Changes in Brain, CSF, and Plasma Amyloid  $\beta$  Protein in the Tg2576 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 21:372-381.

- Kim HJ, Suh YH, Lee MH, Ryu PD (1999) Cation selective channels formed by a C-terminal fragment of  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Neuroreport* 10:1427-1431.
- Klein WL, Krafft GA, Finch CE (2001) Targeting small A $\beta$  oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* 24:219-224.
- Kopan R, Ilagan MX (2004)  $\gamma$ -Secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:499-504.
- Kopan R, Ilagan MX (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 137:216-233.
- Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS (1996) Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1683-1688.
- Kounnas MZ, Danks AM, Cheng S, Tyree C, Ackerman E, Zhang X, Ahn K, Nguyen P, Comer D, Mao L, Yu C, Pleynt D, Digregorio PJ, Velicelebi G, Stauderman KA, Comer WT, Mobley WC, Li Y-M, Sisodia SS, Tanzi RE, Wagner SL (2010) Modulation of  $\gamma$ -Secretase Reduces  $\beta$ -Amyloid Deposition in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuron* 67:769-780.
- Kreft AF, Martone R, Porte A (2009) Recent Advances in the Identification of  $\gamma$ -Secretase Inhibitors To Clinically Test the A $\beta$  Oligomer Hypothesis of Alzheimer's Disease. *J Med Chem* 52:6169-6188.
- Kukar T, Prescott S, Eriksen J, Holloway V, Murphy MP, Koo E, Golde T, Nicolle M (2007) Chronic administration of R-flurbiprofen attenuates learning impairments in transgenic amyloid precursor protein mice. *BMC Neurosci* 8:54.
- Kuperstein I, Broersen K, Benilova I, Rozenski J, Jonckheere W, Debulpaep M, Vandersteen A, Segers-Nolten I, Van Der Werf K, Subramaniam V, Braeken D, Callewaert G, Bartic C, D'Hooge R, Martins IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *EMBO J* 29:3408-3420.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007a) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796-807.

- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL (2007b) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796-807.
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang HC, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee HK, Wong PC (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- $\beta$  amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693-11709.
- Lanz TA, Fici GJ, Merchant KM (2005) Lack of specific amyloid- $\beta$ (1-42) suppression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in young, plaque-free Tg2576 mice and in guinea pig neuronal cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 312:399-406.
- Larson ME, Lesne SE (2012) Soluble Abeta oligomer production and toxicity. *J Neurochem* 120 Suppl 1:125-139.
- Lee MK, Slunt HH, Martin LJ, Thinakaran G, Kim G, Gandy SE, Seeger M, Koo E, Price DL, Sisodia SS (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues. *J Neurosci* 16:7513-7525.
- Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, Beach T, Kurth JH, Rydel RE, Rogers J (1999) Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 155:853-862.
- Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK (2003) A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell* 114:635-645.
- Martone RL, Zhou H, Atchison K, Comery T, Xu JZ, Huang X, Gong X, Jin M, Kreft A, Harrison B, Mayer SC, Aschmies S, Gonzales C, Zaleska MM, Riddell DR, Wagner E, Lu P, Sun SC, Sonnenberg-Reines J, Oganessian A, Adkins K, Leach MW, Clarke DW, Huryn D, Abou-Gharbia M, Magolda R, Bard J, Frick G, Raje S, Forlow SB, Balliet C, Burczynski ME, Reinhart PH, Wan HI, Pangalos MN, Jacobsen JS (2009) Begacestat (GSI-953): a novel, selective thiophene sulfonamide inhibitor of amyloid precursor protein  $\gamma$ -secretase for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 331:598-608.
- McCarthy JV, Twomey C, Wujek P (2009) Presenilin-dependent regulated intramembrane proteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Cell Mol Life Sci* 66:1534-1555.
- McDonald JM, Savva GM, Brayne C, Welzel AT, Forster G, Shankar GM, Selkoe DJ, Ince PG,

- Walsh DM (2010) The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia. *Brain* 133:1328-1341.
- McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, Skipper L, Murphy MP, Beard J, Das P, Jansen K, Delucia M, Lin WL, Dolios G, Wang R, Eckman CB, Dickson DW, Hutton M, Hardy J, Golde T (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* 47:191-199.
- McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Beyreuther K, Bush AI, Masters CL (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- Mihara T, Mihara K, Yarimizu J, Mitani Y, Matsuda R, Yamamoto H, Aoki S, Akahane A, Iwashita A, Matsuoka N (2007) Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A1 and A2A receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. *J Pharmacol Exp Ther* 323:708-719.
- Milano J, McKay J, Dagenais C, Foster-Brown L, Pognan F, Gadiant R, Jacobs RT, Zacco A, Greenberg B, Ciaccio PJ (2004) Modulation of Notch Processing by  $\gamma$ -Secretase Inhibitors Causes Intestinal Goblet Cell Metaplasia and Induction of Genes Known to Specify Gut Secretory Lineage Differentiation. *Toxicol Sci* 82:341-358.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050-4058.
- Murayama O, Tomita T, Nihonmatsu N, Murayama M, Sun X, Honda T, Iwatsubo T, Takashima A (1999) Enhancement of amyloid beta 42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 265:61-63.
- Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G, Momoli F, Welner SA, Massicotte G, Julien JP, Shapiro ML (1997) Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 387:500-505.
- Oehlrich D, Berthelot DJC, Gijzen HJM (2011)  $\gamma$ -Secretase Modulators as Potential Disease Modifying Anti-Alzheimer's Drugs. *J Med Chem* 54:669-698.
- Ohki Y, Higo T, Uemura K, Shimada N, Osawa S, Berezovska O, Yokoshima S, Fukuyama T,

- Tomita T, Iwatsubo T (2011) Phenylpiperidine-type  $\gamma$ -secretase modulators target the transmembrane domain 1 of presenilin 1. *EMBO J* 30:4815-4824.
- Oster-Granite ML, McPhie DL, Greenan J, Neve RL (1996) Age-Dependent Neuronal and Synaptic Degeneration in Mice Transgenic for the C Terminus of the Amyloid Precursor Protein. *J Neurosci* 16:6732-6741.
- Pu YJ, Vaid RK, Boini SK, Towsley RW, Doecke CW, Mitchell D (2008) A Practical Method for Functionalized Peptide or Amide Bond Formation in Aqueous–Ethanol Media with EDC as Activator. *Org Process Res Dev* 13:310-314.
- Rushworth JV, Hooper NM (2010) Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes. *Int J Alzheimers Dis* 2011:603052.
- Rutten K, Prickaerts J, Blokland A (2006) Rolipram reverses scopolamine-induced and time-dependent memory deficits in object recognition by different mechanisms of action. *Neurobiol Learn Mem* 85:132-138.
- Saura CA, Chen G, Malkani S, Choi SY, Takahashi RH, Zhang D, Gouras GK, Kirkwood A, Morris RG, Shen J (2005) Conditional inactivation of presenilin 1 prevents amyloid accumulation and temporarily rescues contextual and spatial working memory impairments in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 25:6755-6764.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789-791.
- Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL (2007) Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 27:2866-2875.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ (2008) Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14:837-842.
- Siemers E, Henley D, Sundell K, Sethuraman G, Dean R, Wroblewski K, Mohs R (2011) Evaluating semagacestat, a gamma-secretase inhibitor, in a phase III trial. *Alzheimers demet* 7:S484-S485.
- Siemers ER, Quinn JF, Kaye J, Farlow MR, Porsteinsson A, Tariot P, Zoulnouni P, Galvin JE, Holtzman DM, Knopman DS, Satterwhite J, Gonzales C, Dean RA, May PC (2006) Effects

- of a gamma-secretase inhibitor in a randomized study of patients with Alzheimer disease. *Neurology* 66:602-604.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402:537-540.
- Struhl G, Greenwald I (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398:522-525.
- Suh YH, Kim HS, Lee JP, Park CH, Jeong SJ, Kim SS, Rah JC, Seo JH (2000) Roles of A beta and carboxyl terminal peptide fragments of amyloid precursor protein in Alzheimer disease. *J Neural Transm Suppl* 65-82.
- Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009)  $\gamma$ -Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of  $\beta$ -carboxyl terminal fragment. *J Neurosci* 29:13042-13052.
- Tokita K, Inoue T, Yamazaki S, Wang F, Yamaji T, Matsuoka N, Mutoh S (2005) FK962, a novel enhancer of somatostatin release, exerts cognitive-enhancing actions in rats. *Eur J Pharmacol* 527:111-120.
- Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H (2008) A new amyloid  $\beta$  variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Annals of Neurology* 63:377-387.
- Van Dam D, D'Hooge R, Staufenbiel M, Van Ginneken C, Van Meir F, De Deyn PP (2003) Age-dependent cognitive decline in the APP23 model precedes amyloid deposition. *Eur J Neurosci* 17:388-396.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735-741.
- Wang Y, Chan SL, Miele L, Yao PJ, Mackes J, Ingram DK, Mattson MP, Furukawa K (2004) Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S*

A 101:9458-9462.

- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A $\beta$ 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* 414:212-216.
- Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Golde TE, Koo EH (2003) A $\beta$ 42-lowering Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Preserve Intramembrane Cleavage of the Amyloid Precursor Protein (APP) and ErbB-4 Receptor and Signaling through the APP Intracellular Domain. *J Biol Chem* 278:30748-30754.
- Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R (2010) Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 13:190-196.
- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* 398:513-517.
- Wong GT, Manfra D, Poulet FM, Zhang Q, Josien H, Bara T, Engstrom L, Pinzon-Ortiz M, Fine JS, Lee H-JJ, Zhang L, Higgins GA, Parker EM (2004) Chronic Treatment with the  $\gamma$ -Secretase Inhibitor LY-411,575 Inhibits  $\beta$ -Amyloid Peptide Production and Alters Lymphopoiesis and Intestinal Cell Differentiation. *J Biol Chem* 279:12876-12882.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533-537.
- Yan XX, Li T, Rominger CM, Prakash SR, Wong PC, Olson RE, Zaczek R, Li YW (2004) Binding sites of  $\gamma$ -secretase inhibitors in rodent brain: distribution, postnatal development, and effect of deafferentation. *J Neurosci* 24:2942-2952.
- Younkin SG (1998) The role of A beta 42 in Alzheimer's disease. *J Physiol Paris* 92:289-292.