

博士論文

メマンチンのアミロイド β 産生機構および
凝集体形成に対する新奇薬理作用の解析

高橋 香織
(戸籍名：伊藤 香織)

目次

略語	3
序論	4 - 8
方法	9 - 21
結果	22 - 28
1. メマンチンの脳内 A β 量に対する作用の検証	
2. メマンチンの A β 低下作用の作用点	
2.1. A β 産生抑制作用	
2.2. A β 凝集抑制作用	
2.3. A β 凝集解離作用	
考察および今後の展望	29 - 37
謝辞	38
図表	39 - 67
参考文献	68 - 79

略語

Aβ	amyloid- β peptide
AD	Alzheimer's disease
APP	amyloid precursor protein
BACE	β -site APP cleaving enzyme
CAA	cerebral amyloid angiopathy
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate
CSF	cerebrospinal fluid
DIV	day <i>in vitro</i>
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DW	distilled water
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FAD	familial Alzheimer's disease
MCI	mild cognitive impairment
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
PBS	phosphate-buffered saline
SAD	sporadic Alzheimer's disease
sAPP	soluble amyloid precursor protein
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TBS	tris-buffered saline
TEM	transmission electron microscopy
ThT	Thioflavin T

序論

アルツハイマー病（以下 AD）は、認知症における割合が最も高く、記憶障害およびその他の知的活動能力の消失が認められる進行性の神経変性疾患である。現在まで根本的治療・予防法の開発に至っておらず、この状況が続けば AD 患者数の爆発的な増加が予想されており、大きな社会問題となっている。全世界で、AD 患者が 3 秒に 1 人の割合で増え続けており、2050 年には 1 億 5200 万人に増加すると予想されている（World Alzheimer Report 2018）。AD 治療に関する医療費は、現在 1 兆ドルで、2030 年までに 2 倍に達すると想定されている。1998 年以降、100 以上の新薬候補が臨床試験で評価されたが、わずか 4 剤しか承認されていない。認知症の適用で上市されている薬剤はアセチルコリンエステラーゼ阻害薬と N-Methyl-D-aspartate（以下 NMDA）受容体阻害薬であるが、これらは認知機能を一時的に改善する症状改善薬とされ、いずれも根本治療薬ではない（図表 1）。

AD では、病理学的な所見として、大脳新皮質や海馬を中心に、神経細胞の脱落による脳萎縮、アミロイド β タンパク質（以下 $A\beta$ ）を主構成成分とする老人斑の蓄積、リン酸化 tau タンパク質からなる神経原線維変化が認められるのが特徴である（Hardy and Selkoe, 2002; Haass, 2004）。

AD の患者のほとんどが孤発性（sporadic AD; 以下 SAD）であるが、amyloid precursor protein（以下 APP）や γ -secretase のサブユニットであるプレセニリン（以下 PS）に変異のある家族性 AD（familial AD; 以下 FAD）も存在する。一方で $A\beta$ を産生しにくい APP 変異（Icelandic 変異、A673T）を有する家系では認知症が発症しにくいことが報告されている（Jonsson et al., 2012）。さらに、第 21 番染色体のトリソミーであるダウン症患者の脳において、早期より老人斑の蓄積が見られることから、APP 遺伝子と AD との関連性が示唆される（Hartley et

al., 2015)。これらの知見から、脳における A β の産生、凝集および蓄積の異常が AD の発症に深く関与しているとする「アミロイド仮説」が支持されている (図表 2)。

A β は神経細胞障害性をもったペプチドである (Chen et al., 2000; Deshpande et al., 2006)。さらに、A β が凝集した可溶性 A β オリゴマーや不溶化した A β 線維も神経細胞障害性を持ち、神経細胞死を引き起こして認知機能障害につながると考えられている。そのメカニズムについてはさまざまな報告があるが、その一つとして、可溶性の A β オリゴマーが NMDA 受容体の活性を調節することで急性のシナプス障害を引き起こし、その結果神経回路を障害することが示唆されている (Lacor et al., 2007; Li et al., 2009; Palop and Mucke, 2010)。

A β は APP が切断されて産生される (図表 3)。APP には 2 つの異なる切断経路が存在する (Zhang et al., 2013)。APP が α -secretase に切断され、sAPP α を生成し、その後 γ -secretase に切断されて p3 を生成する「非アミロイド形成経路」と、APP が β -secretase に切断されて sAPP β を生成し、その後 γ -secretase に切断されて A β を生成する「アミロイド形成経路」である (Chow et al., 2010; Tomita, 2014)。細胞生物学的解析から、APP の小胞輸送が A β 産生の調節に関与することが明らかになっている (Jiang et al., 2014)。特に、細胞表面からの APP のエンドサイトーシスは、A β 生成において重要なプロセスである (Koo and Squazzo, 1994; Perez et al., 1999; Sannerud et al., 2011)。

A β は、カルボキシル末端 (以下 C 末端) の切断部位の違いにより A β 33 から 49 まで異なった分子種が存在していることが知られているが、主な分子種は A β 40 と A β 42 の 2 つである。A β 40 は優位に産生され、総 A β 量の 9 割近くを占めると考えられている (Suzuki et al., 1994; Asami-Odaka et al., 1995)。一方、A β 42 は、総 A β 量の約 1 割であるにも関わらず、A β 40 に比べて非常に凝集性が高く、

神経細胞傷害性も強いとされ、AD 患者の脳において発症初期から A β 42 が優位に蓄積することが知られている (Iwatsubo et al., 1994; Tomita et al., 1997; Selkoe and Hardy, 2016)。A β 43 は、A β 42 よりも強力な神経毒性や凝集性を発揮すること、A β 40 よりも高頻度で脳内に存在していることが報告されており (Saito et al., 2011)、SAD および FAD 患者の脳において A β 40 よりも多く蓄積することが報告されている (Iizuka et al., 1995; Parvathy et al., 2001; Welander et al., 2009)。

このように、分泌直後の A β は C 末端側で多様性を示すのに対して、アミノ末端 (N 末端) 側の構造は保存されている。しかし、AD 脳でアミロイド斑を構成する A β は N 末端側のアミノ酸残基が欠損、修飾もしくはその両方を受け、一次構造が異なる。そのうち、第 1、第 2 アミノ酸残基の切断と第 3 残基のグルタミン酸が環状構造にピログルタミル化を受けた 3pE 型 A β (以下 [Pyr3]-A β (3-42)) が量的に最も多いことが報告されている (Saido et al., 1995)。

また、FAD あるいは脳アミロイドアンギオパチー (cerebral amyloid angiopathy; 以下 CAA) において多くの APP 遺伝子変異が発見されている。APP 切断を変化させ、分泌 A β が増加する Flemish 変異 (A21G; Hendriks et al., 1992; Brooks et al., 2004; Tian et al., 2010)、A β 凝集しやすく細胞毒性の強い English 変異 (H6R; Janssen et al., 2003; Hori et al., 2007)、Arctic 変異 (E22G; Murakami et al., 2003; Nilsberth et al., 2001)、Dutch 変異 (E22Q; Levy et al., 1990; Wattendorff et al., 1982; Wisniewski et al., 1991) および Iowa 変異 (D23N; Grabowski et al., 2001; Van Nostrand et al., 2002)、CAA と関連のある Italian 変異 (E22K; Tagliavini et al., 1999) など、それぞれが含まれる。

非競合的 NMDA 受容体阻害剤であるメマンチンは、2002 年に欧州医薬品庁 (EMA)、2003 年に米国食品医薬品局 (FDA)、2011 年に独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA) より AD を適応症として承認され、販売が開始し

た。現在世界 70 カ国以上で主に中等度から高度 AD の治療薬として上市されている。AD 患者の病態形成においてはグルタミン酸神経系の機能異常が関与しており、グルタミン酸受容体のサブタイプである NMDA 受容体の過剰な活性化が原因の 1 つと考えられている。メマンチンは、選択的な NMDA 受容体拮抗作用を有し、受容体に対して低親和性で、結合および乖離速度が速く、膜電位依存的に作用する (Parsons et al., 1999)。また、興奮毒性による細胞内 Ca^{2+} の過剰な流入を抑制することで神経細胞を保護する一方、生理的なグルタミン酸神経活動には影響せず、過剰なグルタミン酸による神経細胞毒性および記憶・学習に深く関与する長期増強 (long-term potentiation; LTP) 形成障害に対して抑制作用を有することが示されている。さらに、メマンチンは $\text{A}\beta$ による有害な作用、例えば神経細胞の突起伸長の阻害 (Hu et al., 2007) やスパイン形成に関わる drebrin の消失 (Lambert et al., 2007) などを減弱させることが報告されている。ラット海馬に $\text{A}\beta$ 凝集体あるいはイボテン酸を投与することで生じる神経の傷害や学習障害をメマンチンが阻害する (Nakamura et al., 2006) こと、さらに、 $\text{A}\beta$ オリゴマーをラットに脳室内投与することによって生じる学習障害を改善し、ミクログリアの活性化を抑制し、コリン作動性神経線維を保護することも報告されている (Nyakas et al., 2011)。

近年、メマンチンが APP/PS1 Tg マウス (Scholtzova et al., 2008; Alley et al., 2010)、Tg2576 マウス (Dong et al., 2008)、APP_{SWE}、PS1_{M146V} および Tau_{P301L} の 3 つの認知症関連の遺伝子を発現させた 3xTg マウス (Martinez-Coria et al., 2010) などの AD モデル動物の脳内 $\text{A}\beta$ 量および蓄積を減少させることが報告され、メマンチンが脳内 $\text{A}\beta$ 量を減らすことによって、 $\text{A}\beta$ による神経細胞障害を軽減する可能性が示唆されている。臨床においては、メマンチンの治療介入は主に中等度以上の AD 患者を対象として行われ、その時点で患者の脳には $\text{A}\beta$ 沈着がすでに進行した状態にある。したがって、臨床に即してメマンチンの $\text{A}\beta$ 蓄積に対する治療効果を評価するためには、すでに沈着の始まった AD モデル動物に対するメ

マンチンの作用を検討することが望ましいが、これまでに報告されているのは、 $A\beta$ 沈着が始まる前からのメマンチン投与の有効性のみである。

また、これらの動物モデルを $A\beta$ 産生量が過剰である、いわば FAD のモデルと位置づけると、SAD を模倣した正常動物の加齢に伴う脳内 $A\beta$ 量の増加に対するメマンチンの作用については検討されていない。さらに、このようなメマンチンの脳内 $A\beta$ 量低下作用に関するメカニズムについて、統一した見解はない。

本研究では、まず、すでに脳内に $A\beta$ 蓄積の始まった AD モデル動物および正常加齢動物におけるメマンチンの脳内 $A\beta$ 量および蓄積に対する作用を検証した。さらに、そのメカニズムを明らかにすることを目的として、メマンチンの作用点として想定した「 $A\beta$ 産生阻害作用」、「 $A\beta$ 凝集抑制作用」、「 $A\beta$ 凝集解離作用」および「 $A\beta$ 分解促進作用」のうち、「 $A\beta$ 産生阻害作用」、「 $A\beta$ 凝集抑制作用」および「 $A\beta$ 凝集解離作用」についてそれぞれ検討した（図表 4）。

方法

被験物質およびその調製

本試験に用いた被験物質およびその供給元は以下の通りである。

- Memantine hydrochloride (第一三共プロファーマ株式会社)
- (+)-MK-801 hydrogen maleate (Sigma-Aldrich)
- D-AP5 (Tocris Bioscience)
- Amantadine hydrochloride (和光純薬工業株式会社)
- Methylene blue (和光純薬工業株式会社)

被験物質は大塚蒸留水 (以下 DW、株式会社大塚製薬工場) あるいは Dimethyl sulfoxide (以下 DMSO、和光純薬工業株式会社) にて溶解させて評価に用いた。

試薬の調製

- DMEM 培地

DMEM (high glucose, 和光純薬工業株式会社) に、ペニシリン 50 unit/mL、ストレプトマイシン 50 mg/mL (各 Invitrogen) および非働化ウシ胎児血清 (以下 FBS, Thermo Fisher Scientific) を 10% 添加して用いた。

- Neurobasal 培地

Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific) に、B-27 supplement (Thermo Fisher Scientific)、Penicillin-streptomycin (培地に対して 1/100 量, Thermo Fisher Scientific) および L-glutamine (最終濃度: 2 mM, Thermo Fisher Scientific) を添加して用いた。

- homogenization buffer

HEPES (最終濃度: 10 mM, DOJINDO)、NaCl (最終濃度: 150 mM, ナカライテスク株式会社)、Glycerol (最終濃度: 10%, 和光純薬工業株式会社)、protease inhibitor (Sigma-Aldrich) を DW に溶解した。

- 25 mM CH₃COONa

酢酸ナトリウム (関東化学株式会社) を DW に溶解し、酢酸 (和光純薬工業株式会社) で pH を 4.5 に調整した。

- TBS-T 溶液

TBS (タカラバイオ) を DW で溶解し、Tween 20 (最終濃度: 0.1%, Bio-Rad) を添加した。

- 1% CHAPSO/HEPES buffer

HEPES (最終濃度: 10 mM, pH 7.4, DOJINDO)、NaCl (最終濃度: 150 mM, 和光純薬工業株式会社)、protease inhibitor、CHAPSO (最終濃度: 1%, DOJINDO) を DW に溶解した。

- 1× γ -buffer

CHAPSO (最終濃度: 0.25%)、EDTA (最終濃度: 5 mM, DOJINDO)、1,10-phenanthroline (最終濃度: 4 mM, 和光純薬工業株式会社)、phosphoramidon (最終濃度: 10 mg/mL, ナカライテスク株式会社)、phosphatidylcholine (最終濃度: 0.1%, Avanti Polar Lipids, Inc.)、protease inhibitor を HEPES buffer に溶解した。

動物の入手および飼育条件

Tg2576 マウス (Hsiao et al., 1996) (Taconic Biosciences, Inc.)、F344/N Slc ラット (日本エスエルシー株式会社) および Slc:Wistar ラット (日本エスエルシー株式会社) を用いた。動物は一定の温度、湿度、明暗サイクルにて飼育し、飼料および水道水を自由摂取させた。本試験は、第一三共株式会社「動物実験に関する細則」および東京大学「動物実験実施マニュアル」に準拠して実施した。

Tg2576 マウスを用いたメマンチンの作用評価

9 ヶ月齢の雌性 Tg2576 マウスを、Pre 群 (N=5)、Vehicle 投与群 (N=24)、メマンチン 10 mg/kg/day 投与群 (N=24) および 20 mg/kg/day 投与群 (N=23) の 4 群に分けた。Pre 群は投与開始前の脳内 A β 量をはじめとする各種パラメーター測定のために設定した。投与液は、あらかじめ測定した平均飲水量より計算し、メマンチン投与量が 10 および 20 mg/kg/day となるように設定して、DW に溶解して調製した。メマンチン投与群には調製した溶液を、vehicle 群には DW を給水瓶に充填して自由摂取させた。給水瓶は週に 1 度交換し、重量を測定することで飲水量を計測し、投与量を算出した。Pre 群のマウスは投与開始前に、それ以外のマウスは投与開始から 1 ヶ月後に採材した。イソフルラン (ファイザー株式会社) 麻酔下で脳を摘出し、半球に分けてすぐに凍結させ、評価まで -80°C にて保存した。脳サンプルは、Protease inhibitor (Sigma-Aldrich) を含む 1% CHAPS (Sigma-Aldrich) 水溶液を 5 倍量 (v/w) 加えてホモジナイザー (NS-310E, Microtec Co., Ltd.) およびソニケーター (UR-20P, TOMY SEIKO CO., LTD.) で破碎し、遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) して上清を CHAPS 可溶性画分とした。沈渣に 9 倍量の 90% ギ酸 (キシダ化学株式会社) 水溶液を加えて再度破碎し、遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) して上清を得た。その上清に対し、39 倍量の 1M Tris (Sigma-Aldrich) 水溶液を添加して中和させ、遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) し、その上

清を CHAPS 不溶性画分とした。脳の CHAPS 可溶性画分、不溶性画分を各種パラメーターの測定に用いた。脳の可溶性画分および不溶性画分における A β 40 および A β 42、可溶性画分における A β オリゴマー、sAPP α および sAPP β は、市販 ELISA キットを用いて添付説明書に従って定量した。

加齢 F344 ラットを用いたメマンチンの作用評価

22 ヶ月齢の雄性 F344 ラットを、Vehicle 投与群 (N=4) およびメマンチン 10 mg/kg/day 投与群 (N=7) の 2 群に分けた。投与液は、あらかじめ測定した平均飲水量より計算し、メマンチン投与量が 10 mg/kg/day となるように設定して、DW に溶解して調製した。メマンチン投与群には調製した溶液を、vehicle 群には DW を給水瓶に充填して自由摂取させた。給水瓶は週に 1 度交換し、重量を測定することで飲水量を計測し、投与量を算出した。ラットは投与開始から 1 ヶ月後に、イソフルラン麻酔下でマイジェクター (29G, テルモ株式会社) を大槽に穿刺して脳脊髄液 (以下 CSF) を採取し、その後、腹大静脈より採血した。採取した CSF および血液は遠心 (9,000 g, 5 分間, 4°C) した後、上清を回収し、CSF および血漿サンプルとして評価まで -80°C にて保存した。採血後に放血により安楽死させた後、脳を摘出し、半球に分けてすぐに凍結させ、評価まで -80°C にて保存した。脳サンプルは、Protease inhibitor を含む 1% CHAPS 水溶液を 5 倍量加えてホモジナイザーで破碎し、遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) して上清を除いた。沈渣に 1% CHAPS 水溶液と同量の 70% ギ酸水溶液を加えて再度破碎し、遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) して上清を得た。その上清に対し、19 倍量の 1M Tris 水溶液を添加して中和させ、遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) し、その上清を CHAPS 不溶性画分とし、各種パラメーターの測定に用いた。脳の不溶性画分、CSF および血漿サンプル中における A β 40 および A β 42 は、市販 ELISA キットを用いて添付説明書に従って定量した。

H4 細胞を用いたメマンチンの作用評価

ヒト神経膠腫細胞株である H4 細胞 (DS ファーマバイオメディカル株式会社) は、DMEM 培地を用いて播種および継代した。A β 評価のため、96 well プレート (nunc F96 MicroWell™ Plates, Thermo Fisher Scientific) に細胞を 2×10^4 cells/well になるように播種し、CO₂ インキュベーター内で 5% CO₂、37°C の条件で培養した。播種の翌日、メマンチン (最終濃度: 3, 10 および 30 μ M) あるいは薬剤の溶媒である DW を添加した 0.1% FBS 添加 DMEM 培地に置換し、その 3 日後に培養上清を回収した。市販の ELISA キットを用いて、培養上清中の A β 40 および A β 42 を添付説明書に従って測定した。また、各酵素アッセイのために別途細胞を 150 mm dish (ASAHI GLASS CO.,LTD) に播種して回収し、既報 (Hashimoto et al., 2002; Takasugi et al., 2003) にて実施している方法に準じて膜画分を調製し、使用するまで -80°C で保存した。

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いたメマンチンおよび NMDA 受容体阻害薬の作用評価

初代培養大脳皮質神経細胞の培養は、既報 (Fukumoto et al., 1999; Suzuki et al., 2012) にて実施している方法に準じて行った。妊娠ラット (Slc:Wistar, 妊娠 18 日目) から胎仔を取り出し、氷冷 HBSS(-)培地 (和光純薬工業株式会社) に集めた。クリーンベンチ内に設置した実体顕微鏡 (Leica) 下で大脳皮質を分離し、HBSS(-)培地入りのチューブに集め、神経細胞分散液 (住友ベークライト) を用いて添付説明書に従って細胞を分散した。得られた細胞に DMEM 培地を添加して、Poly-L-Ornithine (Sigma-Aldrich) コートした 12 well プレートあるいは 100

mm ディッシュ (ASAHI GLASS CO.,LTD) に、 1×10^6 cells/well あるいは 6.5×10^6 cells/dish になるように播種し、CO₂ インキュベーター内で 5% CO₂、37°C の条件で培養した。播種の翌日 (day *in vitro*; DIV 1)、培地を神経細胞培養液 (住友ベークライト) に置換した。DIV 8 に培地をそれぞれメマンチン (最終濃度: 10 および 30 μ M)、D-AP5 (最終濃度: 10-100 μ M)、MK-801 (最終濃度: 1-10 μ M) あるいは薬剤の溶媒である DW を添加した神経細胞培養液に置換し、DIV 14 に培養上清および細胞を回収した。培養上清は遠心 (9,000 g, 5 分間, 4°C) して、その上清を回収し、市販の ELISA キットを用いて、A β 40、A β 42、sAPP α および sAPP β を添付説明書に従って測定した。細胞は、氷冷 Dulbecco's phosphate-buffered saline (以下 DPBS, Thermo Fisher Scientific) で洗浄し、スクレーパーを用いてディッシュから剥がし、その懸濁液を Immunoblot 法に用いた。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法

以下の市販キットを用いて、各種パラメーターを測定した。

- Human/Rat β Amyloid(40) ELISA Kit II (和光純薬工業株式会社)
- Human/Rat β Amyloid(42) ELISA Kit, High-Sensitive (和光純薬工業株式会社)
- Human sAPP α (highly sensitive) Assay Kit (IBL)
- Human sAPP β -w (highly sensitive) Assay Kit (IBL)
- Human sAPP β -sw (highly sensitive) Assay Kit (IBL)
- Mouse/Rat sAPP α (highly sensitive) Assay Kit (IBL)
- Mouse sAPP β -w Assay Kit (IBL)
- Human Amyloid β Oligomers (82E1-specific) Assay Kit (IBL)

吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e, Molecular Devices) を用いた。

Immunoblot 法

細胞の懸濁液を 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) を添加した Laemmli sample buffer (Bio-Rad) で溶解し、ソニケーターで破碎した後、10% ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にてタンパク質を分離した。サブマリン式転写装置を用いてゲル中のタンパク質を PVDF 膜 (Millipore) に転写 (250 mA, 2 時間, 4°C) し、膜を 5% スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) を含む TBS-T 溶液あるいは PVDF blocking reagent (TOYOBO) で blocking した後、TBS-T 溶液あるいは Can Get Signal Solution (TOYOBO) で希釈した一次抗体を処置し、4°C で一晩反応させた。TBS-T で洗浄後、2 次抗体を添加し、遮光室温下で 1 時間反応させた後、ODYSSEY (LI-COR Biosciences) を用いてバンドの検出および解析を行った。

使用した抗体は以下に示した。

一次抗体

- anti- β III-tubulin TuJ-1 (1:5,000 希釈; R&D systems, Cat No. MAB1195)
- anti-BACE1 BACE1c (最終濃度: 2 μ g/mL, IBL, Cat No. 18711)
- anti-APP APPc (最終濃度: 1 μ g/mL, IBL, Cat No. 18961)
- anti-nicastrin (1:1,000 希釈; Sigma-Aldrich, Cat No. N1660)
- anti-ADAM10 (最終濃度: 1 μ g/mL, Abcam, Cat No. ab1997)

二次抗体

- Alexa Fluor 680 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:10,000 希釈, Invitrogen)
- Alexa Fluor 680 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (1:10,000 希釈, Invitrogen)

同じ PVDF 膜を用いて別のタンパク質の検出を行う場合には、膜を室温で Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) に 15 分間浸し、再度 blocking した (1 時間, 室温)。その後 1 次抗体を反応させた。

なお、分子量マーカーには precision plus dual color standards (Bio-RAD) を用いた。

***In vitro* α -secretase assay**

既報 (Takasugi et al., 2011) に準じて行った。市販キット (SensoLyte 520 TACE (α -Secretase) Activity Assay Kit, Anaspec, Inc., Cat No. 72085) を用い、添付説明書に従って H4 細胞から膜画分を調製した。黒色 96 well プレート (Corning Inc., Cat No. 3915) に、DMSO に溶解したメマンチン (最終濃度: 1-100 μ M) あるいは TAPI-0 (キット付属の陽性対照物質, 最終濃度: 10 μ M) を添加し、control well には DMSO を同量添加した (N=2)。その際、最終 DMSO 濃度は 0.1% とした。続いて調製した膜画分を添加し、10 分間室温にて反応させた。TACE 基質を加えてよく混和して、30 分間室温でインキュベートした後、蛍光強度をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e, Molecular Devices) を用いて測定した (excitation; 以下 ex. 490 nm, emission; 以下 em. 520 nm)。それぞれの蛍光値から blank well (キット付属の buffer のみ添加した well) の蛍光値を差し引いて個々の蛍光強度の値とし、control に対する割合 (% of control) で示した。

***In vitro* β -secretase assay**

既報 (Takasugi et al., 2011) に準じて行った。H4 細胞を homogenization buffer を添加してホモジナイザーで破碎した後に遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) し、沈殿した膜画分を得た。膜画分は、市販キット (BCA Protein Assay Kit, Pierce) を

用いてタンパク定量した。膜画分に氷上でタンパク濃度が 0.5 mg/mL となるように 10 mM Tris/HCl (pH 7.0, Sigma-Aldrich)を加えて調製した。メマンチン (最終濃度: 1-100 μ M)、BACE inhibitor IV (陽性対照物質, 最終濃度:10 μ M, CALBIOCHEM) あるいは薬剤の溶媒である DMSO を 25 mM CH₃COONa に添加し (最終 DMSO 濃度: 0.1%)、黒色 96 well プレートに 100 μ L ずつ添加した (N=3)。その際、blank well には 25 mM CH₃COONa を同量添加した。調製した膜画分を 50 μ L ずつ添加し、30 分間氷上で反応させた。基質として JMV2236 (最終濃度: 10 μ M, BACHEM) を 50 μ L ずつ添加し、37°C でインキュベートを開始し、3 時間後に蛍光強度をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e, Molecular Devices) で測定し (ex. 320 nm, em. 430 nm)、それぞれの蛍光強度から blank well の蛍光値を差し引いて個々の蛍光強度の値とし、control に対する割合 (% of control) で示した。

***In vitro* γ -secretase assay**

既報 (Takahashi et al., 2003) に準じて評価した。H4 細胞を homogenization buffer を添加してホモジナイザーで破碎した後に遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) し、沈殿した膜画分を得た。膜画分は、市販キットを用いてタンパク定量した。膜画分に 1% CHAPSO/HEPES buffer を添加して可溶化し、再度遠心 (100,000 g, 1 時間, 4°C) して上清を酵素画分として用いた。大腸菌由来精製リコンビナント C100-FmH (最終濃度: 1 μ M)、酵素画分 (最終濃度: 250 μ g/mL) および 1 \times γ -buffer を、化合物もしくは薬剤の溶媒である DMSO (control) とともに 37°C で 24 時間インキュベートした (N=2)。化合物は、メマンチン (最終濃度: 1-100 μ M) あるいは陽性対照として L-685,458 (最終濃度: 10 nM, Sigma-Aldrich) を用いた。非特異的な A β 産生を差し引くため、control 群と同様の反応を 4°C で 24 時間インキュベートした (t_0 , N=2)。5 分間 100°C で boil して反応を止め、サンプルを遠心

(20,000 g, 10 分間, 4°C) し、上清を得た。上清中の A β 40 および A β 42 を市販 ELISA キットにて定量した。個々の測定値から t₀ の平均値を差し引いて、control に対する割合 (% of control) で示した。

細胞表面ビオチン化アッセイ

既報 (Kanatsu et al., 2014) に準じて評価した。アッセイの模式図を図表 14 に示した。初代培養大脳皮質神経細胞を播種し、DIV 1 に、神経細胞培養液で培地を置換した。DIV 8 あるいは 14 にメマンチン (最終濃度: 10 あるいは 30 μ M) あるいは DW (control) を添加した神経細胞培養液に置換し、その 2 時間後に氷冷 PBS (Thermo Fisher Scientific) で 2 回洗浄した後、細胞膜透過性のない Sulfo-NHS-SS-Biotin (1 mg/mL in PBS, Thermo Fisher Scientific) を添加して 30 分間氷上でインキュベートした。氷冷 0.1 M glycine (0.1 M in PBS, Sigma-Aldrich) で 3 回、PBS で 2 回洗浄して余分な biotin を除去した後、細胞をスクレーパーで剥がし、細胞を回収した。遠心 (9,000 g, 5 分間, 4°C) して上清を除き、ペレットに 1% SDS (Bio-Rad) /PBS を 1 mL 添加してソニケーターで破碎した。市販キットを用いてタンパク定量し、すべてのサンプルを同じ濃度に合わせた。サンプルの一部を分取し、2-mercaptoethanol 添加した Laemmli buffer を加えて 1 分間 100°C で boil し、input サンプルとして評価まで -20°C で保存した。残りのサンプルに、予め 1% SDS/PBS で平衡化した Streptavidin beads (GE ヘルスケアバイオサイエンス) を添加し、12 時間以上転倒混和した。サンプルを遠心 (9,000 g, 1 分間, 室温) し、ビーズを 1% SDS/PBS で 3 回洗浄し、残ったビーズに 2-mercaptoethanol 添加 Laemmli buffer を加えて 3 分間 boil し、pull-down サンプルとした。調製した input および pull down サンプルを Immunoblot 法にて検出した。検出されたバンドをそれぞれ定量し、pull-down/input 比 (細胞表面上の APP あるいは BACE の割合) を算出し、control に対する割合で示した。

A β ペプチド溶液の調製

A β ペプチドの凝集性に関して、使用した A β ペプチドは図表 25 に一覧を示した。すべて Anaspec, Inc.より入手した。DW にて溶解させて 100 μ M に調製し、ストック溶液として使用するまで-20°C で保存した。

Thioflavin (ThT) assay

各種 A β ペプチドの凝集性に関して、ThT assay を用いて評価した。A β ストック溶液を DPBS で希釈し、速やかにソニケーターで破碎した。A β 溶液を黒色 96 ウェルプレート (Corning Inc., Cat No. 3915) に添加し、control well と blank well には DW を同量添加した。凝集阻害作用の検討の際には、各化合物溶液もしくは DW (control および blank well) に添加した。プレートを攪拌した後、プレートをシール (Applied Biosystems) し、37°C で 24, 72 あるいは 144 時間反応させた。凝集乖離作用の検討の場合は、A β 溶液を 37°C で 72 時間反応させた後に各化合物溶液あるいは DW を添加し、よく攪拌し、37°C で 24 時間反応させた。反応後、自家蛍光をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M2e, Molecular Devices) を用いて測定した (ex. 442 nm, em. 485 nm)。全 well に pH 8.5 に調整した 100 mM glycine (Sigma-Aldrich) -NaOH (ナカライテスク株式会社) で希釈した ThT 溶液 (最終濃度: 3 μ M) を添加して攪拌し、室温で 30 分間反応させた後、蛍光強度を測定した (ex. 442 nm, em. 485 nm)。その蛍光強度から自家蛍光の値を差し引いて、個々の蛍光強度の値とした。

Dot blot 法

メマンチンの A β 42 オリゴマーの形成に対する作用を検討する目的で、ThT assay と同様に処置した A β 溶液を用いて dot blot 法により評価を行った。各溶液を 5 μ L 分取し、ニトロセルロース膜 (0.45 μ m, Bio-Rad) に約 1 cm 間隔でスポット状に添加した。膜を blocking した後、1 次抗体として Anti-A β antibody (6E10, 1:2,000 希釈, abcam) あるいは Anti-A β antibody (11A1, 1:400 希釈, IBL) を添加し、室温で 2 時間反応した。2 次抗体として Alexa Fluor 680 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (1:10,000 希釈) を添加し、室温で 1 時間反応した後、ODYSSEY で各 dot の検出および蛍光強度の定量を行った。化合物未添加の A β 42 溶液群の蛍光強度の平均値に対する各 dot の蛍光強度の割合 (% of control) を算出し、評価した。

透過電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy; TEM) 法

メマンチンの A β 凝集に対する作用を視覚的に確認するため、透過電子顕微鏡を用いて凝集の形態を観察した。凝集阻害作用検討の場合、ヒト A β (1-42)溶液 (最終濃度: 5 μ M) をメマンチン溶液あるいは DW とともに 37°C で 72 時間反応させた。凝集解離作用の評価では、ヒト A β (1-42)溶液 (最終濃度: 1 μ M) を 37°C で 72 時間反応させた後にメマンチン水溶液あるいは DW を添加し、さらに 37°C で 24 時間反応させた。観察にはネガティブ染色法を用いた。すなわち、支持膜 (日新 EM 株式会社) を張った VECO グリッド 400 メッシュ (以下グリッド, 日新 EM 株式会社) を、イオンコーター (IB-3, 株式会社エイコー) で予め親水化処理した。支持膜を張ったグリッドにメマンチンと反応させた A β サンプルを載せて 10 分間静置し、膜面に吸着させた。その後、2% リンタングステン酸水溶液で染色し、自然乾燥させた後、透過電子顕微鏡 (H-7500, 日立製作所) を用いてサンプルを観察した。

A β 凝集体による細胞傷害性評価

メマンチンが A β 凝集形成を阻害することによって A β 凝集体の神経細胞傷害性に変化が生じるかを調べるため、メマンチン水溶液あるいは DW にヒト A β (1-42)溶液を最終濃度が 5 μ M となるように添加し、37°C で 72 時間反応させた。メマンチン自身もつ神経保護作用の影響を除くため、透析によって反応液からメマンチンを除去した。化合物と反応させた A β 溶液の一部を透析前溶液として 4°C で保存した。残りの溶液を Tube-O-DIALYZER (G-Biosciences) を用いて、添付説明書に従い、DW で 2 倍希釈した PBS で透析した。ThT assay を実施し、透析の前後で蛍光強度が変わらないことを確認した。

ラット初代培養神経細胞の培養は、以下のように行った。ラット大脳皮質神経細胞 CX(R) (DS ファーマバイオメディカル株式会社) を神経細胞分散液の添付プロトコールに従って分散し、DMEM 培地で調製して細胞数が 6×10^4 cells/well になるように Poly-L-lysine コートプレート (ASAHI GLASS CO.,LTD) に播種し、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。DIV 1 および DIV 8 に、Neurobasal 培地に交換した。DIV 16 に透析した A β (最終濃度: 0.5 μ M) を添加した Neurobasal 培地に置換した。24 時間後、Alamar Blue (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞生存率 (% of control) を調べた。

統計解析

本試験で算出されたデータは、平均値 \pm 標準誤差 (SEM) で示した。SAS System Release 8.2 (SAS Institute, Inc.) を用いて、t 検定もしくは Dunnett 型多重比較検定により、化合物各濃度群を対照群と比較した。

結果

1. メマンチンの脳内 A β 量に対する作用の検証

Tg2576 マウスにおける脳内可溶性 A β および不溶性 A β に対するメマンチンの 1 ヶ月間飲水投与による作用

Tg2576 マウスは、APP_{SWE} を過剰に発現するトランスジェニックマウスであり (Hsiao et al., 1996)、A β 産生量が過剰である FAD のモデルと位置づけられる。FAD モデルの脳内 A β 量におけるメマンチンの作用を確認するため、9 ヶ月齢の雌性 Tg2576 マウスを用い、メマンチンを 1 ヶ月間投与した際の A β 量に対する影響を調べた。平均体重および飲水量は、1 ヶ月の投与期間を通して群間で差はなかった (図表 5)。体重および飲水量から算出されたメマンチンの推定投与量は、8.8 および 16.1 mg/kg/day であった。Vehicle 群の脳における不溶性 A β 40 および A β 42 量は、投与開始前 (Pre 群) と比較して 1 ヶ月間で増加した。しかし、メマンチンはいずれの用量においても、vehicle 群と比較して、脳における不溶性 A β 40 および不溶性 A β 42 のいずれの増加も抑制した (図表 6A および 6B)。メマンチンはまた、脳内の可溶性 A β 40、A β 42、A β オリゴマー、sAPP α および sAPP β の量を、いずれも有意かつ用量依存的に減少させた (図表 6C-G)。

加齢 F344 ラットにおける脳内、CSF 中および血漿中 A β 量に対するメマンチンの 1 ヶ月間飲水投与による作用

次に加齢に伴い、脳内に内因性の A β 蓄積が観察される F344 ラットを SAD モデルと位置づけ、SAD モデルの脳内 A β 量の増加に対するメマンチンの作用を検討した。22 ヶ月齢の雄性 F344 ラットを用い、メマンチンの A β 量に対する作

用を検討した。メマンチンの 1 ヶ月投与による平均体重または飲水量への影響は認められなかった (図表 7)。実際の飲水量より計算されたメマンチンの推定投与量は 7.8 mg/kg/day であった。メマンチンは脳内の不溶性 A β 42 量を有意に減少させた (図表 8B)。また、統計学的に有意ではなかったが、メマンチン投与によって脳内、CSF 中および血漿中 A β 40 および CSF 中 A β 42 の低下傾向が認められた (図表 8A および C-F)。

2. メカニズム解析

2.1. A β 産生阻害作用

ラット初代培養大脳皮質神経細胞の A β および sAPP に対するメマンチンの作用

メマンチンによる A β 量の低下のメカニズムを明らかにするために、メマンチンがラット初代培養大脳皮質神経細胞で A β のレベルを低下させるかどうかを検討した。神経細胞に、DIV 8 から 7 日間、培地交換を行わずにメマンチン (10 および 30 μ M) を曝露した。培養上清中の A β 40、A β 42、および sAPP β 量は、メマンチンによって有意かつ用量依存的に減少した (図表 9)。また、メマンチン 30 μ M 曝露により、sAPP α 量の有意な減少が観察された。本実験において、メマンチン曝露が細胞生存率には影響しないことを確認した (データ示さず)。しかし、APP、 α -secretase (ADAM10)、 β -secretase (BACE1)、または γ -secretase (Nicastrin; Nct) のタンパクレベルでの発現量に変化は認められなかった (図表 10)。

メマンチンの α -secretase、 β -secretase および γ -secretase の酵素活性に及ぼす影響

メマンチンの $A\beta$ 産生に対する作用が、APP 切断酵素である α -secretase、 β -secretase および γ -secretase の酵素活性を調節することによるものかどうかを検討した。H4 細胞にメマンチン (3-30 μ M) を曝露すると、培養上清中の $A\beta$ 量は減少することが確認された (図表 11) が、H4 細胞の膜面分に、1-100 μ M のメマンチンを作用させても、いずれの酵素活性も変化しなかった (図表 12A)。また、メマンチンの長期曝露がこれら酵素活性に与える影響を調べるため、メマンチン (20 mg/kg/day) を 1 ヶ月間投与した Tg2576 マウスの脳サンプルを用いて同様の評価を行ったが、vehicle 投与マウスとメマンチン投与マウスとの間で、酵素活性に差は認められなかった (図表 12B)。

メマンチンによる $A\beta$ 産生抑制作用への NMDA 受容体の関与

本研究で観察された APP 代謝に対するメマンチンの作用が NMDA 受容体を介しているか否かを明らかにするために、メマンチンと別の NMDA 受容体阻害剤である D-AP5 および MK-801 のラット初代培養大脳皮質神経細胞に対する効果を調べた。メマンチン (3-30 μ M) は、 $A\beta_{40}$ および $A\beta_{42}$ のいずれも用量依存的に減少させた。D-AP5 (10-100 μ M) および MK-801 (1-10 μ M) もまた $A\beta$ 量を減少させたが、十分に NMDA 受容体を阻害する濃度においてもその効果はメマンチンより弱く、限定的であった (図表 13)。

ラット初代培養大脳皮質神経細胞における APP および BACE の細胞内輸送に対するメマンチンの作用

メマンチンが APP または BACE1 のエンドサイトーシスに影響するかどうかを明らかにするため、既報に準じて細胞表面ビオチン化アッセイを行った (Kanatsu et al., 2014)。DIV 8 および DIV 14 のいずれにおいても、メマンチン曝露により、APP の総量 (input) を変化させることなく、細胞表面でのビオチン化 APP 量 (pull-down) が有意に増加することを見出した。一方で、総 BACE1 量と細胞表面の BACE1 量は、対照細胞とほぼ同等であった (図表 15 および 16)。

ここまでの研究成果は原著論文「Memantine reduces the production of amyloid- β peptides through modulation of amyloid precursor protein trafficking. *Eur J Pharmacol.* 798,16–25, (2017)」として発表した。

2.2. A β 凝集阻害作用

ThT assay を用いた A β 凝集形成に対するメマンチンの作用評価

A β 凝集形成に対するメマンチンの作用を評価するための最適条件を見出す目的で、ヒト A β (1-42) (最終濃度: 1、3 および 5 μ M) の ThT 蛍光強度を反応後 144 時間までトラッキングした。ThT 蛍光強度は、A β 濃度依存的に増加し、いずれの濃度においても反応 72 時間後には平衡状態に達することが確認された (図表 19A)。そこで、A β 濃度 1 μ M という条件を選択し、メマンチンの A β 凝集形成に対する作用を評価した。メマンチンは 0.1 から 3 mM において濃度依存的に A β 凝集の形成を抑制した (図表 19B)。その作用は、反応 24 時間後から観察され、144 時間後まで持続した。A β 凝集抑制作用が報告されているメチレンブルー (Taniguchi et al., 2005) とメマンチンと同じアダマンタン骨格を有する NMDA 拮抗薬のアマンタジン (図表 20) について反応 72 時間後における作用を評価したところ、メマンチン (0.1 および 0.3 mM) とメチレンブルー (3 μ M) は有意に

A β 凝集形成を抑制したのに対し、アマンタジンはメマンチンが反応する濃度においても A β 凝集形成抑制作用は認められなかった（図表 21）。

TEM 観察による A β 凝集形成に対するメマンチンの作用評価

メマンチンの A β 凝集に対する作用を視覚的に確認するため、ヒト A β (1-42)（最終濃度: 5 μ M）をメマンチン（0.3-3 mM）あるいは DW（コントロール）と反応させ、その構造変化を TEM で観察した。コントロールサンプルでは多くの長い線維状の A β 凝集体が観察された。それに対し、メマンチンでは長い線維状 A β が減少した（図表 22）。

A β オリゴマー形成に対するメマンチンの作用

メマンチンの A β 42 オリゴマー形成に対する作用を評価するため、メマンチンと反応させた A β 溶液を、6E10（A β モノマー、オリゴマーともに認識）および 11A1（オリゴマーを特異的に認識）の 2 種類の抗 A β 抗体を用いて、dot blot 法により評価した。メマンチン、アマンタジンおよびメチレンブルーはいずれも 6E10 抗体で検出される A β に対して変化させることはなかった（図表 23A および 23B）。メマンチンおよびメチレンブルーは 11A1 抗体で検出される A β オリゴマー量を有意に減少させたが、アマンタジンは変化させなかった（図表 23A および 23C）。

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いた A β 凝集体による細胞傷害性に対するメマンチンの作用

メマンチンが A β 凝集形成を阻害することによって A β 凝集体の神経細胞傷害性に変化が生じるかを調べるため、ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて検討した。ヒト A β (1-42) (最終濃度: 5 μ M) とメマンチン (最終濃度: 1 mM) あるいは DW を 72 時間反応させた後、メマンチン自体の持つ神経細胞保護作用の影響を除くため、透析により反応液中のメマンチンを除いた。透析操作が A β 凝集体に影響しないことを ThT assay によって確認した (図表 24A)。神経細胞 (DIV 16) に透析した A β を添加し、その 24 時間後に Alamar blue を用いて生存率を評価した。DW と反応させた A β 凝集体では神経細胞の生存率は低下したが、メマンチンと反応させた A β 凝集体ではそれに比べて生存率が有意に高く、細胞傷害性が減弱していることが明らかとなった (図表 24B)。

種々の A β 凝集形成に対するメマンチンの作用

ヒト A β (1-42)以外の種々の A β の凝集形成においてもメマンチンが影響するかどうかを調べるため、種の異なるマウス A β 、AD 患者脳で認められる [Pyr3]-A β (3-42)、早期発症 FAD と関連のある変異 A β 、および N 末端あるいは C 末端の長さの異なる A β を用いて、その凝集形成に対するメマンチンの作用を ThT assay で評価した。用いた各種 A β のコントロール群の ThT 蛍光強度の平均値を図表 25 に示すが、いずれの A β ペプチドについても凝集体を形成することが確認された。メマンチン (最終濃度: 0.1-1 mM) は、これらいずれの A β の凝集に対しても有意かつ濃度依存的に阻害を示した (図表 26)。

2.3. A β 凝集解離作用

ThT assay および TEM 観察による A β 凝集体に対するメマンチンの作用評価

すでに形成された A β 凝集に対してもメマンチンが影響を与えるかどうかを調べるため、ヒト A β (1-42) (最終濃度: 3 μ M) を 37°C で 72 時間反応させ、凝集体を形成させた後に、メマンチン、アマンタジンあるいはメチレンブルーを添加し、さらに 24 時間反応させた。メマンチン (最終濃度: 1 および 3 mM) およびメチレンブルー (最終濃度: 0.3-3 μ M) はあらかじめ形成された A β 凝集の ThT 蛍光強度を有意かつ濃度依存的に減少させたが、アマンタジンは同じ濃度域において作用を示さなかった (図表 27)。また TEM 観察により、メマンチン添加によって濃度依存的に A β 線維の数が減少していることを確認した (図表 28)。

ここまでの研究成果は原著論文「Memantine inhibits β -amyloid aggregation and disassembles preformed β -amyloid aggregates. *Biochem Biophys Res Commun.* 493(1),158–163, (2017)」として発表した。

考察

本研究では、すでに脳内に A β 蓄積が認められる APP トランスジェニックマウスを FAD モデル、正常加齢 F344 ラットを SAD モデルと位置づけ、これらの AD モデルにおける脳内 A β 量および蓄積に対するメマンチンの作用を確認するとともに、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。メマンチンの作用点として想定される作用のうち、「A β 産生阻害作用」、「A β 凝集抑制作用」および「A β 凝集解離作用」についてそれぞれ検討した。

まず、FAD モデルの脳内 A β 蓄積に対するメマンチンの作用を評価すべく、Tg2576 マウスを用いた。Tg2576 マウスは、Swedish 変異 (KM670/671NL) を有する APP の突然変異型 (isoform 695) を過剰発現させた AD の動物モデルの 1 つであり (Hsiao et al., 1996)、6 ヶ月齢から A β 産生が増加し、9-12 ヶ月齢には脳内アミロイド斑の蓄積が認められる (Kawarabayashi et al., 2001)。臨床においては、メマンチンの治療介入は中等度以上の AD 患者で行われており、その時点で患者の脳には A β 沈着がすでに認められている。したがって、メマンチンの A β 蓄積に対する治療効果を実臨床に即して評価するためには、すでに沈着の始まった月齢の Tg2576 マウスを用いる必要があると考える。一方、これまでに報告されている AD モデルを用いた評価は、A β 沈着が始まる前からメマンチンを投与している。Tg2576 マウスにおいて、雄性マウスと比較して雌性マウスのほうが脳において早く A β 沈着が起こることが報告されている (Callahan et al., 2001) ことから、我々は脳内 A β 蓄積に対するメマンチンの治療効果を、すでに沈着が始まった月齢で、かつ短期間で評価するため、9 ヶ月の雌性 Tg2576 マウスに対してメマンチンを 1 ヶ月間投与してその有効性を検討することとした。

メマンチン (10 および 20 mg/kg/day) の 1 ヶ月間の投与によって、すでにアミロイド斑が形成されたマウスの脳における不溶性 A β 量の増加を抑制するこ

とが示された。この結果は、アミロイド斑が観察されない3ヵ月齢の Tg2576 マウスへのメマンチン投与が予防効果を有することを示すこれまでの報告 (Dong et al., 2008) と類似している。以上の結果から、メマンチンは A β 沈着が始まる前からの予防的投与のみならず、すでに沈着し始めてからの治療的投与によっても、脳内 A β 蓄積の進行を止める可能性が示唆される。

また、メマンチンは Tg2576 マウスの脳内 A β オリゴマー量の増加も抑制した。A β オリゴマーは、モノマーに比べて細胞障害性が強く、AD 発症に関与することが報告されている (Shankar et al., 2008)。メマンチンが FAD モデルにおける脳内の不溶性 A β および A β オリゴマー量を低下させることが示されたことから、FAD 患者において、それらの毒性を減弱させる病態改善作用を示すことが示唆される。

さらに、我々は加齢に伴って脳内での内因性 A β の蓄積が認められる F344 ラットにおけるメマンチンの作用を検討した。これまでに FAD モデル動物におけるメマンチン投与の有効性は報告されているが、正常動物の加齢に伴う脳内 A β 量蓄積に対する作用は検討されていない。F344 ラットは、加齢に伴って記憶障害が起こること (Kikusui et al., 1999)、22 ヶ月齢以上になると脳内に不溶性 A β 42 が有意に増加することから、遺伝的要因に起因しない SAD 患者に類似した特徴を有していると考えられている (Takahashi et al., 2010)。そこで、我々は正常動物の加齢に伴う A β 量増加に対するメマンチンの作用を検討するため、22 ヶ月齢の F344 ラットを用いることとした。

メマンチン (10 mg/kg/day) の1ヶ月投与によって、加齢 F344 ラットの脳における不溶性 A β 42 量は有意に減少した。本結果は、メマンチンが FAD 患者とみならず、SAD 患者においても脳内の A β の蓄積を減少させる可能性を示唆している。SAD 患者数は圧倒的に多く、AD 全体の約9割を占める。また、高齢化

が進むほど SAD 患者数が増加し、AD 患者における割合が大きくなると予測される (Bekris et al., 2010)。つまり、メマンチンは脳内 A β の蓄積を減少させ、その病態を改善することで、発症の早い FAD 患者および今後も増加するであろう SAD 患者のいずれに対しても、良好な治療オプションとなることが期待される。

次に、メマンチンの脳内 A β 沈着量の減少の作用メカニズムの解明に取り組んだ。作用点として想定した「A β 産生阻害作用」、「A β 凝集抑制作用」、「A β 凝集解離作用」および「A β 分解促進作用」のうち、「A β 産生阻害作用」、「A β 凝集抑制作用」および「A β 凝集解離作用」についてそれぞれ検討した。

先述の Tg2576 マウスにおいて、脳内の可溶性 A β 量も減少していたことから、A β の産生機構に何らかの影響を及ぼしている可能性があると考え、まず、A β 産生を阻害する可能性に焦点を当てた。ラット初代培養大脳皮質神経細胞にメマンチンを 10 および 30 μ M で曝露させると、神経細胞の培養上清中の A β レベルを用量依存的に有意に減少させた。しかし、メマンチンは、その細胞における、APP やその切断酵素である α -secretase、 β -secretase および γ -secretase の発現量には影響しなかった。さらに、H4 細胞を用いた *in vitro* 評価において、メマンチンは培養上清中の A β 量は低下させるものの、その細胞におけるいずれの APP 切断酵素の活性にも影響を与えなかった。メマンチンを 1 ヶ月間投与し、実際に A β 量の減少が認められた Tg2576 マウスにおいても、その脳の細胞膜画分の各酵素の切断活性に影響がなかった。これらの結果から、メマンチンが各酵素に対する直接的あるいは間接的な活性化作用や阻害作用を有していないことが示された。

次に我々は、メマンチンの APP 細胞内輸送に対する作用についても検討することとした。ここまでの研究で得られた結果から、メマンチンが APP および APP 切断酵素の発現量や APP 切断酵素の活性を変化させることなく、A β 量を低下さ

せることが示されたため、メマンチンの A β 低下作用は、APP あるいは BACE の細胞内輸送の変化を介したものであるという仮説を立てた。

ラット初代培養大脳皮質神経細胞を用いて、DIV 8 あるいは DIV 14 にメマンチン (10 あるいは 30 μ M) を 2 時間曝露させたところ、APP の総量を変化させることなく、細胞表面の APP 量が有意に増加した。一方で、BACE1 の総量と細胞表面量は変化がなかった。

APP および BACE の細胞内輸送の模式図を図表 17 に示す。細胞表面 APP の大部分は、非アミロイド形成経路を介してクリアランスされるが、A β の生成および分泌には細胞表面 APP の内部移行およびリサイクリングが必要である (Koo et al., 1994)。APP と BACE1 はともに Rab GTPase 5 陽性の初期エンドソームに運ばれる (Rajendran et al., 2006)。しかし、両タンパクの輸送経路は別々に制御されている。すなわち、APP のエンドサイトーシスは、クラスリン依存性であり、そのアダプタータンパク質複合体 AP-2 および Dab2 がリクルートされることによって起こる。一方、BACE は、ADP-リボシル化因子-6 (ARF6) によって制御される経路を介して内部移行し、初期エンドソームに運ばれる (Nordstedt et al., 1993; Lee et al., 2008; Sannerud et al., 2011)。我々は、メマンチンが BACE1 に影響を及ぼすことなく、細胞表面で APP の量を有意に増加させることを示した。これは、メマンチンが APP エンドサイトーシスに特異的に抑制し、エンドソームでの β -secretase による切断を減少させる可能性を示唆している (図表 18)。

これまでに APP および BACE は神経活動誘導の際に共局在することが報告されている (Kamenetz et al., 2003; Das et al., 2013)。グリシンによるニューロンの刺激は、APP/BACE の共局在の有意な増加をもたらすが、ニューロンとメマンチンあるいは D-AP5 とをあらかじめ反応させることにより、曝露後 30 分以内に NMDA 受容体経路を介してこの共局在化が阻害される (Das et al., 2013)。ここ

で報告されているメマンチンの APP/BACE の共局在化の阻害は、本研究において我々が見出した、メマンチンによる APP エンドサイトーシスの阻害を介した β -secretase 切断抑制メカニズムを支持するものである。

一方、本研究でのラット初代培養大脳皮質神経細胞に対する 7 日間の曝露実験においては、D-AP5 や MK-801 は $A\beta$ レベルを低下させたものの、その作用は限定的であった。すなわち、メマンチンの長期投与による $A\beta$ 産生抑制作用は主に NMDA 受容体非依存的な作用である可能性が高いことを示唆している。これは、NMDA 受容体活性が検出されない SK-N-SH 細胞においても、メマンチンが $A\beta$ 量を低下させるという報告とも一致する (Pizzi et al., 2002; Alley et al., 2010)。メマンチンの長期投与は、NMDA 受容体経路とは独立して、クラスリン依存性エンドサイトーシスおよび APP の細胞内局在化に影響を及ぼす可能性がある。

特筆すべき点として、*in vitro* および *in vivo* でのメマンチン処置後の sAPP α および sAPP β 産生の減少が観察された。BACE 遺伝子欠失または低分子化合物による BACE 活性阻害により、ニューロンにおける sAPP β が減少し、sAPP α が増加することが知られている (Colombo et al., 2013) ことから、メマンチンが単に APP 代謝や APP 切断酵素阻害を介して作用するのではなく、細胞内輸送といった細胞の機能に影響を与えることが示唆される。

以上より、我々のデータおよび先行研究から、メマンチンが NMDA 受容体依存性および非依存性の両経路を介して APP および BACE の共局在に影響を与え、その結果として $A\beta$ 産生を制御しうることが示唆された。メマンチンの APP 細胞内輸送の制御に関して、より詳細な分子メカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

本研究では A β 産生阻害作用のほかに、A β 凝集に対する作用についても検討した。ThT assay および TEM 観察により、メマンチンがヒト A β (1-42)の凝集形成を阻害するだけでなく、すでに形成された A β 線維を解離することを示した。さらに、dot blot 法を用いた解析から、A β オリゴマーの形成も阻害していることを示した。以上の結果から、メマンチンは A β 線維およびオリゴマーの形成を直接阻害する可能性があり、我々は、これらの作用もまた、メマンチンの脳内 A β 蓄積減少の作用メカニズムであると考えている。

これまでの様々な研究から、A β 凝集過程は N 末端の長さ、C 末端の長さ、転写後修飾あるいはアミノ酸配列により影響を受けることが知られている。そのため、様々な分子種の A β ペプチドを用いてメマンチンの凝集抑制作用を調べることで、その作用点を限定できると考え、種の異なるマウス A β 、AD 患者脳で認められる [Pyr3]-A β (3-42)、FAD と関連のある変異 A β 、および N 末端あるいは C 末端の長さの異なる A β といった種々の A β ペプチドを用いて、様々な A β 凝集形成に対するメマンチンの作用を評価した。その結果、メマンチンはヒト A β (1-42)だけでなく、マウス A β 、[Pyr3]-A β (3-42)を含め、評価したいずれの A β ペプチドの凝集体の形成も阻害した。これらの結果は、メマンチンが A β 変異のアミノ酸配列の違いによらず、その凝集を阻害することを示唆する。注目すべき点として、メマンチンは、[Pyr3]-A β (3-42)と D23N A β の凝集形成に対して作用は弱かった。このことから N 末端と配列の 23 番目のアスパラギン酸残基が、A β オリゴマー形成に対するメマンチンの相互作用、効果、またはその両方に関与している可能性がある。メマンチンの A β 凝集に対する作用様式を明らかにするためには、A β 凝集体の構造生物学的な解析を含めてさらなる研究が必要であるが、本結果は、メマンチンが SAD および FAD を含む広範囲の患者に対して有用である可能性を示している。

A β 凝集体は神経細胞に対して障害性を示すことが報告されており、メマンチンは *in vivo* において、A β 40 あるいは 42 の凝集体や A β オリゴマーによって引き起こされる神経細胞死を抑制することが報告されている (Nakamura et al., 2006; Nyakas et al., 2011)。本研究では、メマンチンと作用させた後、透析によってメマンチンを除去した A β ペプチドは、その細胞傷害性が減弱していることを示した。以上から、メマンチンは、それ自身のもつ NMDA 受容体を介した A β 凝集体による神経細胞障害に対する保護作用に加えて、A β 線維やオリゴマー形成を抑制することによってそれらの神経細胞障害性を低減する作用を有することが示された。

アマンタジンは、図表 20 で示す通り、メマンチンと同じアダマンタン骨格を有する類似構造を持ち、メマンチンと同様 NMDA 拮抗作用を持つ。しかしながら、メマンチンが *in vitro* 実験において濃度依存的にヒト A β (1-42)の凝集形成を阻害し、凝集を乖離させたのに対し、アマンタジンは同じ濃度範囲でそれらの作用を示さなかった。このことから、メマンチンは NMDA 拮抗作用に依らない凝集形成阻害作用および凝集解離作用を有することが示唆された。

動物実験での投与量に関して、Tg2576 マウスのメマンチン血漿中濃度をサテライト実験にて測定したところ、メマンチンを 20 mg/kg/day で 1 ヶ月間投与した際の最終時点での血漿中濃度は $0.80 \pm 0.16 \mu\text{M}$ (N=7) であった。先行研究において、ラット脳組織中のメマンチンの濃度は、血清および CSF よりも 20-30 倍高いことが報告されている (Hesselink et al., 1999)。この報告に基づくと、本研究での動物実験における脳内メマンチンの推定濃度は 16-24 μM となる。すなわち、動物試験における脳内メマンチン濃度 (16-24 μM) は、A β 産生阻害作用を評価する際に細胞に曝露し、作用が認められたメマンチン濃度 (3-30 μM) と同程度と考えられる。

臨床において、メマンチンを服用した患者における CSF 中のメマンチン濃度は 0.05-0.3 μM であることが報告されている (Kornhuber et al., 1995)。DIAN コホート研究における 128 名の参加者の CSF 中の $\text{A}\beta_{42}$ 濃度は、APP、PSEN1 あるいは PSEN2 の 3 つの遺伝子のうち 1 つ以上の変異をもった被験者で 218 pg/mL であり、変異を持たない被験者では 398 pg/mL であった (Bateman et al., 2012)。ADNI コホート研究において、平均 CSF 中 $\text{A}\beta(1-42)$ 濃度は、健常者、軽度認知障害 (以下 MCI) 患者あるいは AD 患者において、それぞれ 229.0、141.0 あるいは 134.0 pg/mL であった (Toledo et al., 2013)。

本研究で、非細胞系でのメマンチンによる $\text{A}\beta$ 凝集阻害作用あるいは凝集解離作用は、0.1-3 mM で濃度依存的に観察された。これらの実験では短時間で $\text{A}\beta$ を凝集させるために、1-5 μM という生理的な濃度より高い $\text{A}\beta$ ペプチドを用いているが、実際に生体内で生じる緩徐な $\text{A}\beta$ の凝集を阻害するのに必要なメマンチン濃度は、0.1-3 mM の濃度域よりは低いと考えられる。人で有効性を示す脳組織中のメマンチン濃度 (上述の報告からの推測) と CSF 中 $\text{A}\beta$ 濃度との比率は、非細胞系の実験で用いた両者の比率に近いことから、メマンチンによる $\text{A}\beta$ 凝集作用は、両者の比率によって発現する可能性が考えられた。この点に関しては更なる検証が必要である。

本研究において、メマンチンの長期投与は、遺伝子改変 AD マウスモデルにおいて脳内 $\text{A}\beta$ 量を低下させるだけでなく、正常動物における月齢依存的な $\text{A}\beta$ 蓄積をも阻害することを示した。その作用メカニズムとして、APP の細胞内輸送を制御することによる「 $\text{A}\beta$ 産生阻害作用」、またヒト $\text{A}\beta(1-42)$ のみならず、種々の凝集性のある $\text{A}\beta$ ペプチドに対して示した「 $\text{A}\beta$ 凝集抑制作用」、さらに「 $\text{A}\beta$ 凝集解離作用」が関与している可能性を示した (図表 29)。しかしながら、メマンチンの APP の細胞内輸送の制御に関して、また、 $\text{A}\beta$ 凝集抑制作用および $\text{A}\beta$ 凝集解離作用に関する作用機序についてはさらなる検討の余地がある。これらのメカニズムが解明されれば、AD に対する新たな治療標的が見出され、AD

治療薬の創出に役立つ可能性がある。また、 $A\beta$ 以外の凝集性の高いタンパク (tau やシヌクレイン等) に対する検討の余地も残されており、これら凝集タンパクに対しても、メマンチンが凝集阻害作用および凝集乖離作用を示せば、AD 以外の疾患 (パーキンソン病やレビー小体型認知症、ハンチントン病等) の治療につながる可能性がある。

さらに、メマンチンが $A\beta$ 分解酵素である Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) の mRNA 発現量を増加させ、 $A\beta$ の分解にも寄与する可能性があることが報告されており (Kidana et al., 2018)、メマンチンは「 $A\beta$ 分解促進作用」も有する可能性が示唆されている。以上の結果から、メマンチンは NMDA 受容体阻害に基づく神経保護作用のみならず、さまざまなアプローチで $A\beta$ を減少させる作用を併せ持ち、病態コントロールだけでなく、AD 患者の症候の改善しうる魅力的な“疾患修飾薬”である可能性を秘めている (図表 29)。

謝辞

本研究の推進にあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院 薬学系研究科 機能病態学教室 教授 富田 泰輔 先生に深謝致します。

本研究の機会を与えてくださり、研究の推進に多大なるご支援を賜りました第一三共株式会社 研究開発本部 研究統括部 部長 熊倉 誠一郎 博士、第一三共株式会社 メディカルアフェアーズ本部 メディカルサイエンス部 森島 義行 博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、直接の御指導、御助言を賜りました第一三共株式会社 ベンチャーサイエンスラボラトリー 牧野 充裕 博士、論文執筆にあたり御指導を賜りました第一三共株式会社 ベンチャーサイエンスラボラトリー 高橋 秀典 博士に深謝致します。

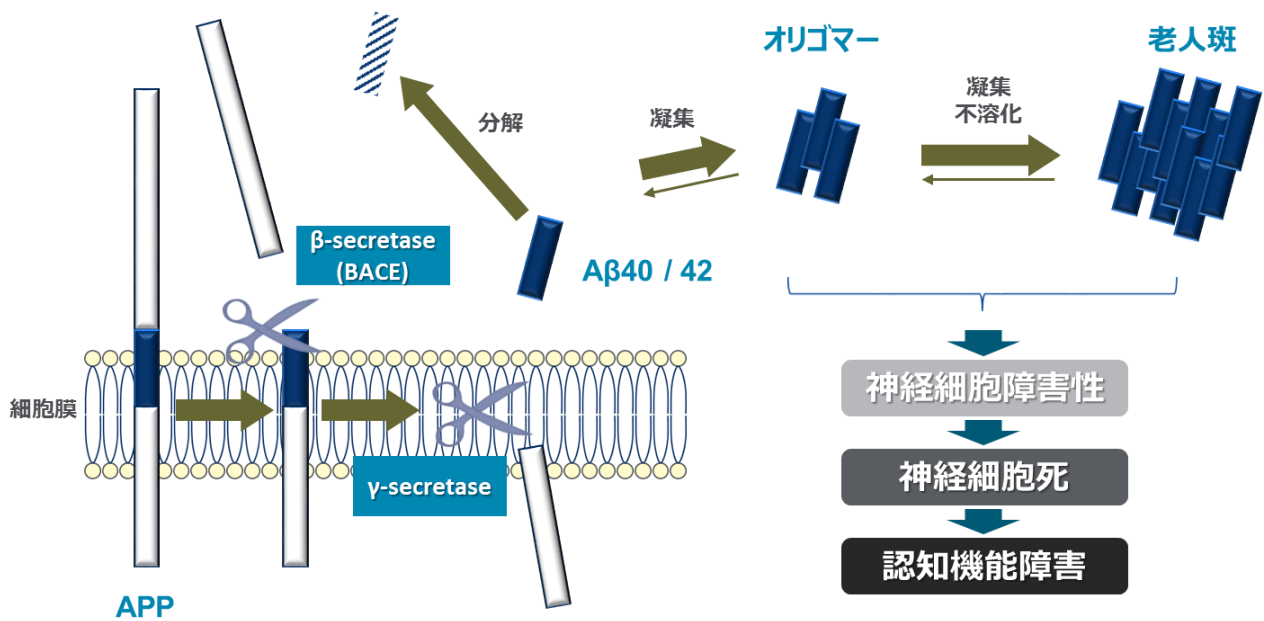
本研究を共に遂行していただいた東京大学大学院 薬学系研究科 機能病態学教室 建部 卓也 博士、鈴木 邦道 博士をはじめとする共同研究者の皆様に深謝致します。

一般名	ドネペジル	ガランタミン	リバスチグミン	メマンチン
作用機序	AChE*阻害	AChE*阻害 ニコチン受容体増強	AChE*阻害 BuChE**阻害	NMDA受容体阻害
適応	軽度～高度	軽度～中等度	軽度～中等度	中等度～高度

図表 1 日本で上市されている認知症適応の薬剤（2018年現在）

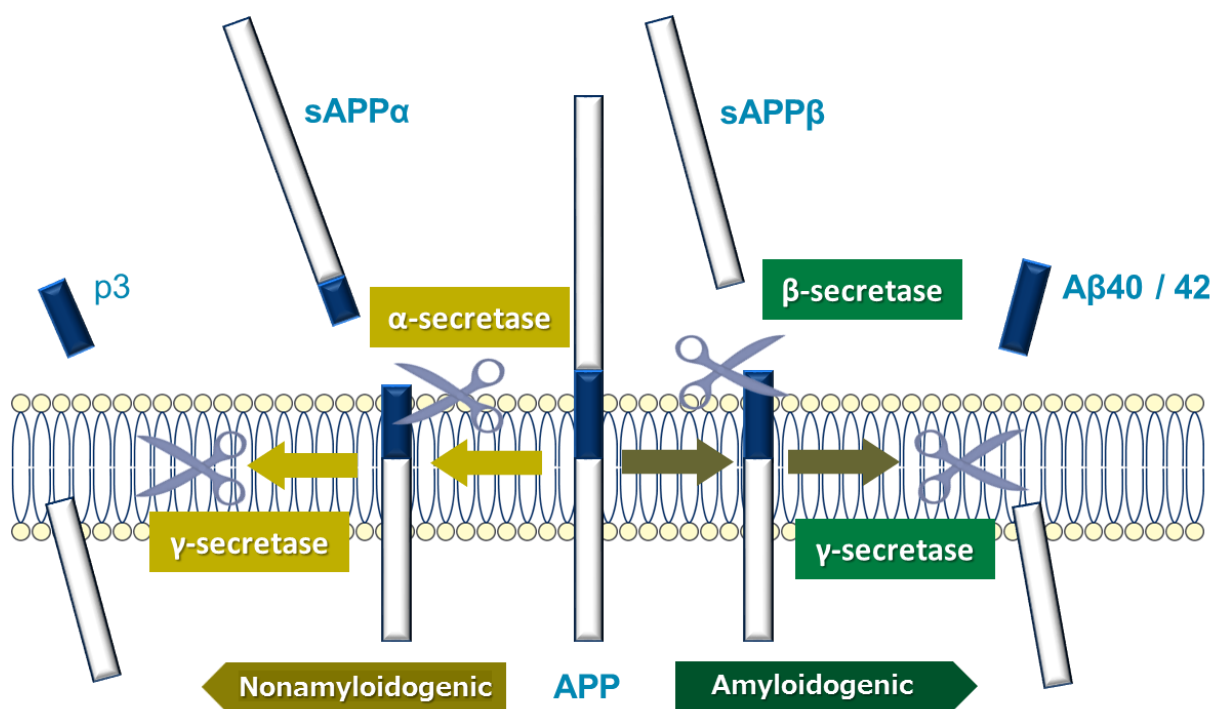
アセチルコリンエステラーゼ阻害薬 3 剤と、NMDA 受容体阻害薬が 1 剤上市されている。（国立長寿医療研究センター 認知症・せん妄サポートチームマニュアルより改変）

* AChE: アセチルコリンエステラーゼ、** BuChE: ブチルコリンエステラーゼ



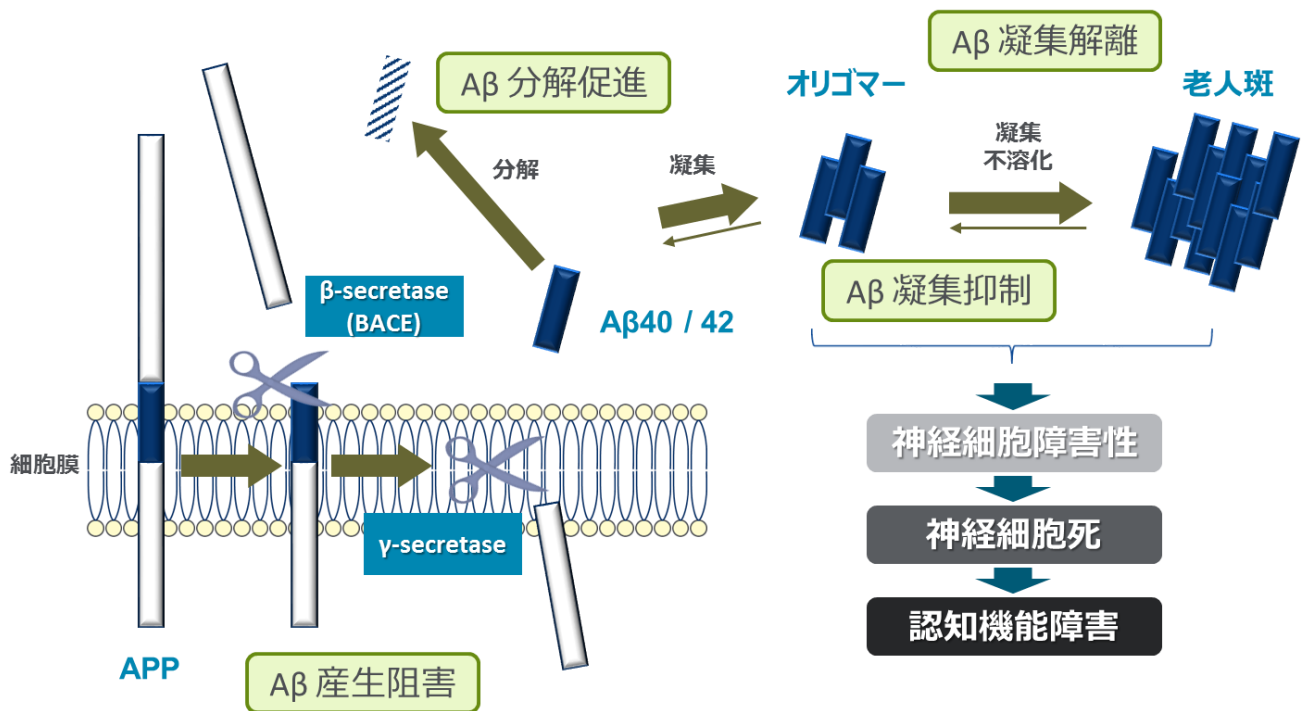
図表 2 アミロイド仮説

A β が凝集した可溶性 A β オリゴマーや不溶化した A β 線維が神経細胞障害性を持ち、神経細胞死を引き起こして認知機能障害につながる。脳における A β の産生、凝集および蓄積の異常が AD の発症に深く関与しているという仮説。この図は、既報 (Tomita, 2014) の図を改変した。



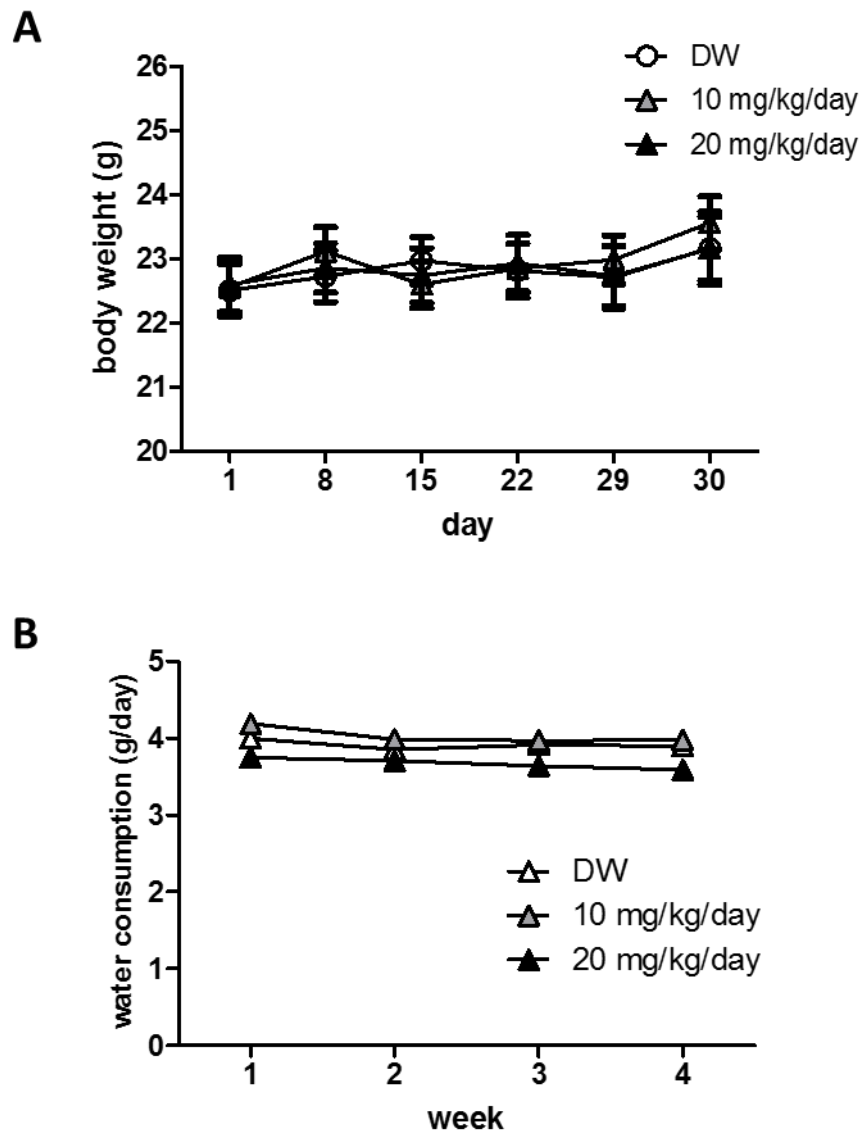
図表 3 APP の切断経路

Aβ 前駆物質である APP の切断には 2 つの異なる経路が存在する。APP が α-secretase に切断されて sAPPα を生成し、その後 γ-secretase に切断されて p3 を生成する「非アミロイド形成経路」と、β-secretase に切断されて sAPPβ を生成し、その後 γ-secretase に切断されて Aβ を生成する「アミロイド形成経路」である。この図は、既報 (Kikuchi et al., 2017) の図を改変した。



図表 4 想定されるメマンチンの作用点

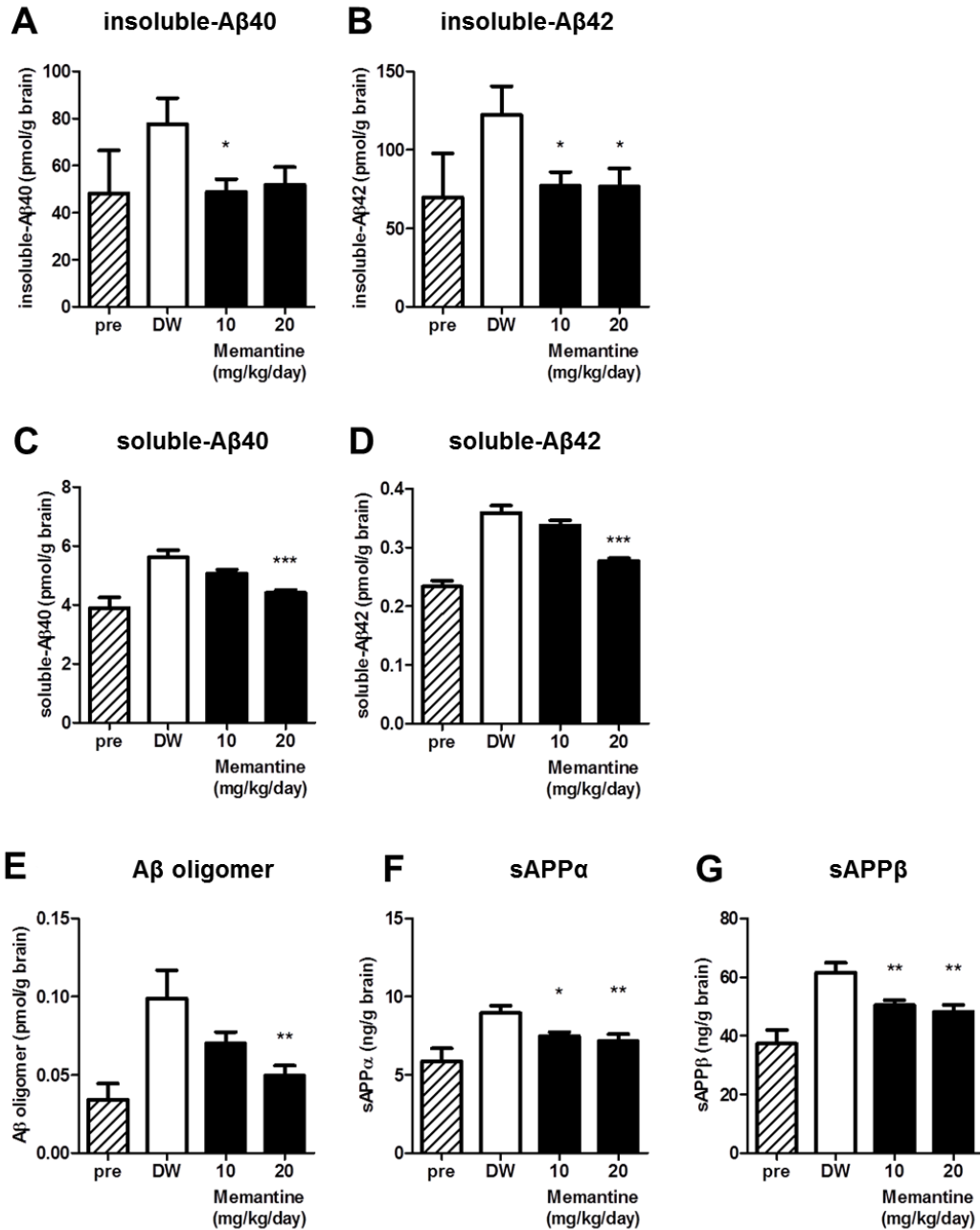
メマンチンの脳内 Aβ 量および蓄積を減少させる作用の作用点として、「Aβ 産生阻害作用」、「Aβ 凝集抑制作用」、「Aβ 凝集解離作用」および「Aβ 分解促進作用」が想定された。この図は、既報 (Tomita, 2014) の図を改変した。



図表5 メマンチン1ヶ月飲水投与時のTg2576マウスの平均体重および飲水量

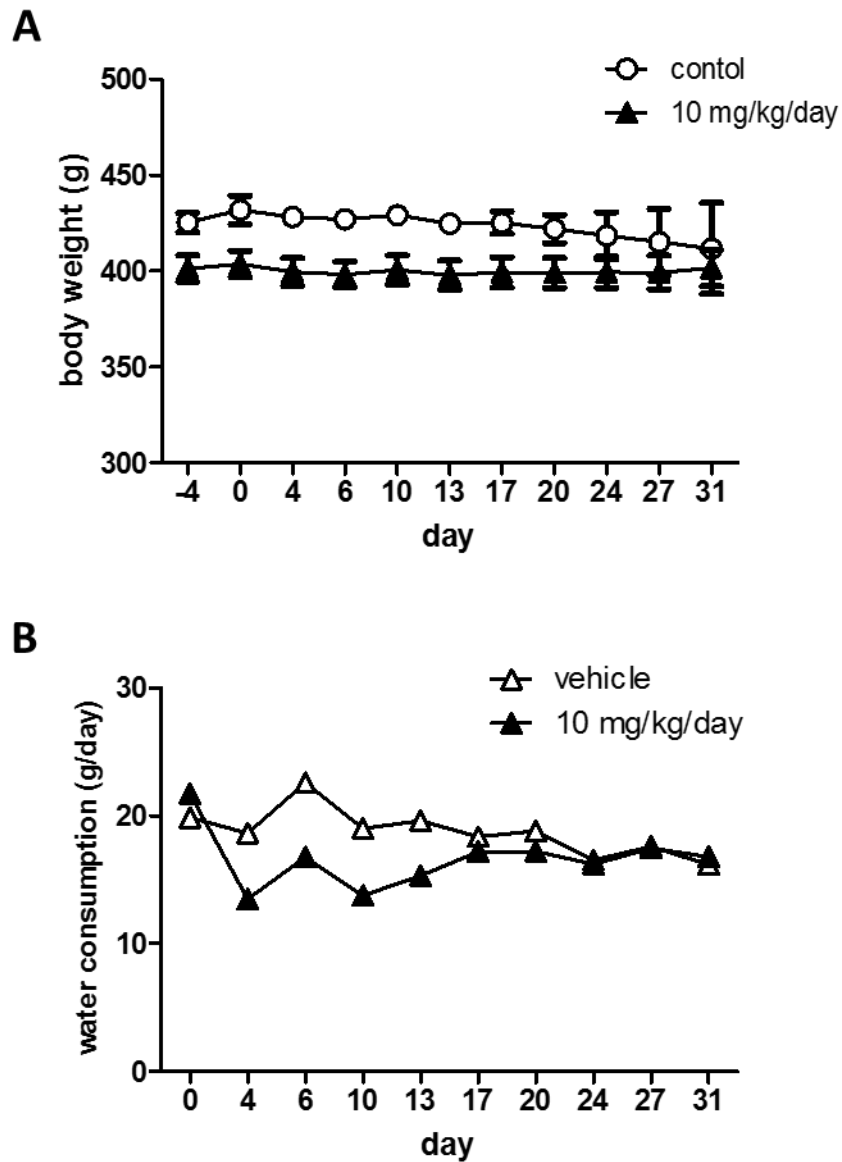
(A) 群ごとの平均体重 (N=23-24, Mean ± S.E.M.)

(B) 1匹あたりの飲水量 (g/day)



図表 6 Tg2576 マウスを用いたメマンチン 1 ヶ月間投与の作用評価

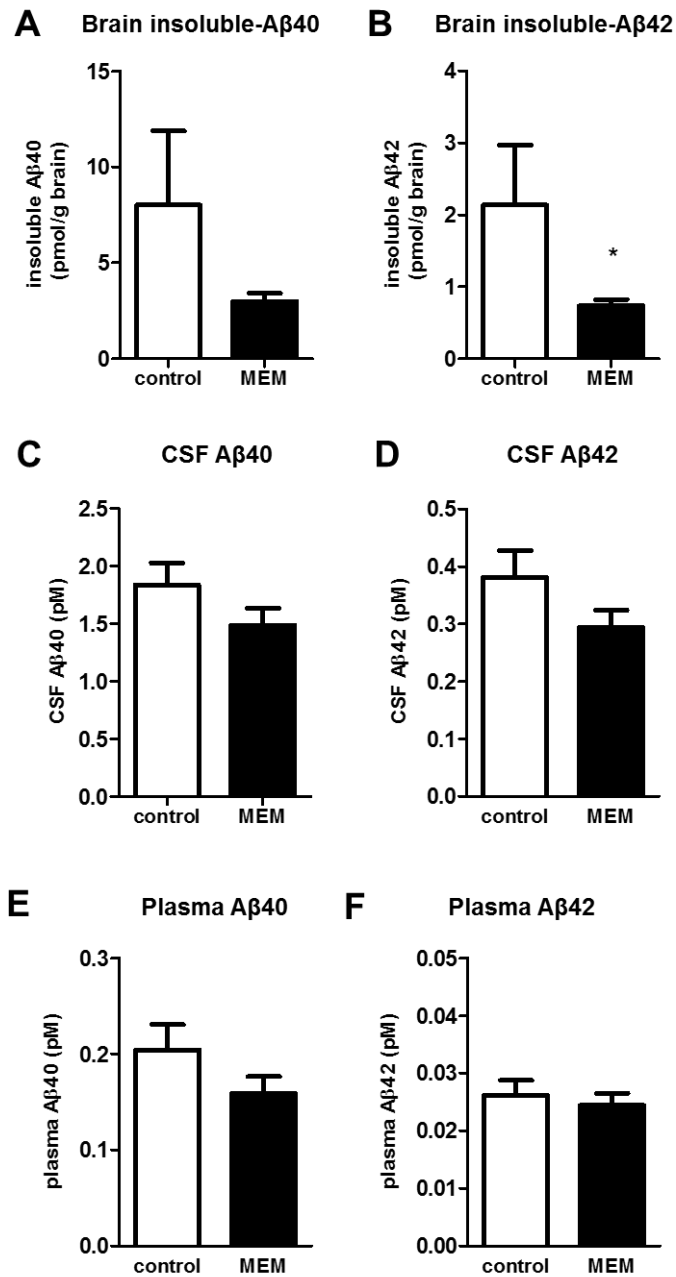
脳における CHAPS 不溶性 A β 量 (A および B)、CHAPS 可溶性 A β 量 (C および D)、A β オリゴマー量 (E)、sAPP α 量 (F) および sAPP β 量 (G) に対するメマンチン 1 ヶ月間投与の作用を確認した (pre: N=5, DW and memantine group: N=23-24, Mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, vs DW group, by Dunnett test)。



図表7 メマンチン1ヶ月飲水投与時の加齢F344ラットの平均体重および飲水量

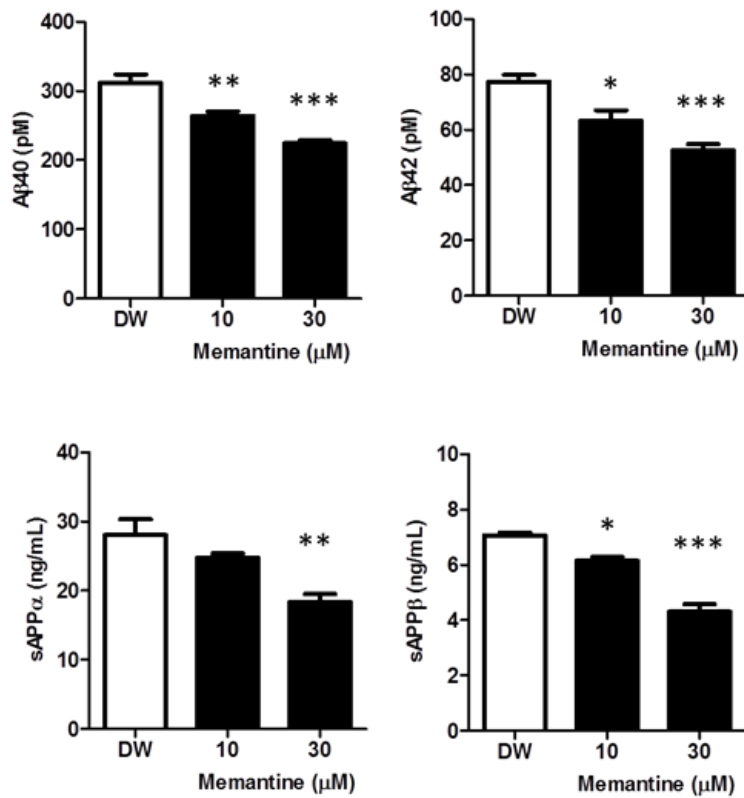
(A) 群ごとの平均体重 (Control: N=4, Memantine: N=7, Mean ± S.E.M.)

(B) 1匹あたりの飲水量 (g/day)



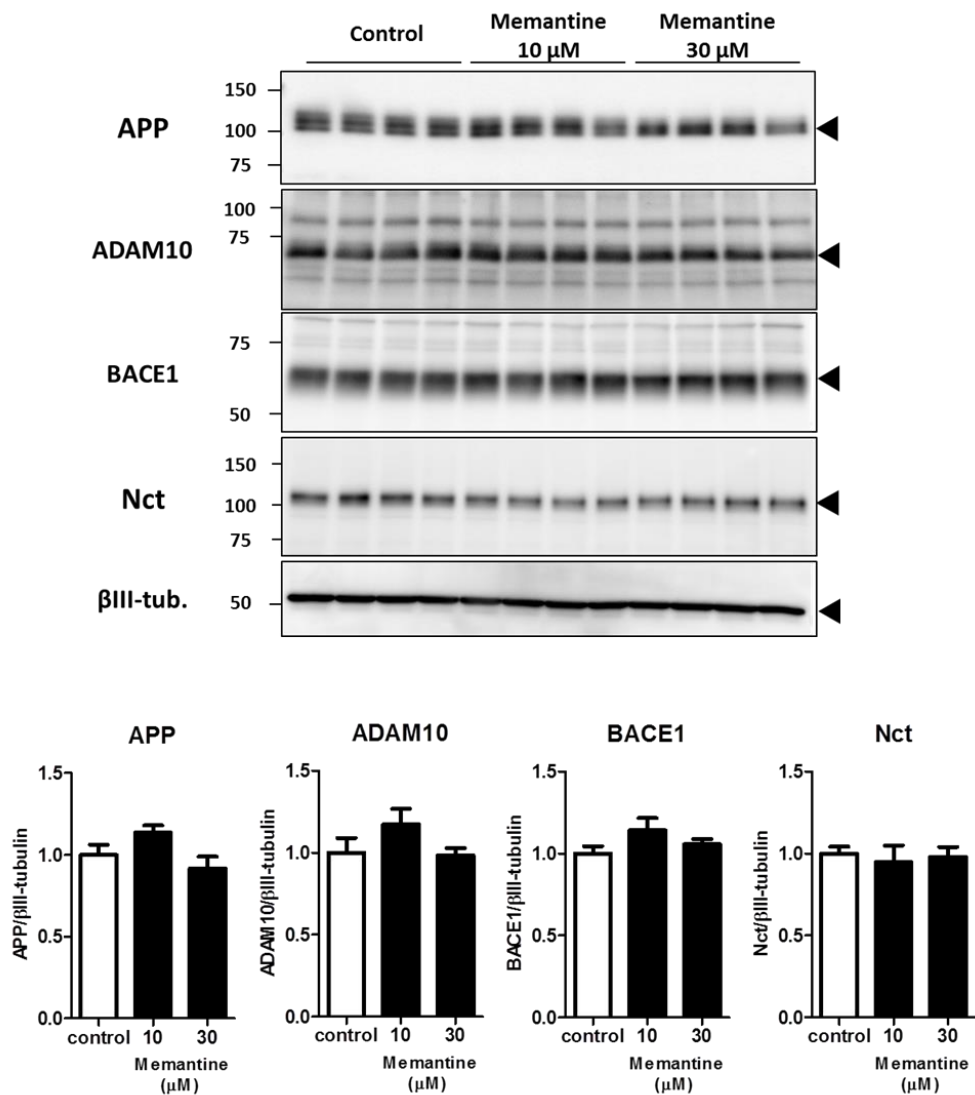
図表 8 加齢 F344 ラットを用いたメマンチン 1 ヶ月投与の作用評価

脳内 CHAPS 不溶性 Aβ 量 (A および B)、CSF 中 Aβ 量 (C および D)、血漿中 Aβ 量 (E および F) に対するメマンチン 1 ヶ月間投与の作用を確認した (Control: N=4, Memantine (MEM): N=7, Mean ± S.E.M., * $P < 0.05$ vs DW group, by Dunnett test)。



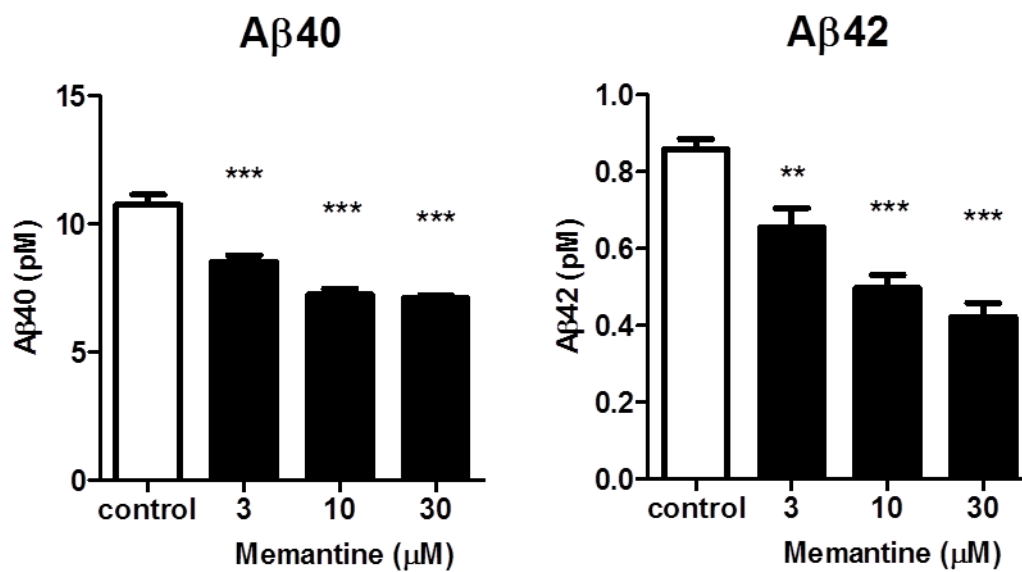
図表 9 ラット初代神経細胞における Aβ および sAPP に対するメマンチンの作用

DIV 8 の細胞にメマンチンあるいは DW を添加し、7 日後の培養上清中の Aβ および sAPP 量を ELISA にて測定した (4 samples, Mean ± S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs DW group, by Dunnett test)。



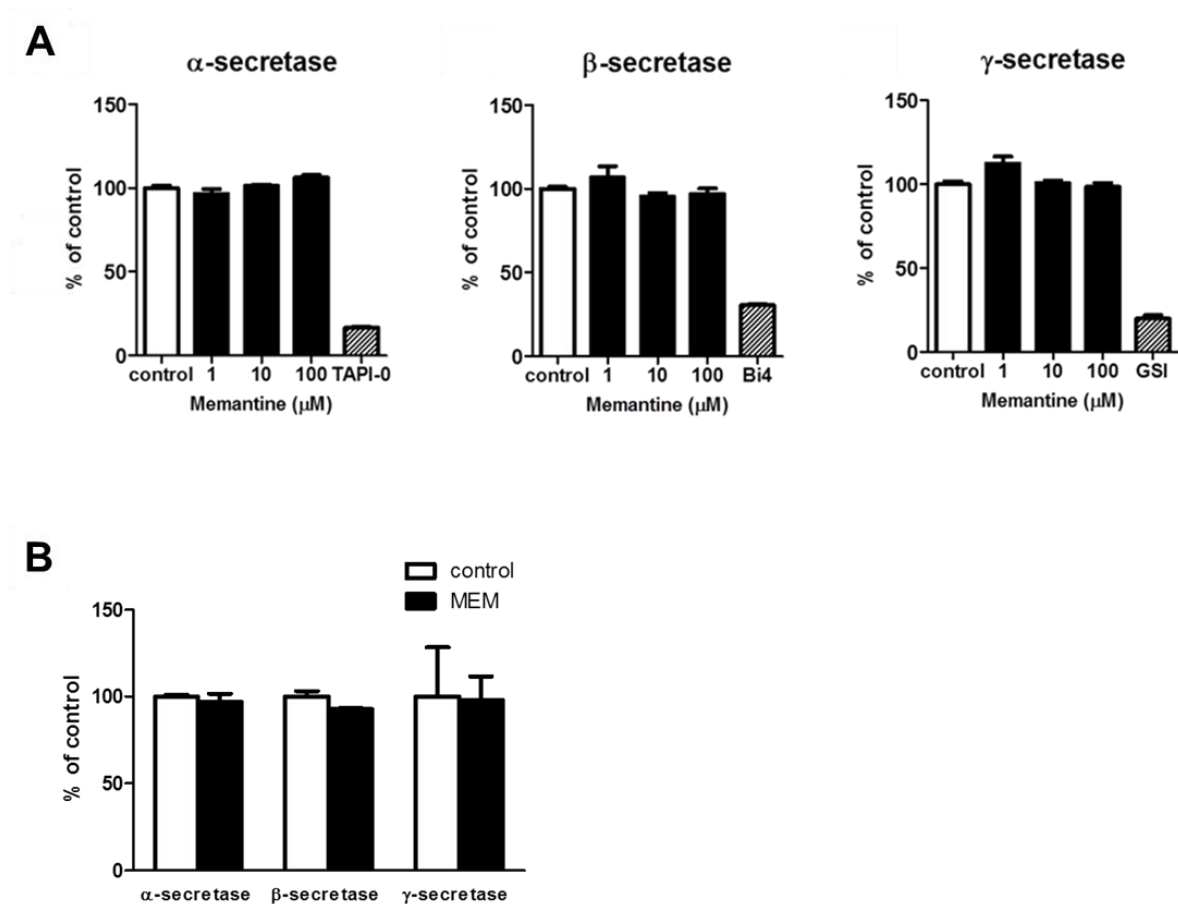
図表 10 APP, ADAM10, BACE1 および Nicastrin 量に対するメマンチンの作用

ラット初代神経細胞に DIV 8 から 7 日間、メマンチンあるいは DW を添加し、細胞中の APP、ADAM10、BACE1 および Nicastrin (Nct) の発現量を Immunoblot 法にて検出した。各バンドを定量し、βIII-tubulin (βIII-tub.) 量で補正し比較した (4 samples, Mean ± S.E.M.)。



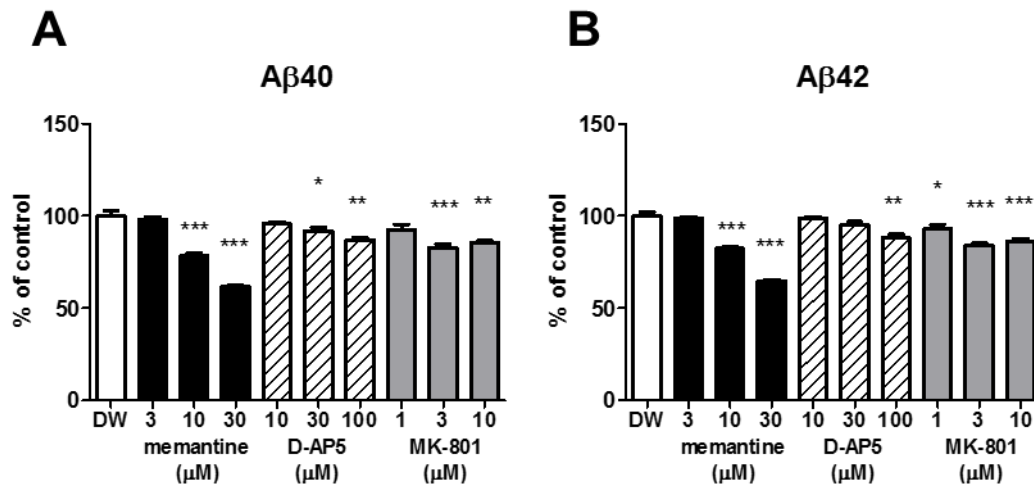
図表 11 H4 細胞におけるメマンチン曝露による培地上清中 Aβ 量への影響

ヒト神経膠腫細胞株である H4 細胞において、3 日間メマンチンあるいは DW を曝露し、培養上清中の Aβ40 および Aβ42 量を測定した (5 samples, Mean ± S.E.M., ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared to the control group by Dunnett test.)。



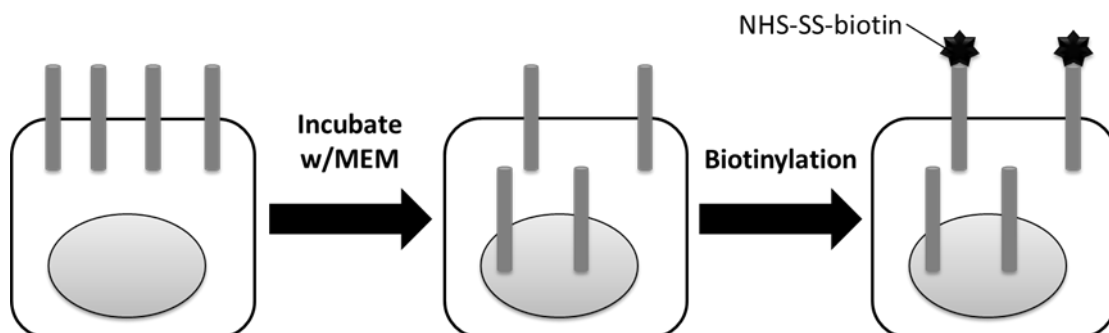
図表 12 APP 切断酵素である α -secretase、 β -secretase および γ -secretase の酵素活性に対するメマンチンの作用

(A) H4 細胞の膜画分を酵素画分として、 α -secretase、 β -secretase および γ -secretase それぞれの基質と、メマンチン (1-100 μ M) あるいは各陽性対照、TAPI-0、BACE inhibitor IV (Bi4) および L-685, 458 (GSI) を反応させた (3 samples, Mean \pm S.E.M.)。 (B) メマンチン (MEM, 20 mg/kg/day) あるいは DW を 1 ヶ月間投与した Tg2576 マウスの脳の膜画分を用いて、各酵素の活性の変化の有無を調べた (3 samples, Mean \pm S.E.M.)。



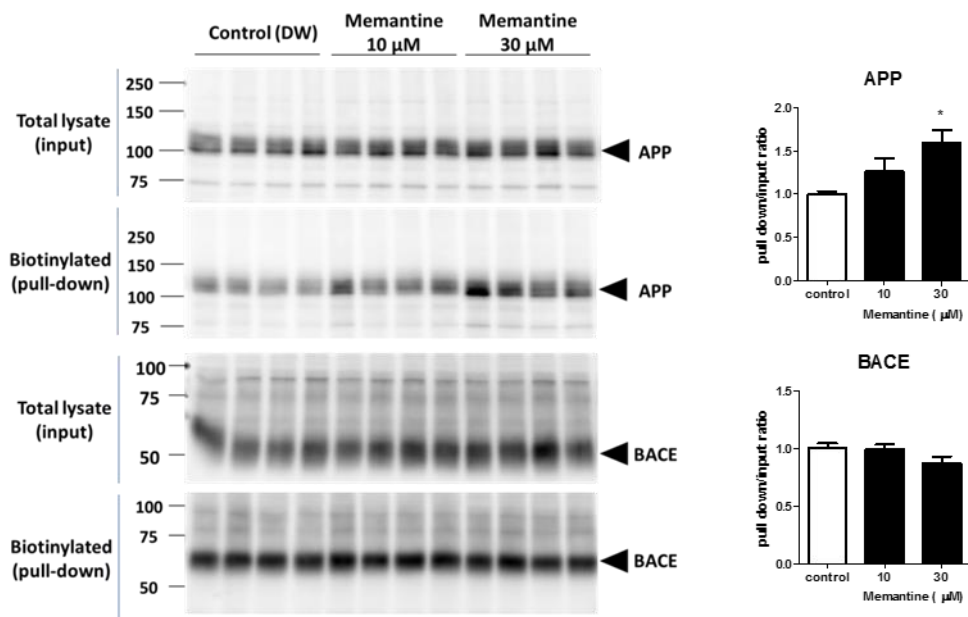
図表 13 ラット初代神経細胞における Aβ に対する NMDA 受容体阻害薬の作用

DIV 8 の細胞にメマンチン (3-30 μM)、D-AP5 (10-100 μM)、MK-801 (1-10 μM) あるいは DW を添加し、7 日後の培養上清中の Aβ40 (A) および Aβ42 (B) 量を ELISA にて測定した (4 samples, Mean ± S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs DW group, by Dunnett test)。



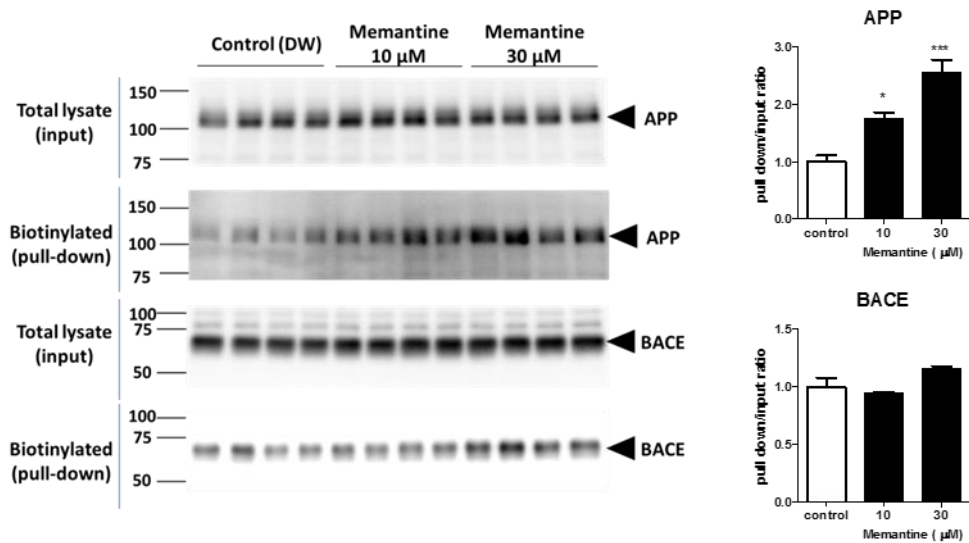
図表 14 細胞表面ビオチン化アッセイの模式図

細胞膜透過性のない Sulfo-NHS-SS-Biotin を用いて、細胞表面にあるタンパクのみを標識し、メマンチン (MEM) によって細胞表面上の特定のタンパク量が変化するかどうかを調べた。



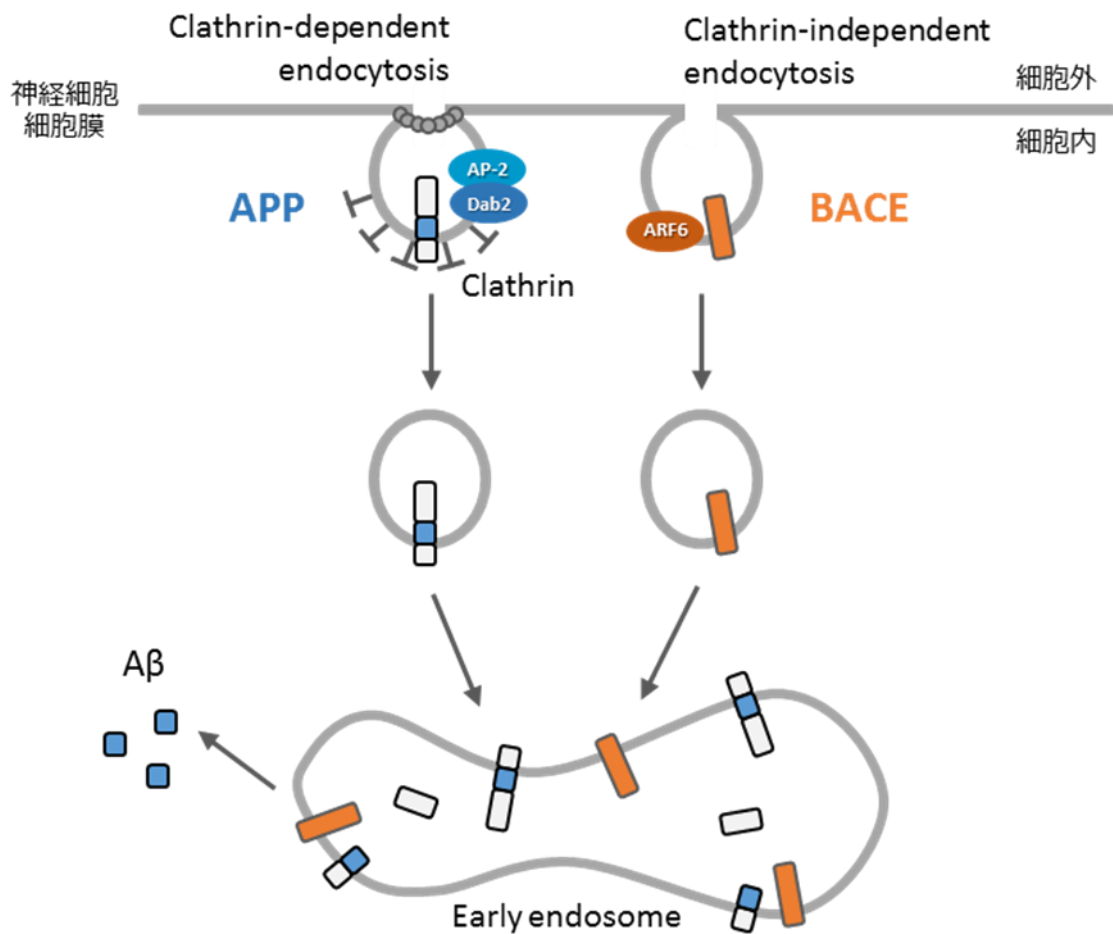
図表 15 APP および BACE の細胞内輸送に対するメマンチンの作用 (DIV 8)

DIV 8 のラット初代神経細胞を用いて、メマンチン添加後の細胞全体 (input) と細胞表面上 (pull-down) の APP および BACE 量を Immunoblot 法にて検出した。グラフは細胞全体に対する細胞表面の APP あるいは BACE 量の比を示した (4 samples, Mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$ vs the control group, by Dunnett test)。



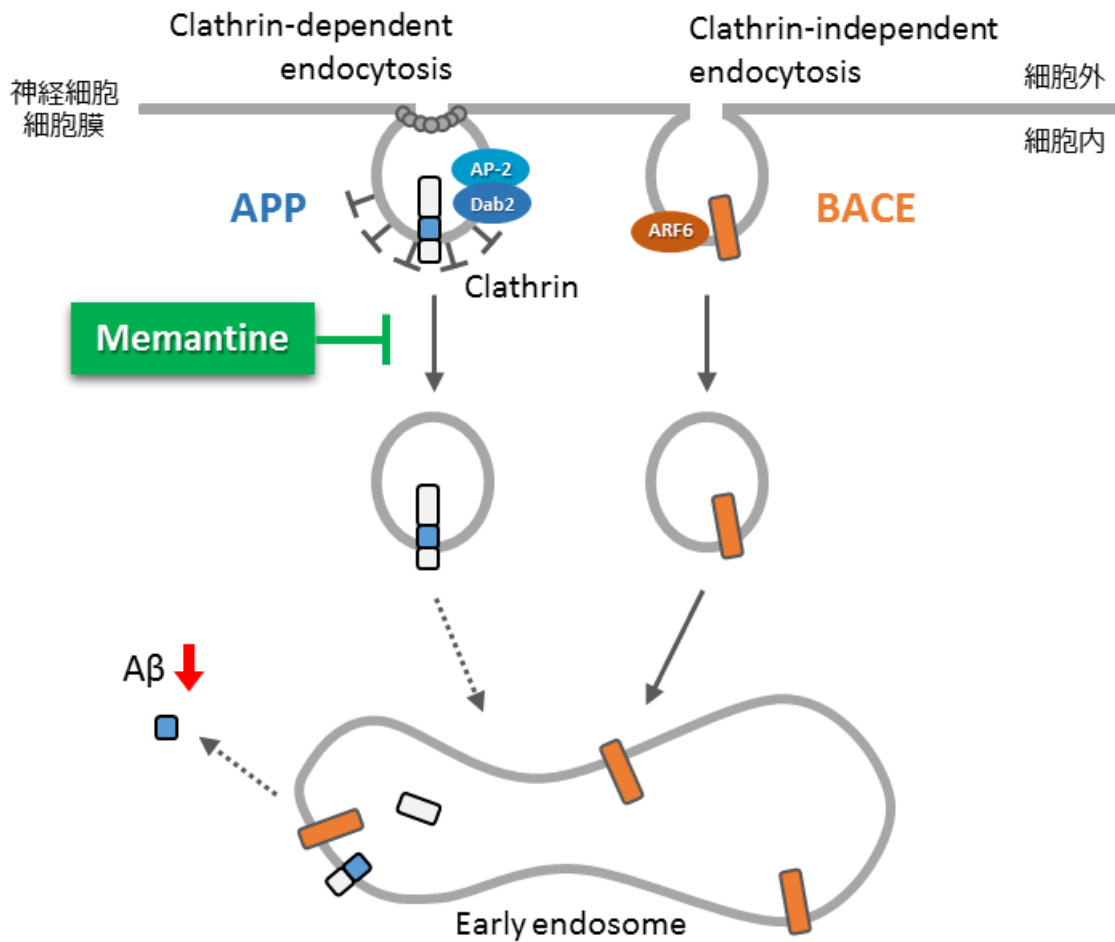
図表 16 APPおよびBACEの細胞内輸送に対するメマンチンの作用 (DIV 14)

DIV 14 のラット初代神経細胞を用いて、メマンチン添加後の細胞全体 (input) と細胞表面上 (pull-down) の APP および BACE 量を Immunoblot 法にて検出した。グラフは細胞全体に対する細胞表面の APP あるいは BACE 量の比を示した (4 samples, Mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs the control group, by Dunnett test)。



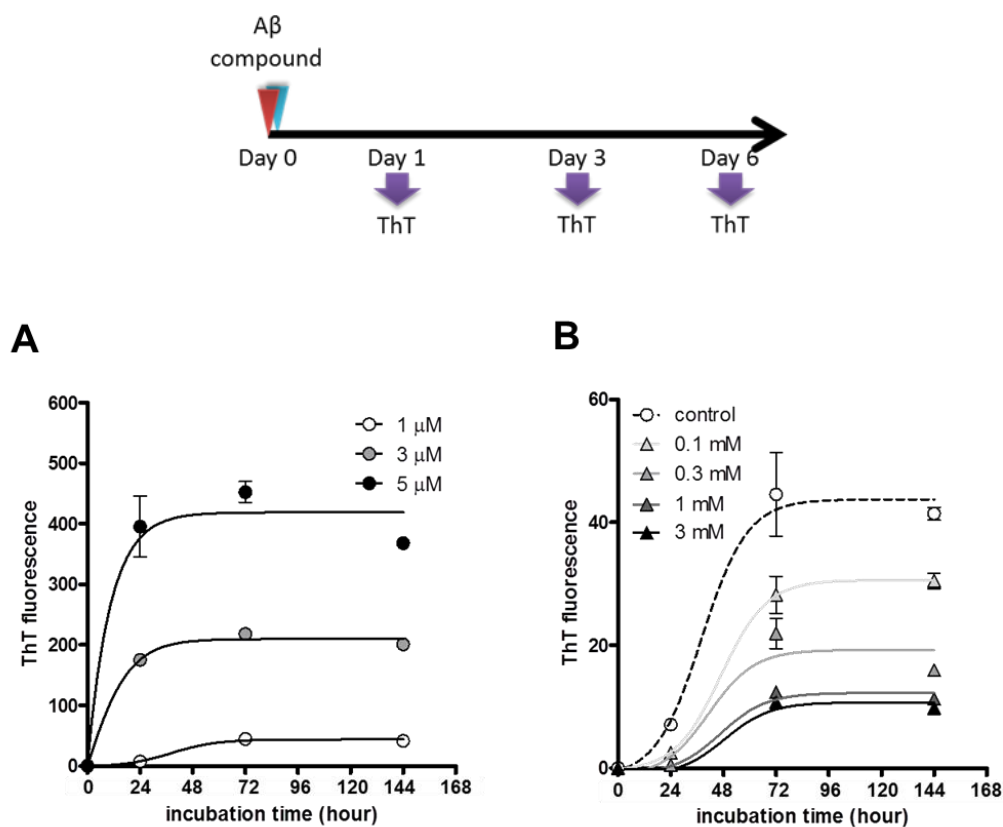
図表 17 APP および BACE の細胞内輸送

Aβ 産生経路において、APP が細胞表面膜よりエンドサイトーシスを受けることが必要であることが示されている。APP と BACE (β-secretase) はそれぞれ別のメカニズムで細胞表面から細胞内へ取り込まれてエンドソームに運ばれ、そこで APP が切断され Aβ が産生されることが知られている。この図は、既報 (Sannerud et al., 2011) の図を改変した。



図表 18 APP および BACE の細胞内輸送に対するメマンチンの作用

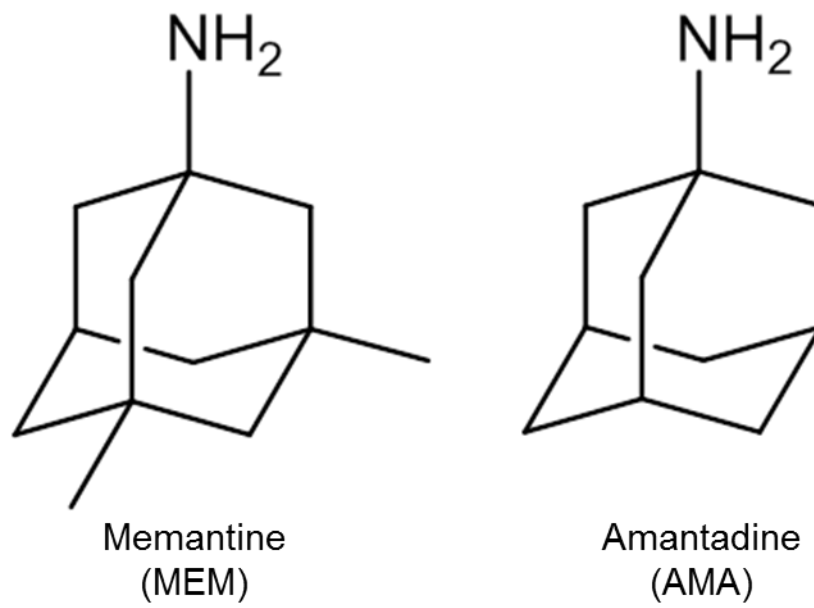
メマンチンは、APP の細胞内輸送を制御することで Aβ 産生を阻害している可能性が示唆された。この図は、既報 (Sannerud et al., 2011) の図を改変した。



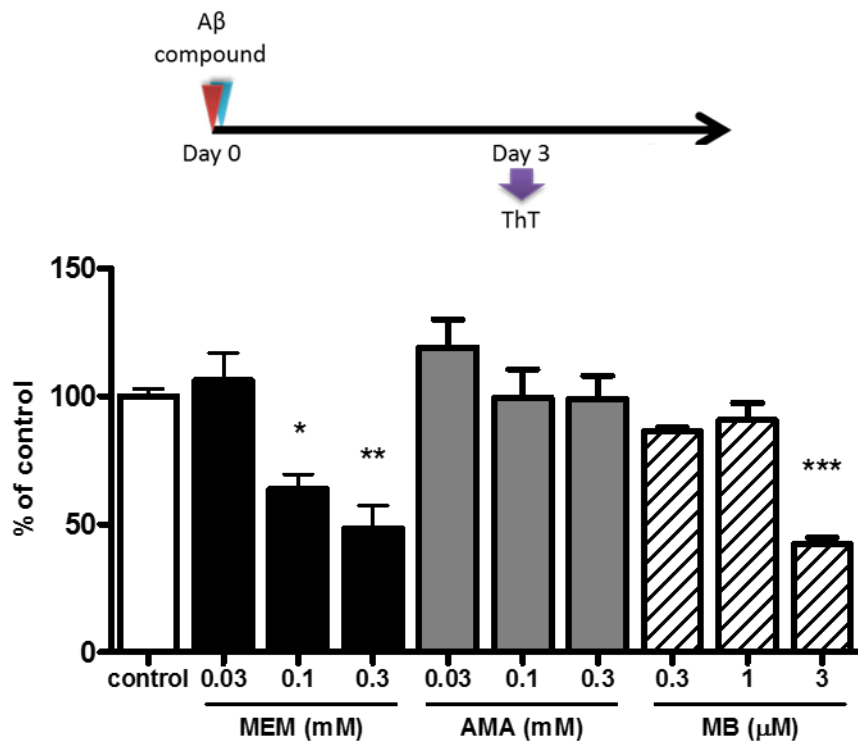
図表 19 メマンチンの Aβ 凝集阻害作用

(A) ヒト Aβ(1-42)を 37°C で 24, 72 および 144 時間反応させた際の ThT 蛍光強度 (3 samples, Mean ± S.E.M.)。

(B) ヒト Aβ(1-42) (最終濃度: 1 μM) をメマンチン (MEM, 0.1-3 mM) とともに 37°C で 72 時間反応させた際の ThT 蛍光強度 (3 samples, Mean ± S.E.M.)。

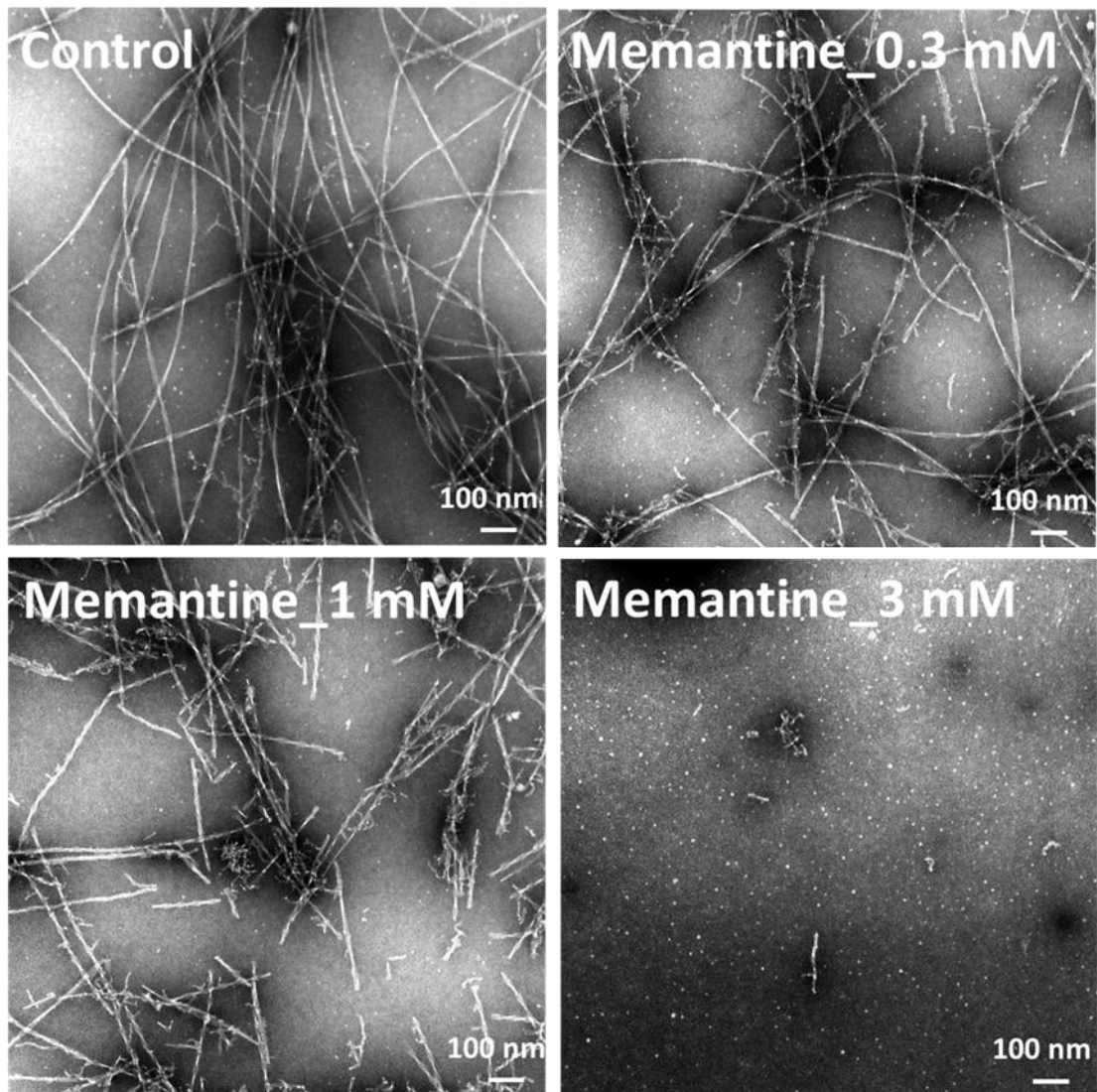


図表 20 メマンチン (MEM) およびアマンタジン (AMA) の構造



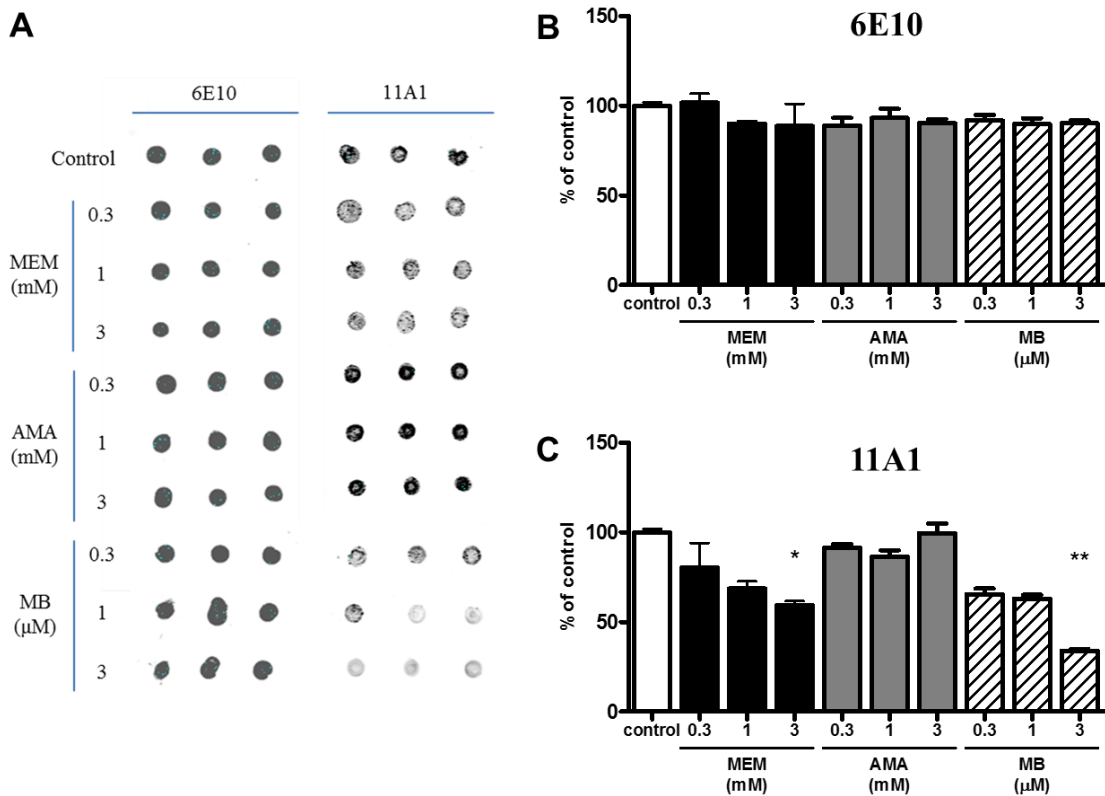
図表 21 メマンチン、アマンタジンおよびメチレンブルーの A β 凝集阻害作用

ヒト A β (1-42) (最終濃度: 1 μ M) をメマンチン (MEM, 0.03-0.3 mM)、アマンタジン (AMA, 0.03-0.3 mM)、メチレンブルー (MB, 0.3-3 μ M) あるいは DW (control) とともに 37°C で 72 時間反応させた際の ThT 蛍光強度 (% of control, 3 samples, Mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the control group, by Dunnett test)。



図表 22 透過電子顕微鏡 (TEM) を用いたメマンチンの A β 凝集阻害作用評価

ヒト A β (1-42) (最終濃度: 1 μ M) をメマンチン (0.3-3 mM) あるいは DW (control) とともに 37°C で 72 時間反応させた後、ネガティブ染色を行った (Scale bar: 100 nm)。

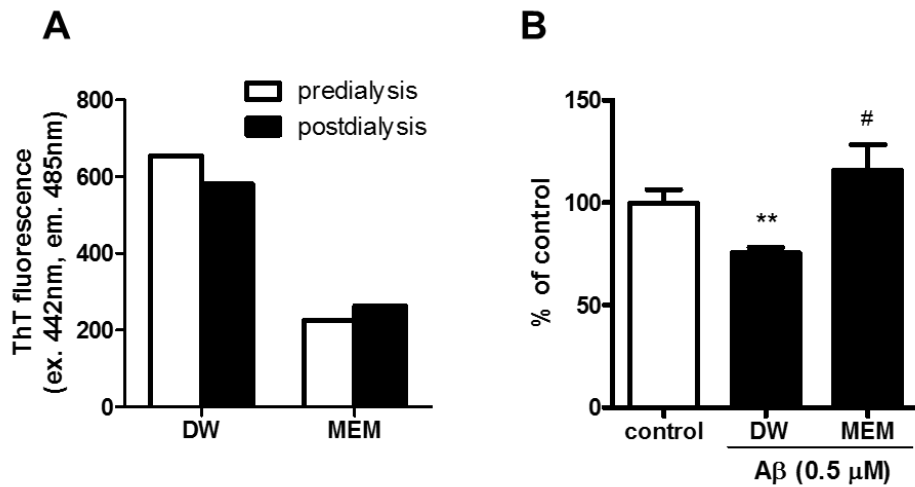


図表 23 Dot blot 法を用いた A β オリゴマー形成に対する各薬剤の作用

ヒト A β (1-42) (最終濃度: 1 μ M) をメマンチン (MEM, 0.3-3 mM)、アマンタジン (AMA, 0.3-3 mM)、メチレンブルー (MB, 0.3-3 μ M) あるいは DW (control) とともに 37°C で 72 時間反応させた。

(A) 反応させたサンプルを Dot blot 法にて検出した。

(B および C) 抗 A β 抗体 (B: 6E10) および抗 A β オリゴマー抗体 (C: 11A1) によるドットの定量値 (% of control, 3 samples, Mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the control group by Dunnett test)。



図表 24 ラット初代神経細胞を用いた A β 毒性に対するメマンチンの作用

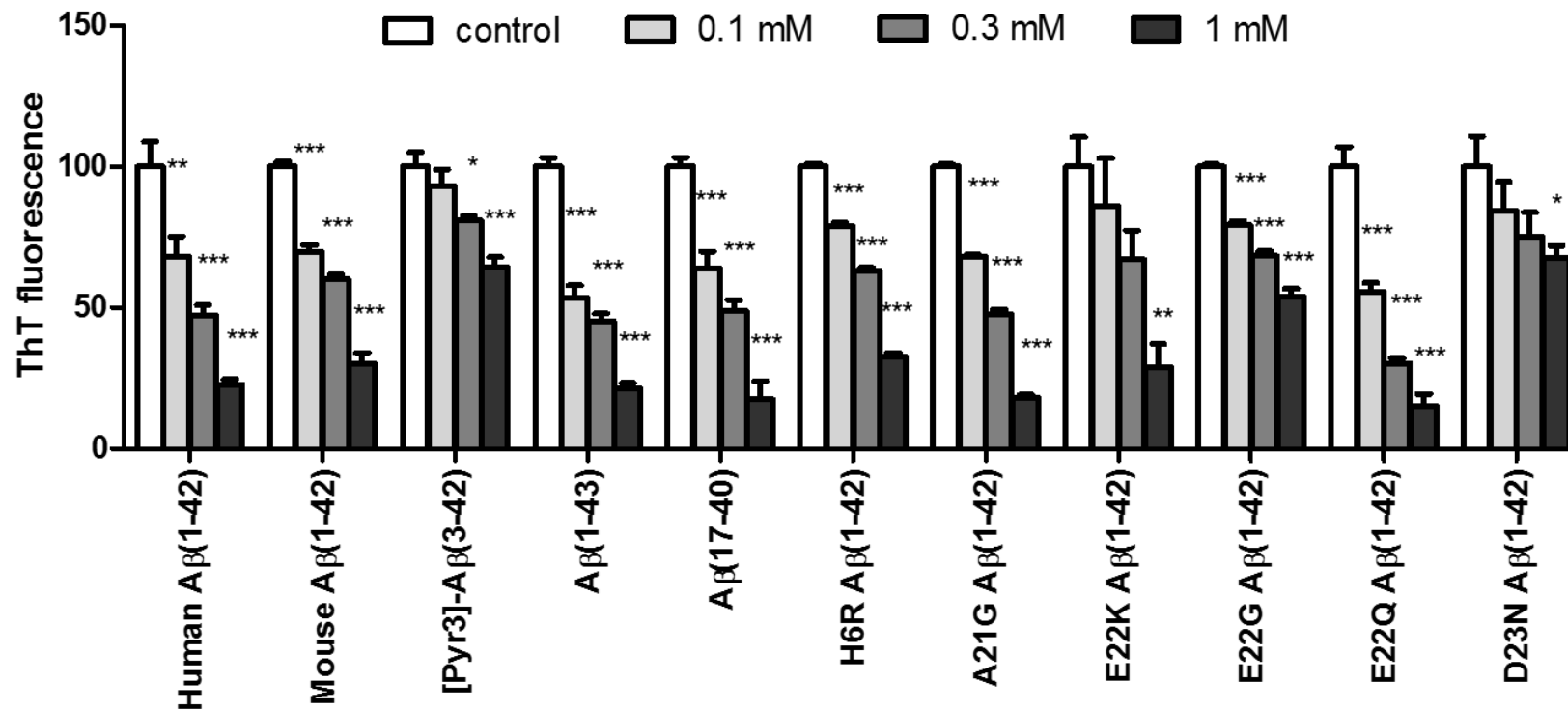
ヒト A β (1-42) (最終濃度: 5 μ M) をメマンチン (1 mM) あるいは DW (control) とともに 37°C で 72 時間反応させた後、透析によりメマンチンを除去した。

(A) 透析する前後のサンプルを用いた ThT assay を行い、透析の前後で蛍光強度が変わらないことを確認した。

(B) 透析した A β サンプルを DIV 16 のラット初代神経細胞に添加し、その 24 時間後の細胞生存率を Alamar Blue を用いて評価した (% of control, 6 wells, Mean \pm S.E.M., ** $P < 0.01$ vs the control group, # $P < 0.05$ vs the DW group by t-test)。

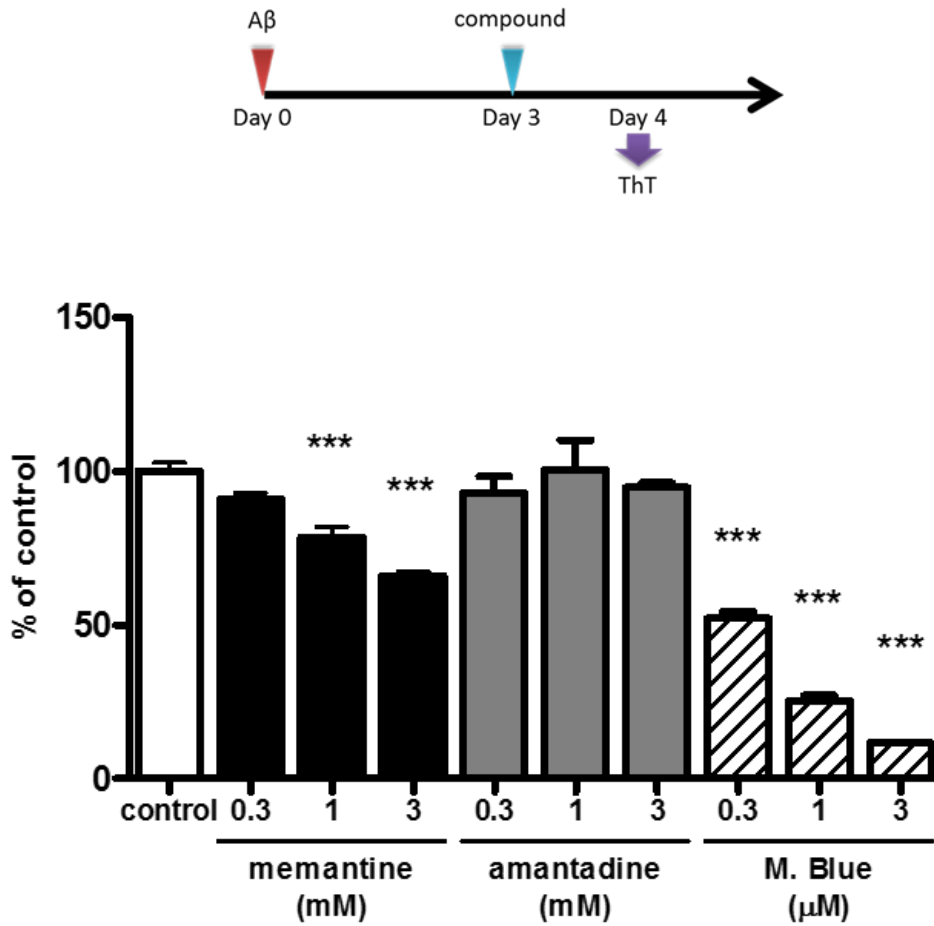
Abbreviation	Product	Catalog #	ThT fluorescence (Mean ± SE)
Human Aβ(1-42)	Beta - Amyloid (1 - 42), Human	AS-20276	53 ± 2.3
mouse Aβ(1-42)	Beta - Amyloid Peptide (1 - 42), mouse, rat	AS-25231	11 ± 0.56
[Pyr3]- Aβ(3-42)	[Pyr3] - beta - Amyloid (3 - 42), Human	AS-29907	44 ± 2.7
Aβ(1-43)	Beta - Amyloid (1 - 43), Human	AS-25356	13 ± 0.47
Aβ(17-40)	Beta - Amyloid (17 - 40), Human, mouse/rat	AS-22813	4.7 ± 0.25
H6R Aβ(1-42)	[Arg6] - beta - Amyloid (1 - 42), English Mutation, Human	AS-63323	33 ± 0.64
A21G Aβ(1-42)	[Gly21] - beta - Amyloid (1 - 42), A21G Flemish Mutation, Human	AS-63704	39 ± 0.64
E22K Aβ(1-42)	[Lys22] - beta - Amyloid (1 - 42), Italian Mutation, Human	AS-62148	3.0 ± 0.63
E22G Aβ(1-42)	[Gly22] - beta - Amyloid (1 - 42), E22G Arctic Mutation, Human	AS-61967	15 ± 0.55
E22Q Aβ(1-42)	[Gln22] - beta - Amyloid (1 - 42), E22Q Dutch Mutation, Human	AS-62142	2.6 ± 0.30
D23N Aβ(1-42)	[Asn23] - beta - amyloid (1 - 42), Iowa Mutation, Human	AS-63705	23 ± 0.45

図表 25 試験に用いた各種 Aβ ペプチドおよび各種 Aβ ペプチドの control 群の ThT 蛍光強度



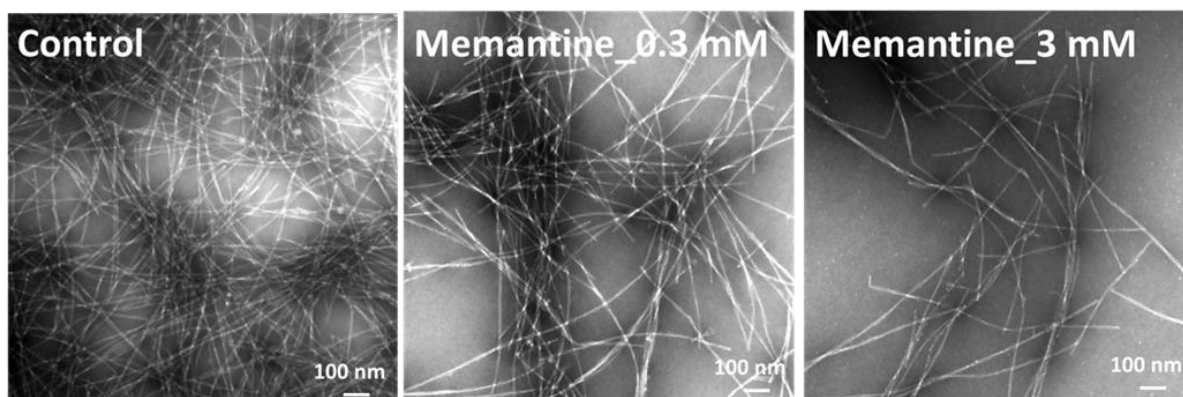
図表 26 各種 Aβ の凝集形成に対するメマンチンの作用

各種 Aβ (最終濃度: 1 μM) をメマンチン (MEM, 0.1-1 mM) あるいは DW (control) とともに 37°C で 72 時間反応させ、ThT assay にて評価した (% of control, 3 samples, Mean ± S.E.M., * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the control group by Dunnett test)。



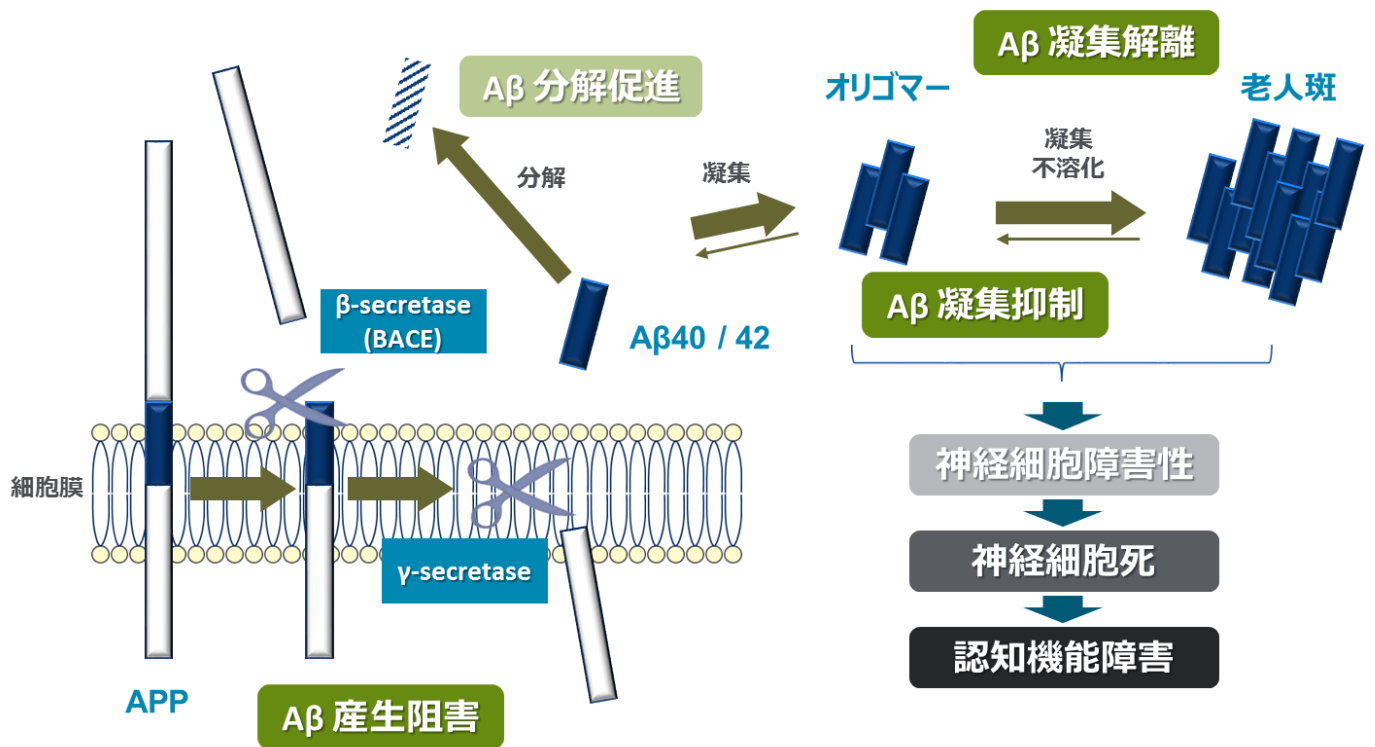
図表 27 メマンチン、アマンタジンおよびメチレンブルーの Aβ 凝集乖離作用

ヒト Aβ(1-42) (最終濃度: 3 μM) を 37°C で 72 時間反応させた後、メマンチン (MEM, 0.3-3 mM)、アマンタジン (AMA, 0.3-3 mM)、メチレンブルー (MB, 0.3-3 μM) あるいは DW (control) を添加し、さらに 37°C で 24 時間反応させた際の ThT 蛍光強度 (% of control, 3 samples, Mean ± S.E.M., *** $P < 0.001$ vs the control group, by Dunnett test)。



図表 28 TEM を用いたメマンチンの A β 凝集乖離作用評価

ヒト A β (1-42) (最終濃度: 3 μ M) を 37°C で 72 時間反応させた後、メマンチン (0.3 および 3 mM) あるいは DW (control) を添加し、さらに 37°C で 24 時間反応させ、ネガティブ染色を行った (Scale bar: 100 nm)。



図表 29 本検討で示唆されたメマンチンの作用点

メマンチンの脳内 Aβ 量および蓄積を減少させる作用の作用点として、APP の細胞内輸送の制御を介した「Aβ 産生阻害作用」、ヒト野生型 Aβ(1-42)のみならず、種々の Aβ ペプチドに対する「Aβ 凝集抑制作用」ならびに「Aβ 凝集解離作用」を有している可能性が示唆された。この図は、既報 (Tomita, 2014) の図を改変した。

参考文献

- Alley GM, Bailey JA, Chen D, Ray B, Puli LK, Tanila H, Banerjee PK, Lahiri DK. Memantine lowers amyloid-beta peptide levels in neuronal cultures and in APP/PS1 transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2010 Jan;88(1):143-54.
- Asami-Odaka A, Ishibashi Y, Kikuchi T, Kitada C, Suzuki N. Long amyloid beta-protein secreted from wild-type human neuroblastoma IMR-32 cells. *Biochemistry*. 1995 Aug 15;34(32):10272-8.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TL, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC; Dominantly Inherited Alzheimer Network. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2012 Aug 30;367(9):795-804.
- Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2010 Dec;23(4):213-27.
- Brooks WS, Kwok JB, Halliday GM, Godbolt AK, Rossor MN, Creasey H, Jones AO, Schofield PR. Hemorrhage is uncommon in new Alzheimer family with Flemish amyloid precursor protein mutation. *Neurology*. 2004 Nov 9;63(9):1613-7.
- Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC. Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol*. 2001 Mar;158(3):1173-7.

- Chen QS, Kagan BL, Hirakura Y, Xie CW. Chen, Q.S., Kagan, B.L., Hirakura, Y., Xie, C.W. Impairment of hippocampal long-term potentiation by Alzheimer amyloid beta-peptides. *J Neurosci Res.* 2000 Apr 1;60(1):65-72.
- Chow VW, Mattson MP, Wong PC, Gleichmann M. An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Med.* 2010 Mar;12(1):1-12.
- Colombo A, Wang H, Kuhn PH, Page R, Kremmer E, Dempsey PJ, Crawford HC, Lichtenthaler SF. Constitutive α - and β -secretase cleavages of the amyloid precursor protein are partially coupled in neurons, but not in frequently used cell lines. *Neurobiol Dis.* 2013 Jan;49:137-47.
- Das U, Scott DA, Ganguly A, Koo EH, Tang Y, Roy S. Activity-induced convergence of APP and BACE-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway. *Neuron.* 2013 Aug 7;79(3):447-60.
- Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci.* 2006 May 31;26(22):6011-8.
- Dong H, Yuede CM, Coughlan C, Lewis B, Csernansky JG. Effects of memantine on neuronal structure and conditioned fear in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2008 Dec;33(13):3226-36.
- 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 beta40 and A beta42. *Neuroreport.* 1999 Sep 29;10(14):2965-9.

- Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JP, Rebeck GW, Greenberg SM. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 2001 Jun;49(6):697-705.
- Haass C. Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J.* 2004 Feb 11;23(3):483-8.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002 Jul 19;297(5580):353-6.
- Hartley D, Blumenthal T, Carrillo M, DiPaolo G, Esralew L, Gardiner K, Granholm AC, Iqbal K, Krams M, Lemere C, Lott I, Mobley W, Ness S, Nixon R, Potter H, Reeves R, Sabbagh M, Silverman W, Tycko B, Whitten M, Wisniewski T. Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimers Dement.* 2015 Jun;11(6):700-9.
- Hashimoto T, Wakabayashi T, Watanabe A, Kowa H, Hosoda R, Nakamura A, Kanazawa I, Arai T, Takio K, Mann DM, Iwatsubo T. CLAC: a novel Alzheimer amyloid plaque component derived from a transmembrane precursor, CLAC-P/collagen type XXV. *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7):1524-34.
- Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, Warren A, McInnis MG, Antonarakis SE, Martin JJ, Hofman A, Van Broeckhoven C. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet.* 1992 Jun;1(3):218-21.
- Hesselink MB, De Boer BG, Breimer DD, Danysz W. Brain penetration and in vivo recovery of NMDA receptor antagonists amantadine and memantine: a quantitative microdialysis study. *Pharm Res.* 1999 May;16(5):637-42.

Hori Y, Hashimoto T, Wakutani Y, Urakami K, Nakashima K, Condrón MM, Tsubuki S, Saido TC, Teplow DB, Iwatsubo T. The Tottori (D7N) and English (H6R) familial Alzheimer disease mutations accelerate Abeta fibril formation without increasing protofibril formation. *J Biol Chem*. 2007 Feb 16;282(7):4916-23.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 1996 Oct 4;274(5284):99-102.

Hu M, Schurdak ME, Puttfarcken PS, El Kouhen R, Gopalakrishnan M, Li J. High content screen microscopy analysis of A beta 1-42-induced neurite outgrowth reduction in rat primary cortical neurons: neuroprotective effects of alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Brain Res*. 2007 Jun 2;1151:227-35.

Iizuka T, Shoji M, Harigaya Y, Kawarabayashi T, Watanabe M, Kanai M, Hirai S. Amyloid beta-protein ending at Thr43 is a minor component of some diffuse plaques in the Alzheimer's disease brain, but is not found in cerebrovascular amyloid. *Brain Res*. 1995 Dec 8;702(1-2):275-8.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*. 1994 Jul;13(1):45-53.

Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC, Harvey RJ, Houlden H, Rossor MN, Collinge J. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology*. 2003 Jan 28;60(2):235-9.

Jiang S, Li Y, Zhang X, Bu G, Xu H, Zhang YW. Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2014 Jan 11;9:6.

- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, Stefansson H, Sulem P, Gudbjartsson D, Maloney J, Hoyte K, Gustafson A, Liu Y, Lu Y, Bhangale T, Graham RR, Huttenlocher J, Bjornsdottir G, Andreassen OA, Jönsson EG, Palotie A, Behrens TW, Magnusson OT, Kong A, Thorsteinsdottir U, Watts RJ, Stefansson K. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012 Aug 2;488(7409):96-9.
- Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003 Mar 27;37(6):925-37.
- Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T. Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat Commun*. 2014 Feb 28;5:3386.
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2001 Jan 15;21(2):372-81.
- Kidana K, Tatebe T, Ito K, Hara N, Kakita A, Saito T, Takatori S, Ouchi Y, Ikeuchi T, Makino M, Saido TC, Akishita M, Iwatsubo T, Hori Y, Tomita T. Loss of kallikrein-related peptidase 7 exacerbates amyloid pathology in Alzheimer's disease model mice. *EMBO Mol Med*. 2018 Mar;10(3).
- Kikuchi K, Kidana K, Tatebe T, Tomita T. Dysregulated Metabolism of the Amyloid- β Protein and Therapeutic Approaches in Alzheimer Disease. *J Cell Biochem*. 2017 Dec;118(12):4183-4190.

- Kikusui T, Tonohiro T, Kaneko T. Age-related working memory deficits in the allocentric place discrimination task: possible involvement in cholinergic dysfunction. *Neurobiol Aging*. 1999 Nov-Dec;20(6):629-36.
- Koo EH, Squazzo SL. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*. 1994 Jul 1;269(26):17386-9.
- Kornhuber J, Quack G. Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. *Neurosci Lett*. 1995 Aug 4;195(2):137-9.
- Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, Viola KL, Klein WL. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2007 Jan 24;27(4):796-807.
- Lambert MP, Velasco PT, Chang L, Viola KL, Fernandez S, Lacor PN, Khuon D, Gong Y, Bigio EH, Shaw P, De Felice FG, Krafft GA, Klein WL. Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem*. 2007 Jan;100(1):23-35.
- Lee J, Retamal C, Cuitiño L, Caruano-Yzermans A, Shin JE, van Kerkhof P, Marzolo MP, Bu G. Adaptor protein sorting nexin 17 regulates amyloid precursor protein trafficking and processing in the early endosomes. *J Biol Chem*. 2008 Apr 25;283(17):11501-8.
- Levy E, Carman MD, Fernandez-Madrid IJ, Power MD, Lieberburg I, van Duinen SG, Bots GT, Luyendijk W, Frangione B. Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*. 1990 Jun 1;248(4959):1124-6.

Li S, Hong S, Shepardson NE, Walsh DM, Shankar GM, Selkoe D. Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake. *Neuron*. 2009 Jun 25;62(6):788-801.

Martinez-Coria H, Green KN, Billings LM, Kitazawa M, Albrecht M, Rammes G, Parsons CG, Gupta S, Banerjee P, LaFerla FM. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am J Pathol*. 2010 Feb;176(2):870-80.

Murakami K, Irie K, Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. Neurotoxicity and physicochemical properties of Abeta mutant peptides from cerebral amyloid angiopathy: implication for the pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):46179-87.

Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Katsuragi R, Ohno T. Cognitive dysfunction induced by sequential injection of amyloid-beta and ibotenate into the bilateral hippocampus; protection by memantine and MK-801. *Eur J Pharmacol*. 2006 Oct 24;548(1-3):115-22.

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci*. 2001 Sep;4(9):887-93.

Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE, Greengard P. Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem*. 1993 Jan 5;268(1):608-12.

- Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PG. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid- β 42 with memantine. *Behav Brain Res.* 2011 Aug 10;221(2):594-603.
- Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* 2010 Jul;13(7):812-8.
- Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist--a review of preclinical data. *Neuropharmacology.* 1999 Jun;38(6):735-67.
- Parvathy S, Davies P, Haroutunian V, Purohit DP, Davis KL, Mohs RC, Park H, Moran TM, Chan JY, Buxbaum JD. Correlation between Abeta40-, Abeta42-, and Abeta43-containing amyloid plaques and cognitive decline. *Arch Neurol.* 2001 Dec;58(12):2025-32.
- Perez RG, Soriano S, Hayes JD, Ostaszewski B, Xia W, Selkoe DJ, Chen X, Stokin GB, Koo EH. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):18851-6.
- Pizzi M, Boroni F, Bianchetti A, Moraitis C, Sarnico I, Benarese M, Goffi F, Valerio A, Spano P. Expression of functional NR1/NR2B-type NMDA receptors in neuronally differentiated SK-N-SH human cell line. *Eur J Neurosci.* 2002 Dec;16(12):2342-50.
- Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 25;103(30):11172-7.

Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S. Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques. *Neuron*. 1995 Feb;14(2):457-66.

Saito T, Suemoto T, Brouwers N, Sleegers K, Funamoto S, Mihira N, Matsuba Y, Yamada K, Nilsson P, Takano J, Nishimura M, Iwata N, Van Broeckhoven C, Ihara Y, Saido TC. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A β 43. *Nat Neurosci*. 2011 Jul 3;14(8):1023-32.

Sannerud R, Declerck I, Peric A, Raemaekers T, Menendez G, Zhou L, Veerle B, Coen K, Munck S, De Strooper B, Schiavo G, Annaert W. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 23;108(34):E559-68.

Scholtzova H, Wadghiri YZ, Douadi M, Sigurdsson EM, Li YS, Quartermain D, Banerjee P, Wisniewski T. Memantine leads to behavioral improvement and amyloid reduction in Alzheimer's-disease-model transgenic mice shown as by micromagnetic resonance imaging. *J Neurosci Res*. 2008 Sep;86(12):2784-91.

Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016 Jun 1;8(6):595-608.

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. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008 Aug;14(8):837-42.

Suzuki K, Hayashi Y, Nakahara S, Kumazaki H, Prox J, Horiuchi K, Zeng M, Tanimura S, Nishiyama Y, Osawa S, Sehara-Fujisawa A, Saftig P, Yokoshima S,

- Fukuyama T, Matsuki N, Koyama R, Tomita T, Iwatsubo T. Activity-dependent proteolytic cleavage of neuroligin-1. *Neuron*. 2012 Oct 18;76(2):410-22.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L Jr, Eckman C, Golde TE, Younkin SG. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 1994 May 27;264(5163):1336-40.
- Tagliavini F, Rossi G, Padovani A, Magoni M, Andora G, Sgarzi M, Bizzi A, Savoirdo M, Carella F, Morbin M, Giaccone G, Bugiani O. A new β PP mutation related to hereditary cerebral haemorrhage. *Alzheimer's Reports*. 1999; 2(S1):S28.
- Takahashi Y, Hayashi I, Tominari Y, Rikimaru K, Morohashi Y, Kan T, Natsugari H, Fukuyama T, Tomita T, Iwatsubo T. Sulindac sulfide is a noncompetitive gamma-secretase inhibitor that preferentially reduces A β 42 generation. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18664-70.
- Takahashi H, Fukumoto H, Maeda R, Terauchi J, Kato K, Miyamoto M. Ameliorative effects of a non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 on A β peptide levels and impaired learning behavior in aged rats. *Brain Res*. 2010 Nov 18;1361:146-56.
- Takasugi N, Tomita T, Hayashi I, Tsuruoka M, Niimura M, Takahashi Y, Thinakaran G, Iwatsubo T. The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex. *Nature*. 2003 Mar 27;422(6930):438-41.
- Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VM, Trojanowski JQ, Tomita T, Iwatsubo T. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci*. 2011 May 4;31(18):6850-7.

- Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M. Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):7614-23.
- Tian Y, Bassit B, Chau D, Li YM. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Abeta production. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Feb;17(2):151-8.
- Toledo JB, Xie SX, Trojanowski JQ, Shaw LM. Longitudinal change in CSF Tau and A β biomarkers for up to 48 months in ADNI. *Acta Neuropathol*. 2013 Nov;126(5):659-70.
- Tomita T. Molecular mechanism of intramembrane proteolysis by γ -secretase. *J Biochem*. 2014 Oct;156(4):195-201.
- Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiro S, Capell A, Walter J, Grünberg J, Haass C, Iwatsubo T, Obata K. The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid beta protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):2025-30.
- Van Nostrand WE, Melchor JP, Romanov G, Zeigler K, Davis J. Pathogenic effects of cerebral amyloid angiopathy mutations in the amyloid beta-protein precursor. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Nov;977:258-65.
- Wattendorff AR, Bots GT, Went LN, Endtz LJ. Familial cerebral amyloid angiopathy presenting as recurrent cerebral haemorrhage. *J Neurol Sci*. 1982 Aug;55(2):121-35.

Welander H, Frånberg J, Graff C, Sundström E, Winblad B, Tjernberg LO. Aβ43 is more frequent than Aβ40 in amyloid plaque cores from Alzheimer disease brains. *J Neurochem*. 2009 Jul;110(2):697-706.

Wisniewski T, Ghiso J, Frangione B. Peptides homologous to the amyloid protein of Alzheimer's disease containing a glutamine for glutamic acid substitution have accelerated amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Nov 14;180(3):1528.

Zhang X, Song W. The role of APP and BACE1 trafficking in APP processing and amyloid-β generation. *Alzheimers Res Ther*. 2013 Oct 8;5(5):46.