

アルツハイマー病の画像診断を目的としたプローブ化合物
BF-108 の開発

末元隆寛
株式会社ビーエフ研究所

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞構造学講座
(推薦教官 塩坂貞夫教授)

平成 16 年 3 月 3 日提出

第一章 マウス脳内における新規セリンプロテアーゼ B-GRK の cDNA クローニングとその発現解析

序論

神経系において、セリンプロテアーゼが様々な形で重要な役割を果たしていることが、これまでに多くの研究によって示されてきた。例えば neuropsin、尿素型及び組織型 plasminogen activator (uPA, tPA)、thrombin のような細胞外セリンプロテアーゼが神経系では発現している。これらのプロテアーゼは、細胞遊走 [1, 2]、突起伸展 [3-5]、シナプスの形成や再編成 [6-8] を始めとした神経系の発達 [9-13]、神経可塑性 [14-19]、神経細胞死 [20, 21] といった様々な機能に関与することが明らかとなってきた。しかしその一方、神経系では、例えば corticotrophin 放出因子 (CRF) 前駆体からのペプチドのプロセッシングのように、Lys もしくは Arg の C 末側を切断する trypsin 様の活性を有するプロテアーゼの関与が示唆されながらも、実際に機能している分子が未だに同定できていないものもある [22]。また近年、アルツハイマー病 (AD) などの痴呆症においても、セリンプロテアーゼやセリンプロテアーゼインヒビターの関与が、新たに報告されている [23-25]。

本研究では、脳内に発現しているセリンプロテアーゼの cDNA を単離することにより、脳型 granzyme K (B-GRK) を新たに同定した。granzyme ファミリーは様々な活性を持つセリンプロテアーゼから成り、perforin と共に細胞傷害性 T リンパ球やナチュラルキラー細胞の細胞傷害性顆粒の主要な構成要素である [26]。granzyme はウイルスに感染した細胞や癌細胞に対して分泌され、perforin により開かれた標的細胞の細胞膜上の穴から進入し、標的のアポトーシスを誘導する [27]。granzyme K (GRK) はラットのナチュラルキラー細胞より精製及び単離されたセリンプロテアーゼであり、trypsin 様の活性を有する [28]。GRK の cDNA はヒトとマウスでも単離され、このセリンプロテアーゼがナチュラルキラー細胞と T 細胞において発現していることが明らかとなっている [29-31]。GRK は合成基質の Lys および Arg の C 末側を切断し、その活性は内在性の inter- α -trypsin inhibitor により阻害される [32, 33]。granzyme ファミリーの中には、GRK と同様に trypsin 様の活性を有する granzyme A が存在しており、通常 of 細胞傷害性リンパ球においては GRK よりも granzyme A の方が発現が強い [31]。しかしながら granzyme A が欠如したマウスのリンパ球においては、GRK の発現が上昇することや、細胞傷害活性が維持されていることが分かっている。このように細胞傷害性 T リンパ球やナチュラルキラー細胞においては GRK について調べられてきたが、GRK が中枢神

経系で発現しているとの報告はこれまでなされていなかった。

今回の実験では、新たにクローニングされたマウス B-GRK 遺伝子について発現している組織を調べ、B-GRK が脳内に発現しており GRK との間に異なる分布が認められることを明らかにした。また in situ hybridization 法を用いることにより、発生過程における B-GRK/GRK の脳内の領域特異的な一過性の発現も示されたので併せて報告する。

材料と方法

PCR 法に用いたオリゴ DNA プライマーを表 1.1 に示す。

表 1.1

PCR 法に用いたオリゴヌクレオチド

Oligo	配列	cDNA 内の位置
53S	5'-GCCTCATGATGTCATGAGAA	53-72
104S	5'-GCATGTGCAGACCAAGTACACAGTA	104-128
305AS	5'-GAGTGCTGACCGCCTGGTAAACACT	305-281
344AS	5'-GCTGGACTTCCCTCCCTCCAATAAT	344-321
480AS	5'-CGGTGGGAGAGTGGCCTGTGGGAAA	480-456
524S	5'-GCAGACATTTGAAATTTAA	524-543
709S	5'-CCACCAAGCCAGATCTGTTA	709-728
710AS	5'-GGTTCCCCAGCCAGTCACCTGGCAT	710-684
730S	5'-CCGCCTCTGATACCCTGAGAGAAGT	730-754
867AS	5'-AATCCTTTTGACCTCTGGCA	867-848
914S	5'-CCATGCCCTAGTCTCTCAGGGCTAT	914-938
GRKS	5'-CTGGTGGCTGGCGTTTATAT	31-50 of GRK ^a
GRAS	5'-GTGCTGGCGCTTTGATTGAA	350-369 of GRA ^b
GRAAS	5'-CCACACTTCTCTCCACCAAA	887-868 of GRA ^b

^a 文献 [31] より ATG 開始コドンの A を 1 番目として引用。

^b 文献 [34] より granzyme A の配列を引用 (GenBank M133226)。

B-GRK の単離

逆転写 PCR (RT-PCR) 法は、mRNA を成体 ddY マウス (male, SLC, Shizuoka) の脳

全体より抽出した点を除いて、Chen 等の方法に従った [14]。RT-PCR 法により増幅された断片を pBluescriptII KS (+) に挿入し配列を決定した。データベースにより検索した結果、その一つ (B59) はマウス GRK の cDNA と一致した [31]。B59 断片の 5'、3' 両端の残りの部分の cDNA を得るために、マウス脳 cDNA を用いて Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法を行った [35]。3' RACE PCR 法には 730S、914S、AP1、AP2 (Clontech) プライマーを、5' RACE PCR 法には 710AS、480AS、AP1、AP2 プライマーを用いて nested PCR 法を行った。得られた増幅産物は pGEM-T プラスミドに挿入し配列を決定した。

サザンブロットニング法

BALB/c マウスの肝臓より抽出したゲノム DNA 10 µg を各制限酵素により処理した。サザンブロットニング法は、B-GRK の cDNA 断片 (エキソン 4 を含む 600-867 番目) を ³²P で標識し、通常の方法に従って行った [36]。

ゲノム PCR 法

PCR 法はゲノム DNA 12 µg を鋳型とし、104S と 305AS、148S と 344AS の二組の B-GRK のプライマーを鋳型として用いた。いずれか一組のプライマー 20 pmol に 1 × LA Buffer II (Takara, Otsu)、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM dNTP、5 u LA Taq (Takara, Otsu) を加えた。PCR 法は、94°C で 2 分間加温した後、94°C で 30 秒、57°C で 30 秒、72°C で 10 分のサイクルを 30 サイクル行い、最後に 72°C で 10 分間加温した。増幅産物はアガロースゲルによる電気泳動を行った。

B-GRK, GRK, granzyme A mRNA の RT-PCR

RT-PCR 法により、B-GRK 又は GRK (B-GRK/GRK) の組織における発現分布を調べた。ddY マウスの各組織より抽出した 5 µg の RNA から、オリゴ dT を用いて逆転写を行った。得られた産物の 1/25 量を鋳型とし、1 × PCR Buffer I (Perkin-Elmer)、0.2 mM dNTP、5 u AmpliTaq (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA)、プライマー 524S 及び 867AS、20 pmol を加えた。PCR 法は、94°C で 2 分間加温した後、94°C で 30 秒、57°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 30 サイクル行った。増幅した cDNA はアガロースゲル電気泳動により分離し、ナイロンメンブレン (GeneScreenPlus, NEN, Boston, MA, USA) へ転写した。そのメンブレンに対し、T4 polynucleotide kinase により ³²P で標識した 709S プローブのハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、X 線フィルム (Biomax, Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) へ露光した。

脳と脾臓での発現の違いを調べるため、B-GRK と GRK のそれぞれに特異的なプライマーを用いて RT-PCR 法を行った。B-GRK のみを増幅するためには 53S と 710AS を、GRK のためには GMKS と 710AS を、両方を増幅するためには 524S と 710AS をプラ

イマーとして用いた。PCR 法は先に示した条件で行った。

組換え B-GRK 蛋白質の neuro2a での発現

B-GRK が神経細胞系で発現し得るかを調べるため、B-GRK の C 末端に Hemagglutinin (HA) タグを付加し、pED1 プラスミドの actin プロモーターの下流に挿入したプラスミド pED1NGK を作製し、neuro2a 細胞へ導入した [37, 38]。発現効率を上げるために ATG 配列を Glu² の前に開始コドンとして挿入した。HA 配列は His²⁵⁶ と終止コドンの間に挿入した。対照実験として pED1 ベクターのみを導入した系も作製した。形質転換後、neuro2a 細胞は回収し homogenizing buffer (20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (pH 7.4)、2 mM ethylenediamine tetraacetic acid、2 mM 2-mercaptoethanol) 中でホモジェナイズを行った。14,000 rpm で 10 分間遠心分離した後、得られた上清を可溶性画分とした。不溶性の沈殿は 0.1% Tween 20 を含むリン酸バッファー (PBS) を加えて再懸濁した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、ニトロセルロースメンブレン (Trans-Blot、BioRad、Richmond、CA、USA) へ転写し、抗 HA 抗体 (Boeringer-Mannheim、Indianapolis、IN、USA) を用いて免疫染色法を行った。

***In situ hybridization* 法**

胎齢 9.5 (E9.5)、12、14、18 日目、生後 0 (P0)、1、2、5、7、14、28 日齢、11 (11W)、20 週齢の ddY マウスを実験に供した。ether による深麻酔下で胎児もしくは脳を取り出し、ドライアイス中で凍結した。クリオスタットを用いて 20 μm の切片を作製し、3-aminopropyl triethoxy silane でコーティングしたスライドグラス上に載せた。in situ hybridization 法には ³⁵S で標識した RNA もしくはオリゴ DNA プローブを用い、過去の報告に従って行った [14, 39]。RNA プローブには cDNA の 524-867 番目に相当するアンチセンスもしくはセンス配列を、オリゴ DNA プローブには B-GRK cDNA の 266-305 番目 (図 1.1)、GRK cDNA の 3-42 番目に相当する配列を用いた [31]。ハイブリダイゼーション後に洗浄した切片上に NTB-2 乳剤 (Eastman Kodak、Rochester、NY、USA) を塗布し露光した。3 週間後に現像し、thionine で対比染色後、暗視野及び明視野照明下で観察した。

結果

脳に発現する新規セリンプロテアーゼ B-GRK cDNA の同定

セリンプロテアーゼ間で保存されている領域を元に作製したプライマーを用いて、マウ

ス脳 RNA について RT-PCR 法を行い、予想される大きさ (約 450 bp) の増幅産物を得た。それをサブクローニングし配列を決定した結果、うち一つ (B59) がマウス GRK cDNA と一致した [31]。全長の cDNA を得るために、3' 及び 5' RACE を行った。図 1.1A に 5' RACE 法、RT-PCR 法、3' RACE 法により得られた B-GRK の配列を示す。cDNA の全長は 1303 bp であり、その 307-1037 番目は GRK cDNA のエキソン 2-5 と一致した。また 3' 端側の配列 (1038-1303) は GRK のゲノム配列と大部分が一致した。しかし、5' 端側の配列 (1-306) は GRK の cDNA 配列ともゲノム配列とも全く異なっていた (図 1.1A 参照、斜体)。後に記すように適当な翻訳開始コドンが発見できなかったため、RT-PCR 法により得られた cDNA やゲノム DNA の配列を詳細に検討し、図 1.1A の配列に誤りがないことを確認した。

B-GRK の推定されるアミノ酸配列

cDNA の 1-365 番目の配列に認められる 9 個の ATG コドンの中で、オープンリーディングフレームを形成できるのは 363-365 番目の ATG のみである。しかしこの 363 の ATG から翻訳が開始された場合、セリンプロテアーゼ活性に不可欠な N 端の疎水性残基 (IIGG) を欠くことになる [40]。従ってこの mRNA が翻訳されセリンプロテアーゼとして機能するならば、AUG ではない開始コドンを使用していると考えられる。この cDNA をみると、269 に位置する CUG コドン翻訳開始点として使用している可能性が考えられる。その場合、アミノ酸配列は、18 残基のリーダーペプチドを有し、切断後に Ile¹⁹ より始まるプロテアーゼとなると予想された (図 1.1A 参照)。図 1.1B には B-GRK cDNA より推定される N 端側のアミノ酸配列を GRK の配列と共に示した。B-GRK の N 末端から 13 残基のアミノ酸は、GRK と他データベース上の如何なる配列とも一致しなかった。また B-GRK には、GRK を始めとするセリンプロテアーゼの N 末端に認められるシグナル配列が認められなかった。

同一遺伝子からの B-GRK と GRK の択一的転写

B-GRK の配列と共通の、GRK のエキソン 4 に相当する配列のプロープを用いて、マウスゲノムについてサザンプロット法を行った。その結果、全てのレーンにバンドが一本のみ認められた (図 1.2)。このことから B-GRK と GRK は同一の遺伝子に由来しており、異なる開始点より択一的に転写されていると考えられた。この遺伝子の構造を調べるためにゲノム cDNA について PCR 法を行った。プロープとして 104S と 305AS を用いた場合には約 2.3 kbp の増幅産物が得られたが、104S と 344AS を用いた場合には増幅産物が得られなかった (data not shown)。この結果より、B-GRK 特異的な cDNA 配列の最後である 306 番目の A と、GRK との共通部分であるエキソン 2 の最初にある 307 番目の G との間には長いイントロン配列が存在すると考えられた [31]。B-GRK/GRK mRNA の各組織における発現分布を調べるために、共通の部分を増幅

A

```

CTATTCTAAGGCATCAGTATACCCACCTGAAAAAAAAAATGGGTATAAAGACAGCCTCATG      60
ATGTCATGAGAATTAACAGATGAGTACATGCAAAGCACTCAGAGCATGTGCAGACCAAGT      120
ACACAGTAATCGCTAGCAACTATGACACAGCTCTCAAAGGCTTTGGACACATCCCAAAC      180
GTAATTTACCTACAAGGAAGTGCATTCGTCTCAGTTAAGCTGATCACTAAAATGGGCTAC      240
CTTTCCAGGGAATAGCGTCAGAAAGGCTGGAGCACAGAGCAGTGTACCAGGCGGTCAG      300
      L E H R A V F T R R S      11
CACTCAGTTTCCATACTGAAATTATTGGAGGGAGGGAAGTCCAGCCGCATTCCAGGCCAT      360
A L S F H T E I I G G R E V Q P H S R P      31
TTATGGCGTCCAATACTGAAATTATTGGAGGGAGGGAAGTCCAGCCGCATTCCAGGCCAT      420
F M A S I Q Y R S K H I C G G V Q I H P      51
AGTGGGTGCTAACAGCCGCCACTGCTACTCTTGGTTTCCAGAGGCCACTCTCCCACCG      480
Q W V L T A A H C Y S W F P R G H S P T      71
TGGTTTTAGGAGCACATTCTCTTTCCAAGAATGACGGGATGAAGCAGACATTTGAAATTA      540
V V L G A H S L S K N E P M K Q T F E I      91
AAAAGTTCATCCCATTCTCACGACTTCAGTCCGGTTCCGCATCGCATGACATCATGCTGA      600
K K F I P F S R L Q S G S A S H D I M L      111
TAAAGCTTCGCACTGCTGCAGAACTAAACAAGAATGTCCAACCTGCTTCACTGGGATCCA      660
I K L R T A A E L N K N V Q L L H L G S      131
AAAACCTATCTTAGAGATGGGACCAAATGCCAGGTGACTGGCTGGGGAACCACCAAGCCAG      720
K N Y L R D G T K C Q V T G W G T T K P      151
ATCTGTAAACCGCCTCTGATACCCTGAGAGAAGTCACTGTTACCATCATAAGTAGAAAAC      780
D L L T A S D T L R E V T V T I I S R K      171
GCTGTAACAGCCAAAGCTACTACAACCACAAACCTGTTATAACCAAGGACATGATATGTC      840
R C N S Q S Y Y N H K P V I T K D M I C      191
CAGGAGATGCCAGAGGTCAAAGGATTCCTGCAAGGGTGACTCTGGTGGCCCTTTGATCT      900
A G D A R G Q K D S C K G D S G G P L I      211
GCAAAGGCATCTTCCATGCCCTAGTCTCTCAGGGCTATAAATGTGGCATCGCCAAAAGC      960
C K G I F H A L V S Q G Y K C G I A K K      231
CTGGAATCTATACGCTATTAATAAGAAATACCAGACCTGGATCAAAGCAAGCTTGCCC      1020
P G I Y T L L T K K C Q T W I K S K L A      251
CATCACGTGCACATTGAGATTGCACATTGAGATTTTCTGGATCTGCCAGTCACTTGCTT      1080
P S R A H *      256
CTTTTTCCAGGATGCGCTTGCAGACCTGGCGTCTCTTCAGAGGCAGCTGGCTATAGGGA      1140
GGGCATGGAGCAGCTGGGATGGATTTCTGTTTCTCAGAAATTCATTTAGTTAGGGAGCCA      1200
TGCTCTTTTTTTCACGTGTATTAATGATTTGTTTTTACTGTGTTTCGTTTCATCCTAAATAAA      1260
ATGTGGACGTCTGTGTTTGTCTGCATGGATGTCAAGAAACATC      1303

```

B

```

MB-GRK  -----LEH RAVFTRRSAL SFHTEIIGGR EVQPHSRPFM ASYQYRSKHI  43
          |           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
GRK      MRFSSWALVS LVAGVYMSSE CFHTEIIGGR EVQPHSRPFM ASYQYRSKHI  50

```

図 1.1 B-GRK の配列. (A) B-GRK の cDNA 配列と予想されるアミノ酸配列. GRK の配列と異なる部分は斜体で示す. セリンプロテアーゼ活性に必須の 3 残基のアミノ酸は太字で示す. オープンリーディングフレーム内の最初の ATG コドン (363-365) とポリ A 付加配列の AATAAA は下線で示す. (B) B-GRK と GRK の N 端側配列の比較.

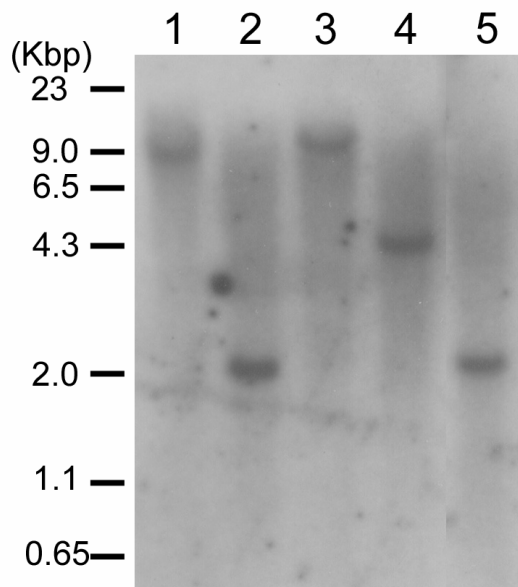


図 1.2 B-GRK 遺伝子のサザンプロット法による解析. 10 μ g のゲノム DNA を *Apa*I (レーン 1)、*Eco*RI (レーン 2)、*Fba*I (レーン 3)、*Hind*III (レーン 4)、*Pst*I (レーン 5) で切断し、エキソン 4 に相当するプローブを用いてサザンプロット法を行った.

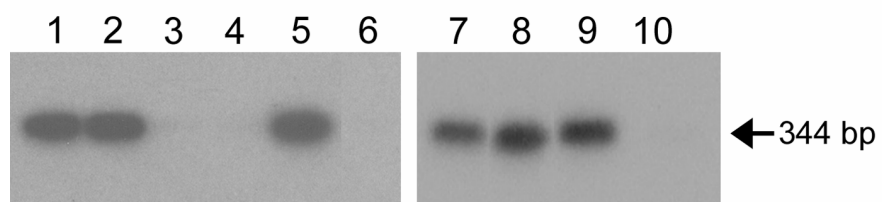


図 1.3 B-GRK/GRK の発現している組織.

524S と 867AS を用いて以下の組織の RNA より RT-PCR 法を行い、サザンプロット法により解析した. 脾臓 (レーン 1)、肺 (レーン 2)、目 (レーン 3)、顎下腺 (レーン 4)、小腸 (レーン 5)、心臓 (レーン 6)、大脳皮質 (レーン 7)、海馬 (レーン 8)、間脳 (レーン 9)、小脳 (レーン 10).

するプライマーを用いて RT-PCR 法を行った。その結果、脾臓、肺、小腸で発現が認められた (図 1.3)。脳内では大脳皮質、海馬、間脳で発現が認められた。一方で、小脳、心臓、顎下腺には発現が認められなかった。

脾臓においては、GRK の高い発現が既に報告されている [28]。そのため、3 組のプライマーを用いて、2 つの転写産物の発現を脳と脾臓とで比較した。その結果 B-GRK は脳においてのみ発現が認められた (図 1.4)。GRK は脳と脾臓に発現が認められたものの、脳では発現が弱かった。当然ながら共通領域部分は脳、脾臓ともに増幅された。

neuro2a 細胞での組換え B-GRK の発現

HA タグを挿入した組換え B-GRK を neuro2a 細胞へ発現させた。遺伝子導入から 48 時間後に細胞を回収し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びウェスタンブロッティング法により可溶性画分、不溶性画分を分析した。その結果、不溶性画分にのみ約 30 kDa の陽性シグナルが検出された (図 1.5)。pED1NGK プラスミドのみを導入した細胞では、シグナルは検出されなかった。30 kDa という分子量は、HA タグを挿入した B-GRK のアミノ酸配列から予想される値 (29,179 Da) と一致していた。この結果より、B-GRK mRNA は翻訳され得ること、neuro2a 細胞においては可溶性蛋白質ではなく、膜結合型蛋白質として翻訳されることが示唆された。

B-GRK/GRK の前脳及び視床下部での発現

B-GRK/GRK mRNA の発現をより詳細に検討するために、両方の mRNA を認識する RNA プロブを用いて in situ hybridization 法を行った。成体マウスの脳では、陽性シグナルは前脳と視床下部に認められた (図 1.6)。RNA プロブの特異性については、センスプロブを用いて対照実験を行い、シグナルが観察されないことを確認した (図 1.6G)。前脳でもっとも強いシグナルが認められたのは分界条床核であった (図 1.6A)。海馬 CA1-CA3 領域の錐体細胞層や中心及び内側扁桃核にも陽性シグナルが認められた (図 1.6F)。視床下部においては、視交叉上核に強いシグナルが認められたほか (図 1.6A 参照)、内側視索前野にも疎らな発現が認められた (図 1.6B)。より尾側では、室傍核の小細胞性領域と室周囲核にシグナルが認められた (図 1.6E)。対照的に室傍核の大細胞性領域にはシグナルは認められなかった。B-GRK/GRK 発現細胞は弓状核や腹内側核の腹側部にも存在していた (図 1.6F 参照)。しかし尾側の脳幹には陽性シグナルは認められなかった (data not shown)。また B-GRK、GRK それぞれに特異的なオリゴ DNA プロブを用いて in situ hybridization 法を行った結果、視床下部において B-GRK mRNA の方が GRK よりも強く発現していることが示された (図 1.6C、D)。

マウスの脳の発生過程においては、B-GRK/GRK の発現が最初に認められるのは胎齢 18 日目であった (図 1.7A、B)。図 1.7B に示すように、陽性シグナルは視床下部、

海馬、扁桃体に認められており、この段階で既に生体の脳において観察される全ての領域で B-GRK/GRK は発現していることが示された。それだけでなく、B-GRK/GRK の発現は胎齢 18 日目では大脳皮質にも認められた。大脳皮質における発現は生後 7 日目まで継続したが、生体では観察されなかった (図 1.7C-E)。松果体と下垂体前葉でも、胎齢 18 日目において B-GRK/GRK の陽性シグナルが観察された (図 1.7A、B 参照)。

考察

PCR 法を用いることにより、新規セリンプロテアーゼ B-GRK の cDNA を単離した。B-GRK は GRK とは異なる開始点より択一的に転写されており、結果として 5' 末端部分に異なる配列を有する。GRK はラットの白血病ナチュラルキラー細胞 (RNK-16) より精製された [28]。ナチュラルキラー細胞での役割は、他の granzyme ファミリーのプロテアーゼや perforin と共に標的細胞を溶解することだと考えられている [26、27]。その活性については、合成基質を用いた試験により Lys 及び Arg の C 末側を切断する trypsin 様活性を有することが明らかとなっている [32、33]。B-GRK は GRK とよく似た構造であるため、同様なプロテアーゼ活性を有すると考えられる。しかしながら B-GRK は、mRNA の 5' 端の配列が GRK と異なるために N 末の疎水性領域を欠いており、そのため HA タグを付加した組換え B-GRK 蛋白質は細胞の可溶性画分に認められなかった。このことから B-GRK は細胞外へ分泌されたり、細胞質内に放出されたりして働くのではないと考えられる。

以下の 3 つの点から、脳において GRK 遺伝子から主に転写されているのは B-GRK であると考えられた。(1) 脳 RNA より 5' RACE 法を行った結果、増幅されたのは全て B-GRK cDNA であった。(2) 脳 RNA を用いた RT-PCR 法により増幅された cDNA のシグナルは、B-GRK の方が GRK よりも強かった。(3) オリゴプローブを用いた in situ hybridization 法を行った結果、B-GRK の陽性シグナルの方が強かった。また、陽性シグナルが前脳や視床下部の核に認められ、且つその核を構成する比較的大きな細胞体上に存在していたことから、B-GRK/GRK はグリア細胞ではなく神経細胞に発現していると考えられた。B-GRK の機能については多くの可能性が考えられる。視床下部や分界条床核には多くの神経ペプチド性神経細胞やその終末が存在している。特に B-GRK/GRK mRNA の発現の認められた領域は CRF、substance P、somatostatin といった神経ペプチドの発現領域と良く一致している。CRF 陽性神経細胞や神経線維は視床下部の室傍核、視索前核、前乳頭核や分界条床核、中心扁桃核に存在している [41]。substance P は視床下部の視索前核、腹内側核、外側核、弓状核、前乳頭核で

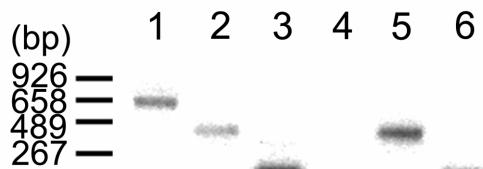


図 1.4 脳 (レーン1-3) と脾臓 (レーン4-6) におけるB-GRK、GRKの発現. B-GRKに特異的なプライマーペア (53S と 710AS、レーン1、4) を用いてPCR法を行った結果、脳にのみシグナルが認められた. GRK 特異的プライマーペア (GRKS と 710AS、レーン2、5) を用いた際には、脳に認められたシグナルの強度は弱く、脾臓の方が強かった. B-GRK と GRK で共通の領域は (524S と 710AS、レーン3、6) 脳、脾臓の両方で増幅された.

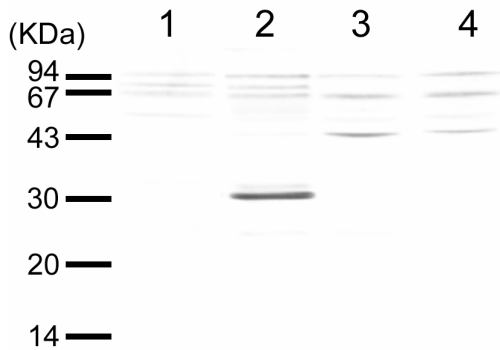


図 1.5 組換え B-GRK 蛋白質の neuro2a 細胞における発現. neuro2a 細胞に pED1NGK (レーン1、2) または pED1 ベクター (レーン3、4) を導入した. 細胞は回収後、ホモジェネートを行い、可溶性画分 (レーン1、3) と不溶性画分 (レーン2、4) とに分画し、抗 HA 抗体を用いてウェスタンブロットティング法を行った. 組換え蛋白質はレーン2にのみ認められた.

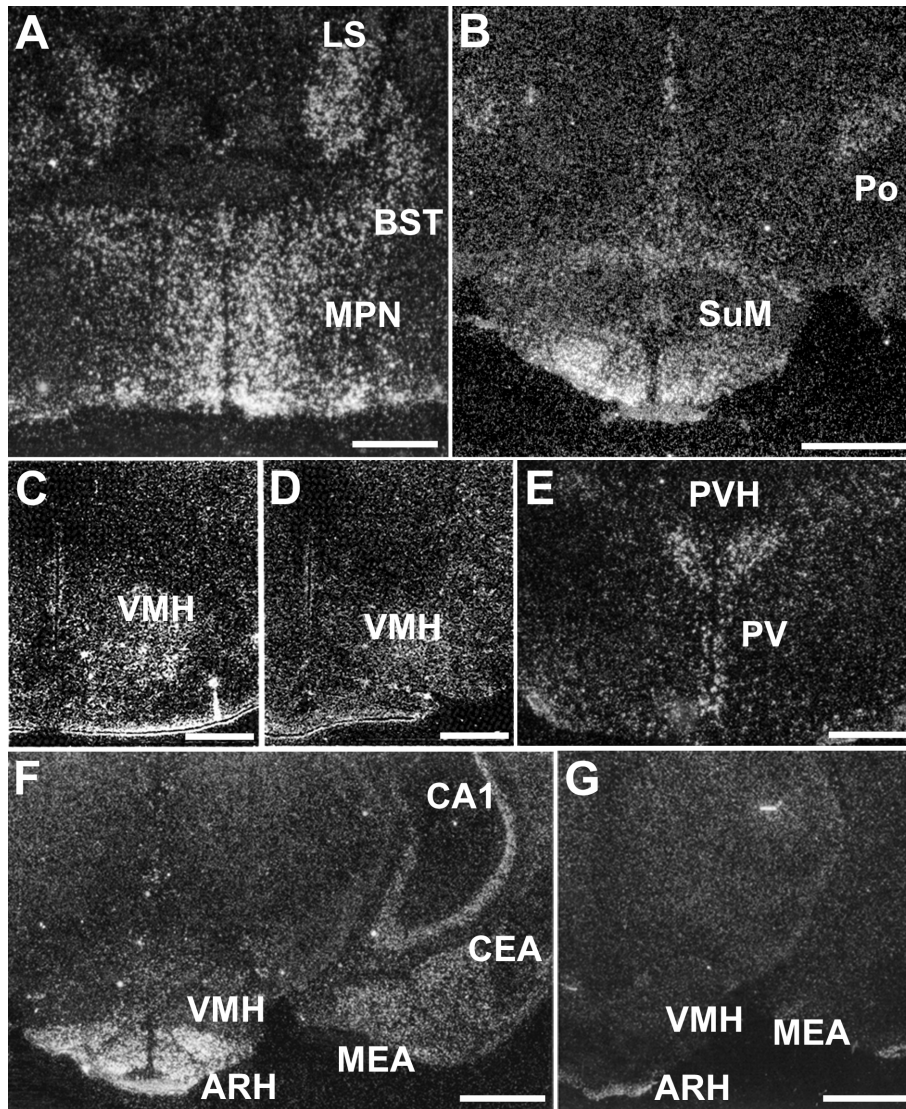


図 1.6 成体マウス脳内での B-GRK/GRK mRNA の発現. *in situ hybridization* 法を行った結果、シグナルは外側中隔核 (LS)、分界条床核 (BST)、内側視索前野 (MPN) に認められた。(B) シグナルは視床後核 (Po)、上乳頭核 (SuM) にシグナルが認められた。(C、D) B-GRK (C)、GRK (D) それぞれに特異的なオリゴプローブを用いた実験で腹内側核 (VMH) に認められたシグナル。(E) B-GRK/GRK は視床下部において室傍核 (PVH)、室周囲核 (PV) にも発現が認められた。(F、G) 後視床下部領域、海馬、扁桃核において、アンチセンスプローブを用いた際にはシグナルが認められたが (F)、センスプローブでは認められなかった (G)。ARH、弓状核; CA1、海馬 CA1 領域; CEA、中心扁桃核; MEA、内側扁桃核。Bar = 500 μ m (A、B、E)、250 μ m (C、D)、1 mm (F、G)

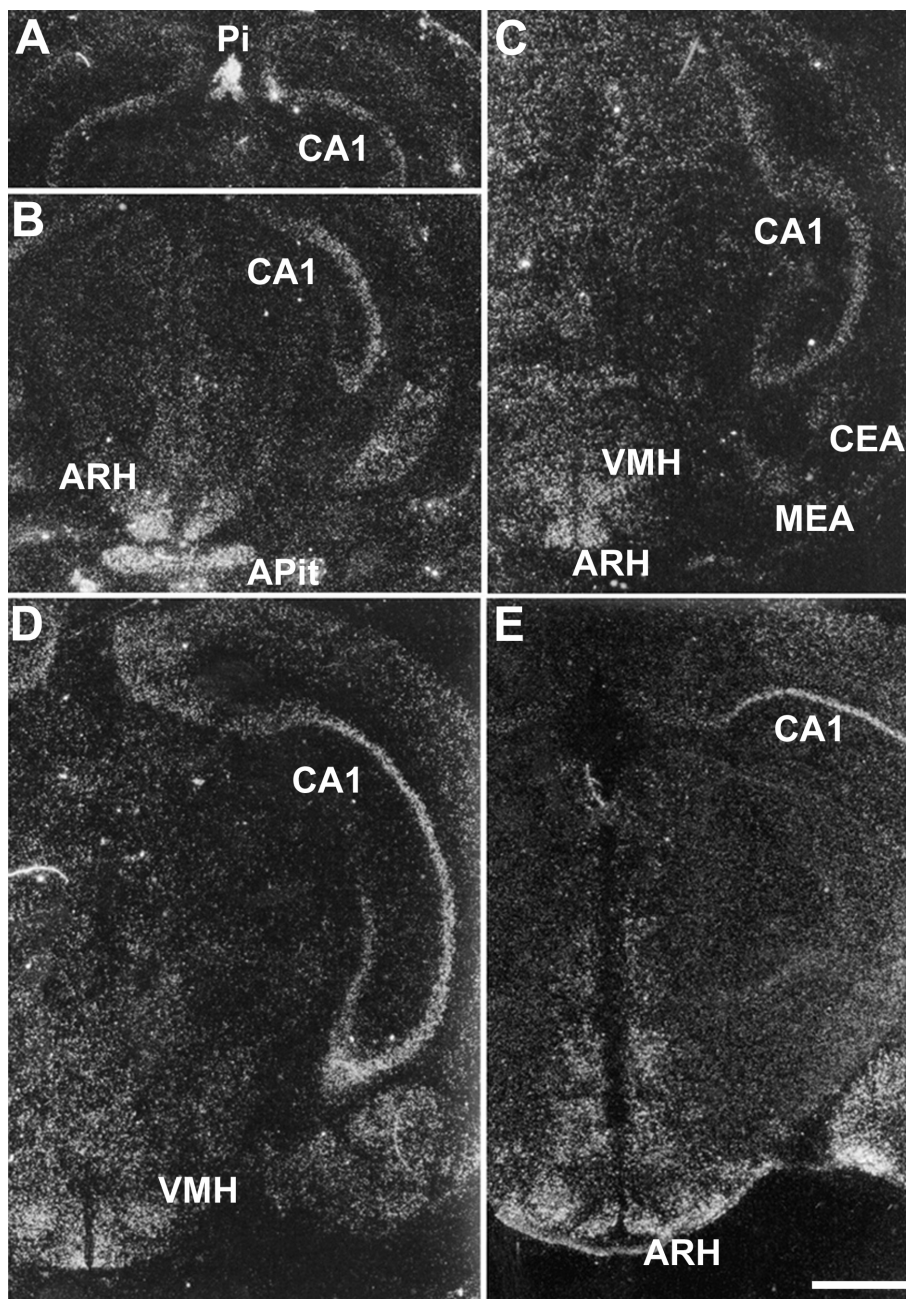


図 1.7 発生段階での B-GRK/GRK の発現.胎齢 18 日目 (A、B)、生後 2 日目 (C)、生後 7 日目 (D)、11 週齢 (E). Pi、松果体; APit、下垂体前葉. Bar = 1 mm.

発現している [42]。somatostatin は室周囲核、弓状核に加え、視床下部の前外側領域のいたるところに分布している [43]。さらに発生過程での発現時期についても、B-GRK/GRK とこれらの神経ペプチドとの間には一致が認められる [44-46]。B-GRK/GRK は発生過程で一過的に松果体と下垂体で発現していた。松果体の発現細胞は、メラトニンの放出をつかさどる松果体細胞である可能性が考えられた。下垂体においては、B-GRK/GRK mRNA は前葉に発現していることから、内分泌細胞における発現が示唆された。これらの分泌性組織もまた、ペプチド性の制御や支配を受けている [47]。以上の点より、B-GRK は神経ペプチドのプロセッシングや分解に参与しているのではないかと推察される。B-GRK の機能についての他の可能性としては、 β -amyloid のような蛋白質の分解が上げられる。実際に脳内での β -amyloid 及び β -amyloid precursor protein の分解経路への trypsin 活性を有するプロテアーゼの関与が報告されている [25, 48, 49]。

ヒトの GRK 前駆体の結晶構造について X 線解析が行われ、GRK が His-Asp-Ser による活性中心を形成することが立体構造上からも確認された [50]。またその立体構造より GRK が非常に特異性の高い活性を有することが予想されたが、このことは、GRK が切断し得ることが報告されている基質が合成基質 Z-Lys-SBzl, Z-Arg-SBzl 及び 13 残基から成るオリゴペプチド Cys-Gly-Tyr-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Gly-Gly のみであり非常に限られていることと矛盾しない [32, 33, 51]。B-GRK が神経ペプチドやその前駆体中の Lys や Arg の C 末側を切断するかは今後検討すべき課題である。結晶構造の解析でも確認されているが、GRK の内在性の阻害因子として bikunin を含む inter- α -trypsin inhibitor が報告されている [32, 51]。bikunin の mRNA は脳にも発現しており、海馬、大脳皮質、下垂体といった部位で B-GRK/GRK mRNA の発現と一致している [52]。しかし一方で、B-GRK/GRK mRNA の発現が強く認められた視床下部では bikunin mRNA の発現は認められておらず、部位特異的な阻害因子の発現や活性の調節機構が存在している可能性がある。

B-GRK cDNA の 5' 末端の配列は GRK と異なっていた。この配列の存在するゲノム上の位置を PCR 法を用いて調べようと試みたが、増幅は成功しなかった。恐らく 10 kbp 以上と思われる長いイントロン領域があるか、ゲノム DNA が複雑な 3 次元構造を形成しているのであろう。それにも関わらず図 1.4 に示したように 5' RACE 法及び RT-PCR 法により、B-GRK が択一的な開始点より転写されていることが示されている。B-GRK 以外にも、択一的な転写産物を生じるセリンプロテアーゼは報告されている。Wiegand 等は脳内に存在する新規の trypsinogen cDNA である trypsinogen IV を、Nyaruhucha 等は mesotrypsinogen の cDNA を単離した [48, 53]。これら 2 つの trypsin に関連した蛋白質は共通の C 端を有しているため、同じ遺伝子に由来しており択一的なスプライシングにより生じていると考えられる。B-GRK と同じ granzyme ファミリーに属する granzyme A や granzyme B についても択一的なスプライシングが報告されている [54]、

55]。以上のように、択一的な転写産物の生成はセリンプロテアーゼではよく見られる現象であるといえる。脾臓では全く認められなかったにも関わらず、脳内では B-GRK の方が主要な mRNA であったことから、脳特異的な転写メカニズムの存在が示唆される。

B-GRK cDNA 上には適当な位置に翻訳開始シグナルとなり得る ATG が存在しなかった。しかし AUG の代わりに CUG が開始コドンとなり得ることが報告されている [56、57]。ただし CUG が翻訳開始点となるには、隣接した領域に G^{+4} と pyrimidine⁻³ が必要である。B-GRK の配列はこの条件を満たしている。trypsinogen IV についても同様の報告があり、AUG 以外のコドンが翻訳開始点となっていることが示唆されている [48]。N 端に異なるエキソンが存在するため、B-GRK は細胞外へ放出される蛋白質が共通して有しているシグナル配列を欠いている。既に考察したように、HA タグを付加した B-GRK は細胞の不溶性画分に存在しており、可溶性画分には認められなかった。このプロテアーゼの輸送がどの様に行われ、どの様な機能を果たしているのかについては、今後検討の必要がある。

当研究により新規セリンプロテアーゼである B-GRK が同定され、その mRNA は脳に特異的に発現することが明らかとなった。転写は択一的な機構により行われていることが示され、その蛋白質が発現可能であることも確認された。mRNA の発現は特に視床下部や分界条床核に強く、また発生過程で松果体や下垂体に発現が認められたことから、ペプチドのプロセッサンへ関与している可能性が示唆された。

第二章 アルツハイマー病の画像診断を目的としたプローブ化合物 BF-108 の開発

序論

アルツハイマー病 (AD) は進行性の老人性痴呆症であり、その患者数は日本国内でも増加している。老人斑 (SP) は AD における最も特徴的な病理像の一つであり、凝集化したアミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) を主要な構成成分としている [58]。SP の沈着は若干の痴呆症状が認められる AD の早期段階はもちろん、痴呆症状の全く認められない前臨床段階であっても既に多く生じていることが報告されている [59、60]。また、このような前臨床段階では神経細胞の脱落や脳組織体積の減少は起こっていない [61]。一方で、現在アルツハイマー病の診断のほとんどは臨床診断によって行われているが、臨床症状が顕在化した段階では、神経細胞の脱落はかなり進行してしまっている。このことから、脳内の $A\beta$ 沈着を陽電子放出断層撮影法 (PET) や単一光子放射型コンピュータ断層撮影法 (SPECT) により非侵襲的に検出することができれば、AD の早期段階、さらには前臨床段階でも診断が可能となるはずであり、その後の治療も有効に行えると考えられる。しかしながら現在のところ、老人斑の検出による AD の画像診断は実現していない。

PET や SPECT により $A\beta$ 沈着を検出するためには画像診断用のプローブを使用することになるが、当然のことながら凝集化 $A\beta$ に対して高い親和性を有する必要がある。また PET プローブはラジオアイソトープ (RI) による標識が必要であるため、患者の被爆量を考慮すると投与量はより低いほうが望ましい。そのためにはより高い脳移行性、つまりより高い血液 - 脳関門 (BBB) 透過性が求められる。低分子量化合物の BBB 透過性を改善するためには、脂溶性を高くすれば良いことが知られている [62]。これらの *in vitro* での特性に加えて、画像診断用プローブは *in vivo* 条件下で $A\beta$ プラークへ結合できなければならない。以上のような特性を有する理想的なプローブが開発されれば AD の早期診断のみならず、存命中の患者に認められる神経病理変化の追跡調査も行うことができるであろう。さらには AD 治療薬の投与前後で脳画像を撮像することにより、治療薬の効果に対する評価も可能となり、アルツハイマー病治療薬の開発にも非常に有効な手段となるはずである。

今回の実験では、3-diethylamino-6-(2-fluoroethyl)ethylaminoacridine (BF-108) が AD 画像診断用プローブとして有望な候補であるかを評価した。まず *in vitro* において、この化合物が凝集化 $A\beta$ に対して高い親和性を有するか、また高い脂溶性を有するか

について、Thioflavin T (ThT) アッセイ法と水/octanol 分配係数 (P_C) 試験を用いて評価した。次いで BBB を透過し *in vivo* でも $A\beta$ へ結合し得るかを、扁桃体に凝集化 $A\beta$ を注入したラットモデルへ静脈内投与を行うことにより調べた。 $A\beta$ ペプチドのみならず、AD 患者脳切片上の老人斑への結合性も観察した。さらに変異ヒト amyloid-precursor protein (hAPP) を導入した APP23 トランスジェニックマウスへの静脈内投与試験により、*in vivo* における内在性 $A\beta$ プラークへの結合も調べた。最後にポジロン標識体の BF-108 を ^{18}F で標識した [^{18}F] BF-108 を正常マウスへ投与することにより、脳内への移行性を評価した。

材料と方法

BF-009 及び108

BF-009 は蛍光を有する橙色の結晶であり、PBS (8.0 mg/ml NaCl, 1.15 mg/ml Na_2HPO_4 , 0.2 mg/ml KCl, 0.2 mg/ml KH_2PO_4 , pH 7.4) に 4 mg/ml で、有機溶媒にはそれ以上の濃度で溶解した。PBS に溶解した際の最大吸光波長、励起波長、蛍光波長はそれぞれ 499、500、525 nm であった。BF-108 も蛍光を有する橙色の結晶であり、PBS に 3 mg/ml で、有機溶媒にはそれ以上の濃度で溶解した。PBS に溶解した際の最大吸光波長、励起波長、蛍光波長はそれぞれ 495、496、525 nm であった。BF-009 及び-108 は Tanabe R&D service (Osaka) により合成された。

ThT 法

$A\beta_{40}$ ペプチド (Lot. 49703, Peptide Institute, Osaka) を 20 μM となるように 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) に溶解し 37°C にて 4 日間インキュベートし、使用前に超音波処理を行った [63]。Acridine orange (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 等の試験化合物は 0.03-10 μM となるように potassium phosphate buffer に溶解し、 $A\beta_{40}$ 溶液を 5 μM となるよう加えた。室温で 15 分間インキュベートした後、100 mM glycine buffer (pH 8.5) に ThT (Wako, Osaka) を 3 μM となるよう加えた [64]。室温で 30 分間インキュベートした後、凝集化 $A\beta$ と結合した ThT の蛍光を励起波長 442 nm、蛍光波長 485 nm のフィルターを使用しマイクロプレートリーダー F max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) により測定した [65]。試験化合物を加えないときの蛍光強度を 100%とし、試験化合物が $A\beta$ に対して結合することによる ThT- $A\beta$ 結合への阻害を評価した。3 回の独立した試験を行い、SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて log 曲線より 50%阻害濃度 (IC_{50}) 及び 95%信頼区間を算出した。2-(1-{6-[(2-fluoroethyl)-methylamino]-2-naphthyl} ethylidene) malononitrile

(FDDNP) [66] 及び 1,4-bis[2-(3-carboxy-4-hydroxyphenyl) ethenyl]-benzene disodium salt (X-34) [67] は Tanabe R&D service (Osaka) により合成された。

***P_C* 試験**

試験に用いる前に 1-octanol (Wako, Osaka) は PBS で、PBS は 1-octanol でそれぞれ飽和させた。その飽和 PBS に試験化合物を 2-100 μ M となるよう溶解し、等量の飽和 1-octanol を加え室温で 30 分間振盪した。2,000 rpm で 15 分間遠心分離後に水相を分取し、マイクロプレートリーダー Spectra max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) により各試験化合物の最大吸光波長における吸光強度を測定した。振盪前の水槽の吸光強度から振盪後の値を差し引いた値を油層に移行した分と考え、この油層の値を振盪後の水相の値で割ったものを P_C 値とした。3 回の独立した試験により、平均 \pm 標準偏差 (SD) を算出した。

***A β* 注入ラットモデル**

試験には Wister ラット (male, 200-250 g, SLC, Shizuoka) を用いた。A β 40 ペプチド (Lot. 49703, Peptide Institute, Osaka) を 500 μ M となるように 50 mM potassium phosphate buffer に溶解し 37°C にて 4 日間インキュベートした。既報にある方法を元に A β を注入した [68]。簡単に記すと、処置は sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) による麻酔下で行った。A β は定位脳手術装置 (Model 5000, David Kopf, Tujunga, CA, USA) を用いて一側に注入し、反対側には potassium phosphate buffer を注入した。注入は頭蓋表面及び十字縫合を基準に体軸方向に - 3.0 mm、内外方向に \pm 5.0 mm、背腹軸方向に - 8.8 mm の位置をアトラスを参考に決定した [61]。超音波処理を行った A β 1.0 μ l をマイクロシリンジとガラス製カニューレ (先端直径 170-250 μ m) を使用し 2 分以上かけて注入した (流速、約 0.5 μ l/min)。A β 及び buffer を注入してから 3 日後に、試験化合物を以下の条件で、大腿静脈より ether 麻酔下で投与した。すなわち BF-009 及び -108 は生理食塩水に溶解後に 4 mg/kg となるように、FDDNP は 10% dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解後に 4 mg/kg となるように、X-34 は 10% DMSO に溶解後に 20 mg/kg となるように投与した。試験化合物の投与から 60 分後に sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) による麻酔下で、10% formalin neutral buffer solution (pH 7.4, Wako, Osaka) を用いて灌流固定を行った。ラットより脳を摘出して、20% sucrose 中で凍結保護を処した後に粉末状のドライアイス中で凍結した。クリオスタット - ミクロトーム (HM-500M, Carl Zeiss, Tokyo) により 15 μ m の切片を作製し、FluorSaveReagent (Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) を用いて封入し、蛍光顕微鏡下で観察した。

X-34 を投与したラットの脳切片は、検鏡後に同一切片を 10% DMSO に溶解した 100 μ M X-34 溶液中で 10 分間染色した。その後、再度蛍光顕微鏡下で観察し、注入部位

に A β の沈着が存在していることを確認した。

神経病理変化

実験に使用したのは病理所見より AD であると確認された 97 歳、88 歳女性患者の側頭葉、79 歳女性患者の海馬、93 歳の正常加齢の女性の側頭葉であり、福祉村病院 (Aichi) より供与された。これらを用いた実験はヘルシンキ宣言に沿って行われた。パラフィン包埋された組織ブロックより 6 μ m の切片を作製し、スライドガラス上に載せた。切片は xylene、ethanol 系列、流水で洗浄し、10% formalin neutral buffer solution 中に 60 分間浸漬した。PBS 中で洗浄した後、lipofuscin の自家蛍光を抑えるために 0.25% potassium permanganate solution 中で 90 分間漂白した。次いで PBS で洗浄し、0.1% potassium metabisulfite/0.1% oxalic acid に 90 秒浸漬した。消光した切片は PBS で洗浄後に 40% ethanol に溶解した 100 nM BF-108 もしくは 0.125% Thioflavin S (ThS) に 10 分間浸漬した。50% ethanol に 2 分間、PBS 中に 60 分間浸漬し分別を行った後、蛍光顕微鏡下で観察した。

蟻酸処理は、切片を 90% 蟻酸に 5 分間浸漬することにより行った。その後流水で 10 分間洗浄し、BF-108 で染色した。

免疫染色法には Amyloid β -protein immunohistostain kit (Wako, Osaka) 及び抗 A β モノクローナル抗体 (4G8, Signet, Dedham, MA, USA または 6F/3D, Dako, Denmark)、抗 Tau モノクローナル抗体 (AT8, Innogenetics N.V., Ghent, Belgium) を用いた。簡単に記すと、パラフィン切片を xylene、ethanol 系列、流水で洗浄した後、blocking solution を滴下した。その後 4G8 (1:100)、6F/3D (1:100)、AT8 (1:200) の何れかを滴下し、インキュベーション後に goat anti-mouse conjugated with biotin を滴下した。streptavidin-biotin peroxidase complex solution を滴下し 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)/0.015% H₂O₂ により可視化し顕微鏡下で観察した。

APP23 トランスジェニックマウスにおける *in vivo* ラベリング

内在性 A β プラークへの *in vivo* における結合能を、18 ヶ月齢の APP23 トランスジェニックマウスを用いて評価した。この APP23 マウスは Swedish 変異 (670/671 KM->NL) を有する hAPP を持つために脳内に多くの A β プラークが形成されるマウスであり [70]、Novartis Pharma 社より供与された。BF-108 を尾静脈より 4 mg/kg となるよう投与し、4 時間後に ether 麻酔下で断頭し脳を摘出し、粉末状のドライアイス中で凍結した。クリオスタット - ミクロトームで 15 μ m の新鮮凍結切片を作製し、一切の分別や洗浄を経ずに蛍光顕微鏡下で観察した。検鏡後に同一切片について 6F/3D (1:100) を用いて免疫染色法を処した。オーバーレイ・イメージは Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) を用いて処理した。対照試験には同月齢の非組換えマウスを用い

た。

蛍光顕微鏡

試験後の切片の蛍光観察には Eclips E800 (Nikon, Tokyo) を用いた。BF-009、-108、FDDNP を用いた切片に対しては、B-2A フィルターセット (励起フィルター 450-490 nm、ダイクロイックミラー 505 nm、ロングパスフィルター 520 nm) を、X-34 を用いた切片に対しては V-2A (励起フィルター 380-420 nm、ダイクロイックミラー 430 nm、ロングパスフィルター 450 nm) を用いた。

[¹⁸F] BF-108 の合成

[¹⁸F] フッ素は CYPRIS HM-18 サイクロトロン (Sumitomo Heavy Industries, Tokyo) 内での ¹⁸O(p,n) ¹⁸F 反応により調製した。陰イオン交換樹脂 (AG1-X8, Bio-Rad) により吸着した後、7.5 mM potassium carbonate (0.3 ml × 2) により溶出し、acetonitrile 3.0 ml に Kryptofix 222 (Merck) 20 mg を溶解した溶液を加えた。さらに 100 mg/ml potassium dihydrogen phosphate 0.05 ml を加え、減圧下で 115°C に加温し helium により水と acetonitrile を除去した。残留物に acetonitrile に溶解した 3-diethylamino-6-(2-tosyloxyethyl)ethylaminoacridine (Tanabe R&D Service, Osaka) 1.0 ml を加え、80°C で 20 分間攪拌した。冷却後、0.01 M phosphate buffer 1.0 ml を加え、HPLC カラム ODS-AQ-323 (10 × 250 mm, YMC, Kyoto) + CAPCEL PAC C18 (10 × 150 mm, Shiseido, Tokyo) へ注入した (CH₃CN/0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 = 60:40; 4.0 ml/min)。溶出液は UV (270 nm) 検出器及び放射活性検出器で観察し、目的の生成物が含まれていた 25-30 分の画分を集め減圧下で半分以下の容量に濃縮した。生成物の放射活性は合成終了時に 250-850 MBq であった。HPLC 分析 (Wakosil-II5C18 HG, 4.6 × 150 mm, Wako, Osaka; CH₃CN/0.01 M sodium phosphate buffer, pH 6.5 = 60:40; 1.0 ml/min; UV 及び放射活性検出器) によると、合成終了時の放射化学純度が >95% であり、最大活性は 33.9 TBq/mmol であった。

正常マウスでの [¹⁸F] BF-108 静注後の組織分布

試験には Slc:ICR マウス (male, 28-32 g, SLC, Shizuoka) を用いた。マウスへ 0.3-0.4 MBq の [¹⁸F] BF-108 を静脈内投与し、2-180 分後に断頭し組織を採材した。bone とは大腿骨である。各組織は質量を測定した後、γ カウンター (Wizard 1480, Turku, Finland) で放射活性を測定した。各組織質量当たりの放射活性値を組織への移行性 (percentage injection dose per gram, %ID/g) とした。各 %ID/g 値は 3 回もしくは 4 回行われた試験の平均 ± SD で表す。

結果

BF-009、-108 の A β への親和性と脂溶性

A β へ結合すると蛍光を発する ThT を用いて、試験化合物の A β -ThT 結合に対する競合阻害濃度を測定し A β への親和性を評価した。約 2,000 の化合物について A β への親和性を評価した結果、Acridine orange が A β に対して比較的高い親和性を有することがわかった (図 2.1)。FDDNP は A β へ結合し得る PET プローブとして報告されている化合物であるが [71]、Acridine orange はその FDDNP よりも低い IC₅₀ 値を示した (表 2.1)。次いで脂溶性を評価するために、Acridine orange の P_C を測定した。Acridine orange の P_C は FDDNP よりも高かったが、BBB を透過するために適切な範囲 (10^{0.9} - 10^{2.5}) までは至らなかった [72]。脂溶性を改善するために、Acridine orange 誘導体である BF-009 が合成された (図 2.1 参照)。Acridine orange が 2 つの dimethylamino 基を有していたのに対し、この誘導体は 2 つの diethylamino 基を有する。BF-009 の脂溶性は Acridine orange に比べ大きく改善されたが、BBB を透過するために適切な範囲を若干超えていた (表 2.1 参照)。将来 PET で使用する際にポジロン核種の中では比較的長い半減期を有する ¹⁸F により標識することを考え、フッ化誘導体である BF-108 の性質を評価した (図 2.1 参照)。BF-108 の P_C は BF-009 より低くなり、適切な範囲内に収まった。また FDDNP と比較しても、BF-108 はより低い IC₅₀ とより高い P_C を有していた。

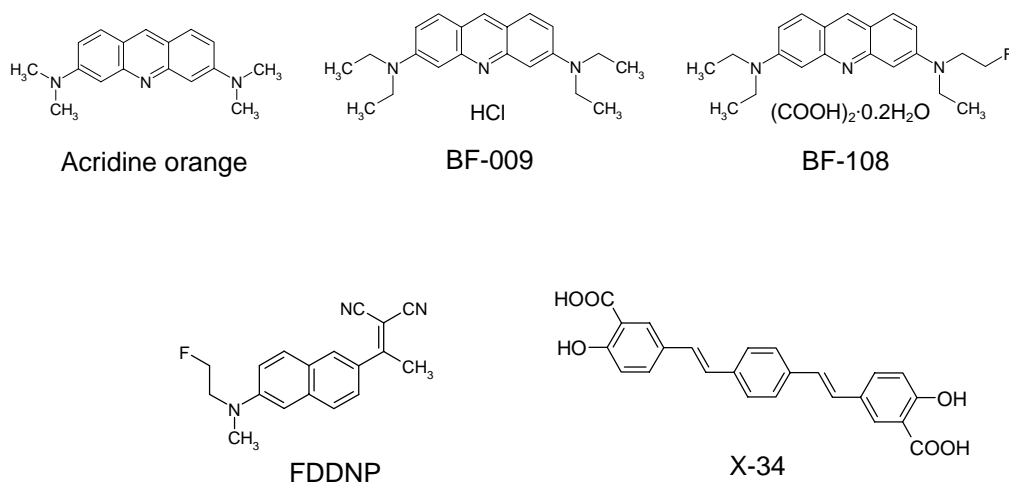


図 2.1 Acridine orange、BF-009、BF-108、FDDNP、X-34 の化学構造式

表 2.1

Acridine orange, BF-009, BF-108, FDDNP, X-34 の IC₅₀ 及び P_C

試験化合物	IC ₅₀	P _C
	平均, 95% 信頼区間 (nM)	平均 ± SD
Acridine orange	32, 8 - 63	59 ± 12
BF-009	167, 115 - 224	1028 ± 80
BF-108	135, 68 - 211	362 ± 127
FDDNP	457, 249 - 782	247 ± 125
X-34	452, 331 - 607	3 ± 0.7

ラットモデルを用いた BF-009, -108 の Aβ への *in vivo* での結合性

BF-009, -108 について、静脈内投与後に BBB を透過し、*in vivo* にて凝集化 Aβ へ結合し得るかを、Aβ を脳内に注入したラットモデルを用いて評価した。BF-009 を投与したラットの脳切片を作製したところ、Aβ 注入部位に一致して強い蛍光が観察された (図 2.2A)。一方、対側の buffer 注入部位には蛍光は観察されなかった (図 2.2B)。BF-108 もまた Aβ 注入部位で強い蛍光が観察されたが (図 2.2C)、buffer 注入部位では蛍光は全く観察されなかった (図 2.2D)。脂溶性が高い FDDNP を静脈内投与し、BBB 透過性と *in vivo* での Aβ 結合性を確かめたところ、Aβ 注入部位で強い蛍光が観察され、buffer 注入部位では蛍光は観察されないという BF-009, -108 と同様の結果が得られた (図 2.2E, F)。その一方で、老人斑を染色することが報告されている蛍光性化合物 X-34 [67] をラットモデルへ投与したところ、脳切片上の Aβ 注入部位にほとんど蛍光が認められなかった (図 2.2G)。原因としては、化合物の脂溶性が低く BBB を透過しなかった可能性が考えられた。この点を確かめるため、検鏡後に同一切片を X-34 により *in vitro* で再度染色した。その結果、Aβ 注入部位に蛍光が確認された (図 2.2H)。

BF-108 の老人斑への結合性

合成 Aβ ペプチドへ *in vivo* 及び *in vitro* で結合したことから、BF-108 が内在性の Aβ により形成された老人斑へも結合し得るかを調べた。BF-108 溶液を用いて AD 患者の側頭葉切片を染色した結果、BF-108 の蛍光は老人斑上に認められた (図 2.3A)。この蛍光像は、隣接切片に対して抗 Aβ 抗体を用いて得られた免疫染色像と一致した (図 2.3B)。BF-108 による蛍光像は海馬切片上で neuritic plaque とは一致したが (図

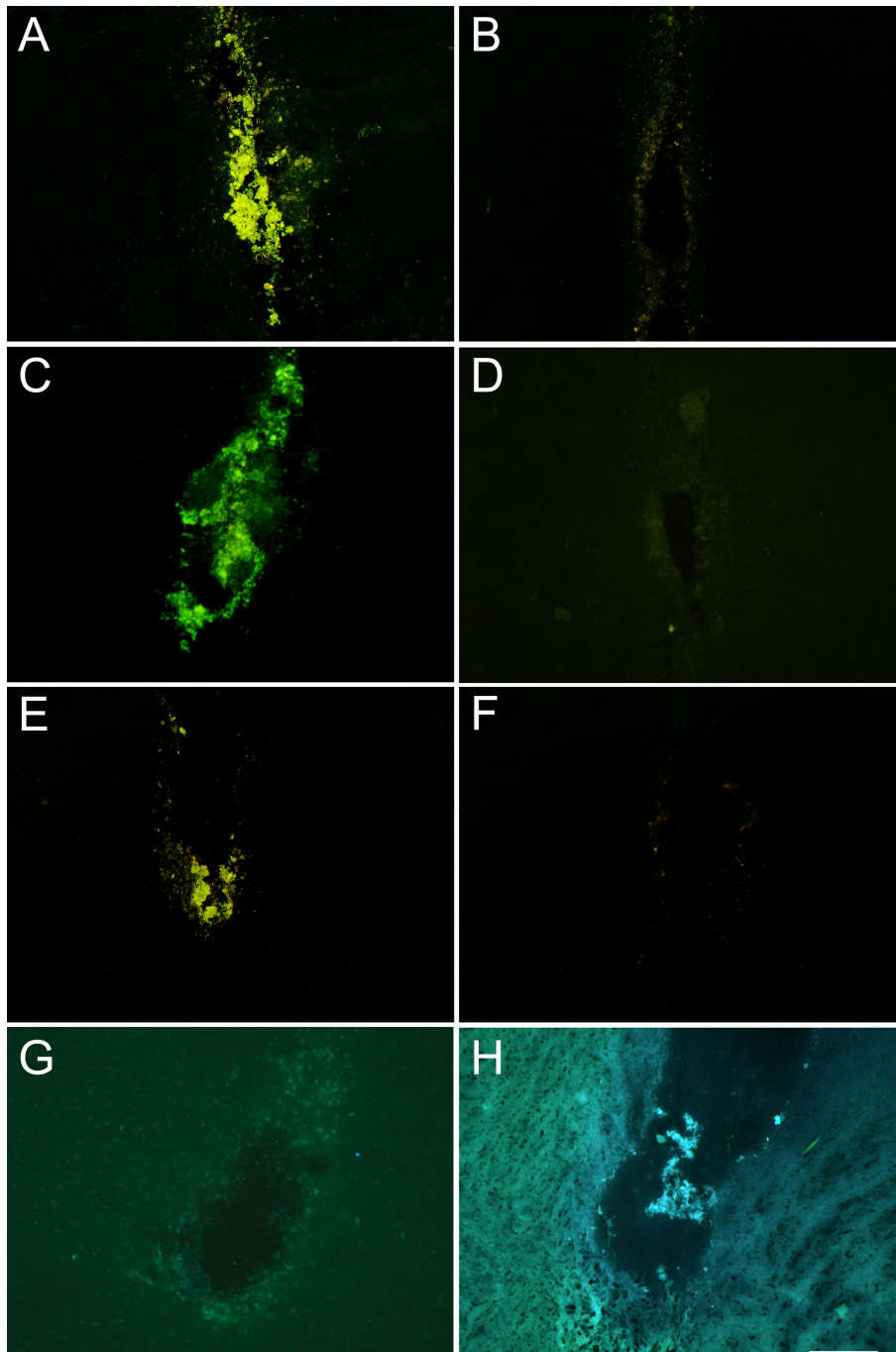


図 2.2 BF-009、BF-108、FDDNP、X-34 を静脈内投与後のラットモデルの脳切片. (A、B) BF-009 が結合したことによる蛍光は扁桃体の A β 注入部位には認められたが (A)、対側の buffer 注入部位には認められなかった. (C、D) BF-108 投与ラットでも化合物の蛍光は A β 注入部位にのみ存在しており (C)、buffer 注入部位にはなかった (D). (E、F) 静脈内投与された FDDNP による蛍光は A β 注入部位でのみ観察され (E)、buffer 注入部位では観察されなかった (F). (G、H) X-34 投与ラットでは A β 注入部位で蛍光がほとんど認められなかった (G). 同一切片を 100 μ M X-34 で *in vitro* で染色した結果、A β 注入部位に蛍光が認められた (H). Bar = 200 μ m.

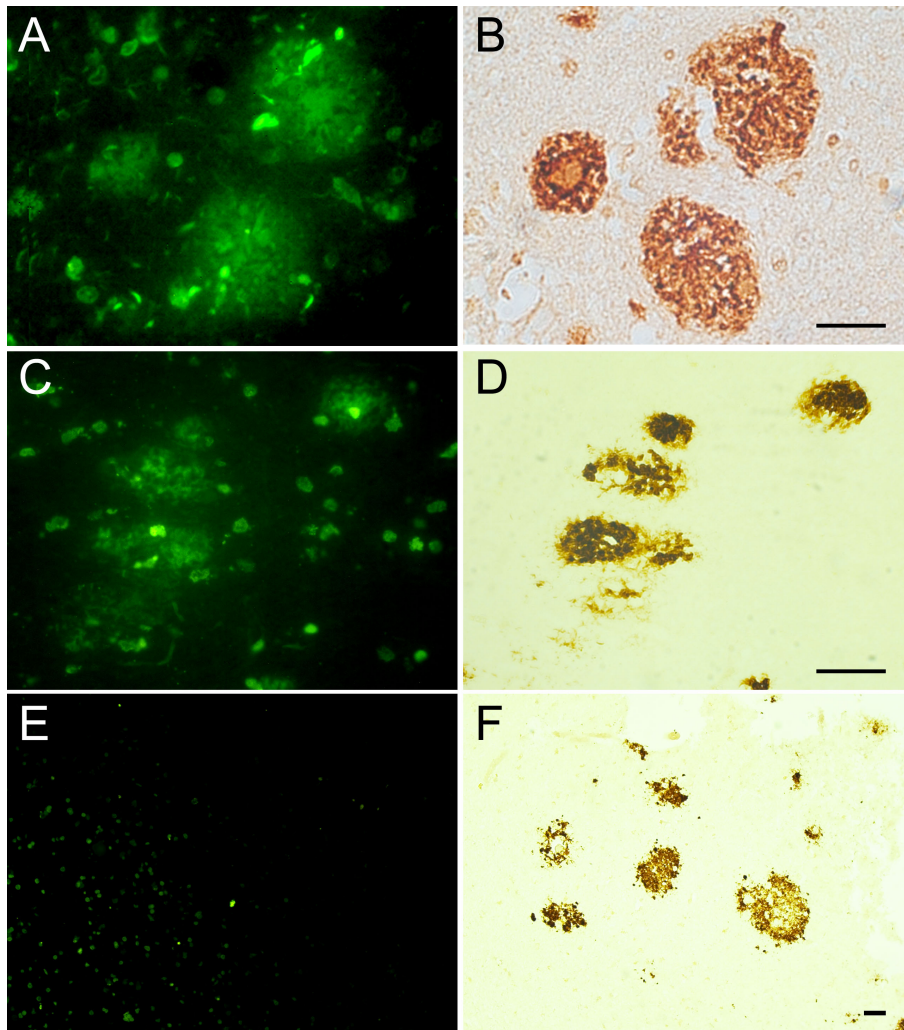


図 2.3 AD 患者の側頭葉、海馬切片上の老人斑への BF-108 の結合. (A、B) BF-108 による染色後に、AD 側頭葉切片上の老人斑上に蛍光が認められ (A)、隣接切片の 4G8 抗体を用いた免疫染色像と一致した (B). (C-F) AD 海馬切片上で、BF-108 は neuritic plaque へは結合したが (C)、同一切片上の diffuse plaque へは結合しなかった (E). neuritic plaque 及び diffuse plaque は連続切片の 6F/3D 抗体を用いた免疫染色像と比較し確認した (D、F). Bar = 50 μ m.

2.3C、D)、同一切片上の diffuse plaque とは一致しなかった (図 2.3E、F)。BF-108 はほぼ全ての大型の neuritic plaque と結合しており、抗 A β 抗体を用いた免疫染色法により側頭葉切片上に示された老人斑全体数の 36% と一致した。

いる [73]。実験の結果、処理を行わなかった隣接切片上には BF-108 が多くの老人斑へ結合している蛍光像が認められたのに対し (図 2.4C)、蟻酸で前処理することにより老人斑上の BF-108 の蛍光が消失した (図 2.4D)。正常加齢者の脳切片を BF-108 で染色したところ、AD 患者脳切片上に認められた強い蛍光は存在せず、小さな構造物の有する弱い蛍光しか認められなかった (図 2.4F)。

連続切片に対して抗 tau 抗体を用いて免疫染色法を処したところ (図 2.5A)、得られた神経原線維変化像と BF-108 の蛍光像とは大部分が一致していた (図 2.5B)。また BF-108 は血管性アミロイドへも結合し (図 2.5C)、ThS の蛍光染色像と一致した (図 2.5D)。

APP23 マウス内在性 A β プラークに対する BF-108 の *in vivo* 結合性

内在性の A β プラークに BF-108 が *in vivo* で結合し得るかを、18 ヶ月例の APP23 トランスジェニックマウスへの静脈内投与試験により評価した。投与から 4 時間後に作製した新鮮凍結切片上に、BF-108 の強い蛍光像が認められた (図 2.6A)。同一切片に対し A β 抗体を用いて免疫染色法を処したところ、BF-108 の蛍光像が A β プラークと一致することが示された (図 2.6B)。APP23 マウスとは対照的に、BF-108 を投与した同月齢の非組換えマウスでは小さな構造物以外の蛍光は認められなかった (図 2.6C)。BF-108 の蛍光は neuritic plaque と一致していたが、特にプラークの中心に存在する繊維状の構造物上に周囲より強い蛍光が認められた (Fig. 6D-F)。

正常マウスでの [18 F] BF-108 の脳移行性

正常マウスにおける化合物の脳移行性を評価するために、[18 F] でポジトロン標識された BF-108 の静脈内投与試験を行い、各組織への組織質量当たりの移行性 (%ID/g) を測定した。測定された移行性より、[18 F] BF-108 は投与から 30 分後に脳内への取り込み量が最大となることが示された (表 2.2)。また、化合物の構造によってはフッ素の結合が不安定で外れやすいことがある。外れたフッ素は骨へ蓄積しやすいことが分かっているので、大腿骨への移行性を調べることにより、[18 F] BF-108 から [18 F] が外れやすいかどうかを調べた。その結果、静脈内投与 3 時間後の骨への取り込みは 9%ID/g と比較的 low、[18 F] BF-108 から [18 F] のみが異常に外れやすいということは無いと考えられた。

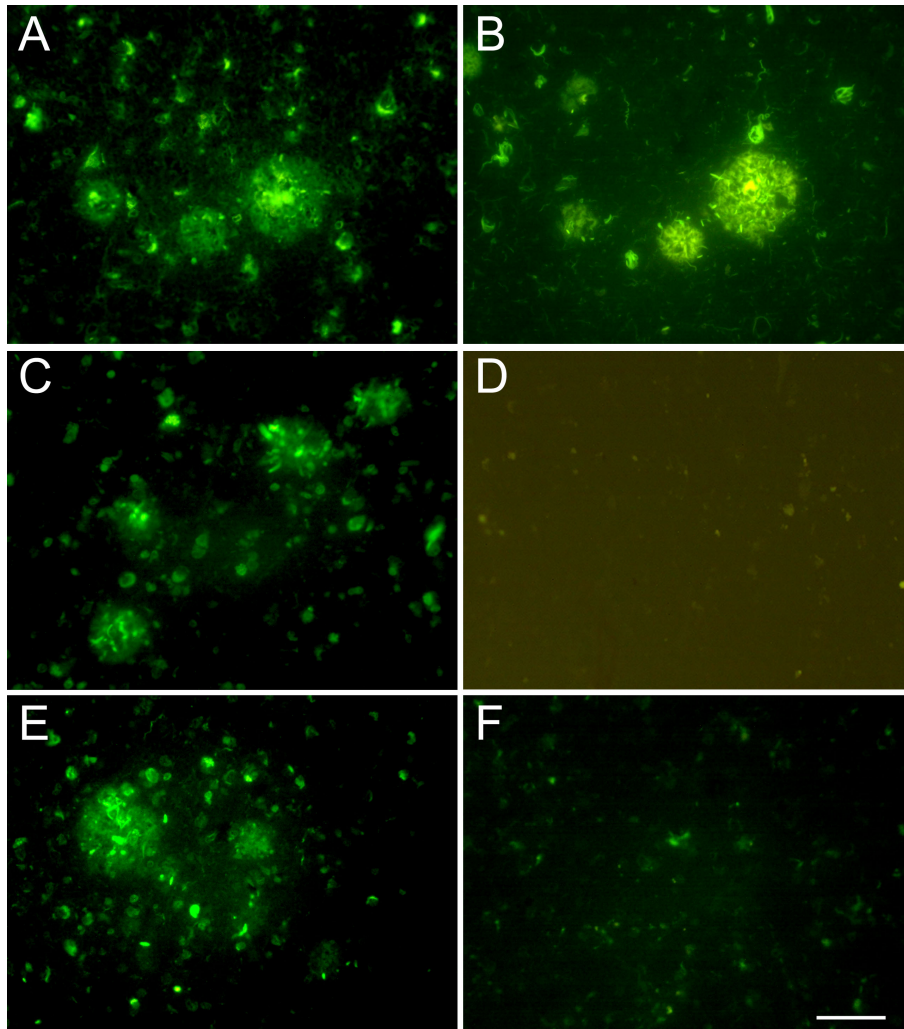


図 2.4 BF-108 の AD 側頭葉上の β シート構造を有する老人斑への結合. (A, B) BF-108 染色後に認められた老人斑上の蛍光 (A) は Thioflavin S によって染色された隣接切片上のもの (B) と一致した. (C, D) 蟻酸処理を行わなかった切片上に認められる BF-108 の蛍光像 (C) は蟻酸処理を行った隣接切片上では消失した (D). (E, F) 正常加齢者の側頭葉では、小さな構造物を除くと BF-108 の蛍光はほとんど検出されず (F)、AD 患者脳に認められる蛍光像 (E) とは明らかに異なっていた. Bar = 50 μ m

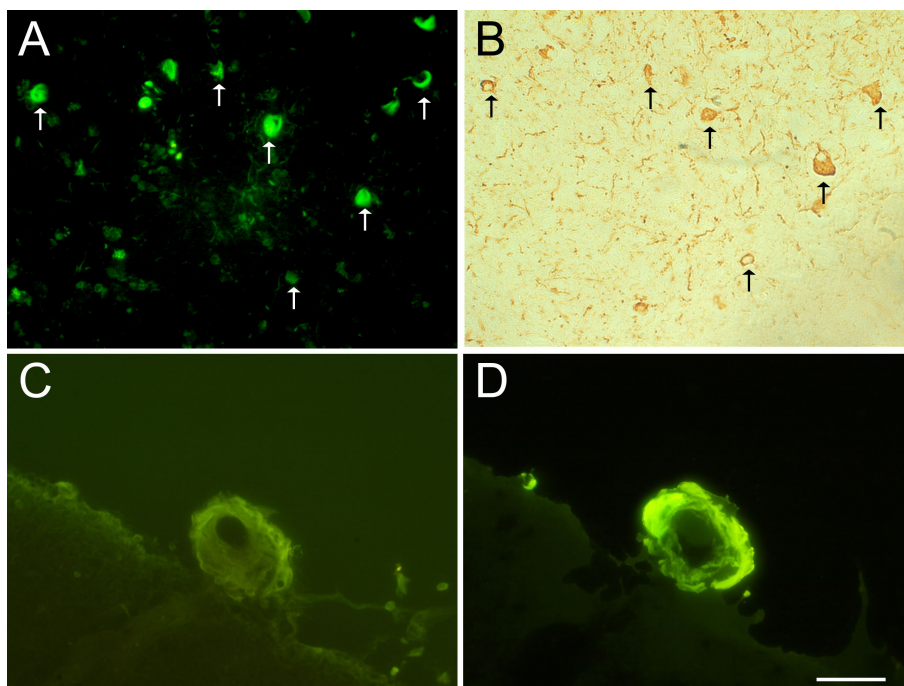


図 2.5 神経原線維変化及び血管性アミロイドへの BF-108 の結合. (A、B) BF-108 による蛍光は神経原線維変化で認められ (白矢印、A)、AT8 抗体による隣接切片の免疫染色像と一致した (黒矢印、B). (C、D) 血管性アミロイド上で BF-108 は蛍光を有し (C)、隣接切片の Thioflavin S 蛍光像と一致した (D). Bar = 50 μ m.

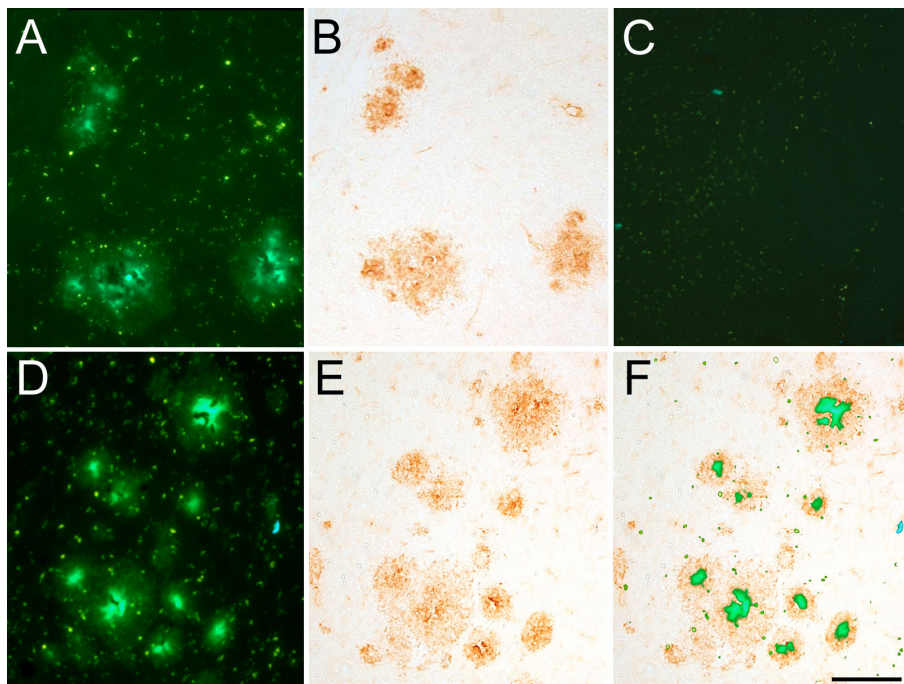


図 2.6 トランスジェニックマウス内在性プラークへの BF-108 の *in vivo* 結合. (A, B) 18 ヶ月齢の APP23 マウスへの尾静脈内投与から 4 時間後の脳内プラークの蛍光像 (A) と、同一切片の 6F/3D 抗体による免疫染色像 (B). (C) 同月齢の非組み換えマウスでは蛍光はほとんど観察されなかった。(D-F) BF-108 の蛍光像 (D) と、6F/3D 抗体を用いた免疫染色像 (E) を重ねてみると (F)、中心領域に周囲より強い蛍光が認められた. Bar = 100 μ m.

表 2.2

[¹⁸F] BF-108 の正常マウスへの静脈内投与後の生体分布 (平均 ± SD、%ID/g)

organ	2 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
brain	0.42 ± 0.09	1.13 ± 0.25	1.53 ± 0.36	1.39 ± 0.13	1.34 ± 0.31	1.04 ± 0.25
blood	2.89 ± 0.56	2.65 ± 0.68	2.57 ± 0.51	2.32 ± 0.27	1.91 ± 0.32	1.56 ± 0.43
liver	7.82 ± 1.51	6.28 ± 1.39	8.08 ± 7.74	2.99 ± 0.33	2.45 ± 0.43	1.75 ± 0.32
kidney	14.26 ± 2.84	14.54 ± 0.56	10.79 ± 3.01	6.42 ± 0.58	2.86 ± 0.20	3.81 ± 3.35
heart	8.87 ± 1.98	3.47 ± 0.28	2.60 ± 0.38	2.17 ± 0.31	1.89 ± 0.33	1.37 ± 0.24
lung	20.06 ± 1.93	13.89 ± 2.77	7.52 ± 0.76	5.36 ± 0.80	3.06 ± 0.63	2.61 ± 0.58
spleen	3.07 ± 0.62	3.91 ± 0.50	2.78 ± 0.31	2.02 ± 0.16	1.50 ± 0.27	1.10 ± 0.15
intestine	2.60 ± 0.84	5.32 ± 1.11	7.97 ± 2.16	9.51 ± 0.76	9.75 ± 1.60	4.38 ± 0.51
bone	1.84 ± 0.32	2.95 ± 0.58	4.31 ± 1.06	5.41 ± 1.77	8.00 ± 2.28	8.96 ± 0.82
muscle	2.65 ± 0.51	2.50 ± 0.38	1.82 ± 0.27	1.48 ± 0.16	1.27 ± 0.27	0.91 ± 0.18
skin	1.05 ± 0.15	2.11 ± 0.35	2.15 ± 0.39	1.83 ± 0.20	1.57 ± 0.28	1.12 ± 0.17

考察

BF-108 は *in vitro* における ThT 法において対照化合物よりも低い IC₅₀ 値を示し、凝集化 A β に対して高い結合性を有していた。また P_C 試験において BF-108 は対照化合物よりも高い脂溶性を示した。これらの *in vitro* におけるスクリーニングの結果から予想されたように、A β を扁桃体へ注入したラットモデルへ静脈内投与することにより、BF-108 は BBB を透過し凝集化 A β へ結合した。またラットモデルにおける合成 A β ペプチドのみならず、AD 患者海馬、側頭葉上の neuritic plaque や他の神経病理変化をも BF-108 は認識した。さらには変異 hAPP を有するトランスジェニックマウスの内在性プラークへも *in vivo* で結合した。¹⁸F によりポジトロン標識した [¹⁸F] BF-108 の正常マウスへの静注後の、総投与量に対する脳への集積率は、30 分後に 1.53%ID/g という高い値を示した。有用なプローブの基準の一つとして、げっ歯類を用いた脳移行性試験において 0.5% ID/organ 以上の値を示すことが必要であると考えられている [74]。今回試験に用いたマウスの脳湿重量は約 0.5 g であったことから 1.0% ID/g が必要な値と考えられるが、[¹⁸F] BF-108 はこの条件を満たしていた。

BF-108 は neuritic plaque へ結合したが、一方で diffuse plaque を検出することはできなかった。diffuse plaque は、neuritic plaque へ発達する途中の未成熟な病変であるとされている [58]。しかしながら、very mild AD と呼ばれる非常に早い段階の AD 患者であっても、既に多くの neuritic plaque が存在することが知られている [75]。また neuritic plaque の密度は痴呆の重症度に相関することが報告されている [76]。このことから BF-108 は早期段階の AD 診断にも有用であることが示唆される。

今回の実験ではトランスジェニックマウスへの静脈内投与試験に先立ち、ラットモデルを用いて試験化合物の BBB 透過性及び A β への *in vivo* 結合性を評価した。注入した A β は試験前に凝集化したものを用いたが、これは凝集化 A β がげっ歯類の脳内で安定であることによる [77]。一方で、可溶性 A β は脳内では速やかな分解 [78] や脳の外への排出 [79] を受けることが知られている。今回使用したラットモデルでは、注入された凝集化 A β は 1 週間後でも脳内に存在していることを確認した (data not shown)。ラットモデルに A β を注入する際に BBB を損傷してしまうことから、投与した試験薬物が損傷部位から脳内へと漏入している可能性が考えられた。A β を注入してから化合物投与試験までは 3 日間あるが、BBB が完全に修復するのに十分な時間であるかは不明であった。しかしながら低脂溶性の化合物である X-34 をラットモデルへ投与したところ、作製された脳切片上の A β 注入部位に X-34 の蛍光はほとんど認められなかった。しかし観察後に同一切片を X-34 溶液により *in vitro* で染色すると、A β と思われる蛍光シグナルが確認された。この結果より、X-34 は低脂溶性であるために静注後に BBB を透過できず、A β へ結合できなかったものと考えられ、同時にラットモデル

において BBB がその機能を回復していることが示された。

BF-108 は老人斑のみならず神経原線維変化へも結合した (図 2.5 参照)。このような結合能は FDDNP [66] や X-34 [67] と同様の特性である。老人斑と神経原線維変化は構成している主要な蛋白質は $A\beta$ と tau と異なるものの、双方とも β シート構造を二次構造として有している。BF-108 の蛍光像は ThS のものとほぼ一致しており、BF-108 が結合した老人斑の割合は既に報告されている ThS の結果と同様であった [80]。さらに BF-108 は diffuse plaques や蟻酸処理後の老人斑へは結合しなかった。以上の結果より、BF-108 の結合には、老人斑の二次構造が必要であることが示唆される。このような結合特性のため、BF-108 は老人斑に対して選択性を有さず、神経原線維変化や血管性アミロイドへも結合したと考えられる。しかしながら BF-108 の蛍光染色像には ThS のそれとは異なる部分が若干認められた。その差異の原因の一つは神経原線維変化である。図 2.5 を見ると、連続切片間であるにも関わらず BF-108 蛍光像と抗 tau 抗体を用いた免疫染色像との間でも一致しない像が一部に認められた。これは神経原線維変化が小さすぎるため、連続切片間であっても片方の切片にしか存在しない神経原線維変化があったためであると考えられた。また自家蛍光を有する lipofuscin も神経原線維変化と同様に、BF-108 蛍光像が ThS の蛍光パターンと一致しなかった原因の一つであると考えられた。lipofuscin とは加齢に伴って蓄積される小さな構造物である。Lipofuscin の自家蛍光は、BF-108 を蛍光顕微鏡下で観察する際に使用するフィルターセットでは除外することができない。そのためヒト脳切片を用いた試験の前には酸化的手法 [67] により消光を行ったが、消光の度を上げすぎると BF-108 や ThS の蛍光も検出できなくなってしまうため、lipofuscin の自家蛍光を完全に抑えることは不可能であった。自家蛍光の影響がない像を得るために、今後 [^{18}F] BF-108 を用いた AD 脳切片への結合性試験を行う予定である。

APP23 トランスジェニックマウスの脳内では、プラークの中心の繊維状の構造に周囲より強い蛍光が認められた。この繊維状の構造物は ThS を用いた際にも強く染色されることが既に報告されており [81]、高度に凝集した $A\beta$ により構成されていると考えられる。APP23 マウスに認められるこの結合像は、AD 脳切片を用いた組織学的試験で示された結果と一致するといえる。その一方で、この試験では BF-108 が APP23 マウス脳内でも diffuse plaque へ結合できないのかという点については示すことができなかった。これは APP23 マウスの脳内に蓄積する細胞外 $A\beta$ のほぼ全てが、ThS によって染色される、核を有するプラークであることによると考えられる [82]。内在性の diffuse plaque へ *in vivo* では結合するのかという点については、APP22 マウスのように diffuse plaque が多く形成されるトランスジェニックマウスを使用する必要があると考えられる [70]。

$A\beta$ 凝集塊へ結合することが知られている Congo red やその誘導体である Chrysamine G [83] について、 $A\beta$ ペプチドにより引き起こされる細胞死を抑制するという報告があ

る [84-86]。BF-009 も、皮質線条体スライス培養系において A β 40 ペプチドにより引き起こされる細胞死を抑制する(Akaike A, personal communication)。

今回の実験より、BF-108 が APP23 トランスジェニックマウスへの静脈内投与後に A β プラークへ結合し得ることが示された。また正常マウスへの投与試験における評価より、^[18F] BF-108 は高い脳移行性を有することが明らかとなった。このような特性は、*in vitro* におけるスクリーニングやモデルラットでの投与試験の結果と一致するといえる。さらに BF-108 は AD 患者脳切片上の老人斑へも結合した。このように BF-108 は高い脳内への移行性を示し、且つ *in vivo* で老人斑へ結合し得ることが示唆され、AD 診断のためのプローブとして有望な候補であると考えられる。

参考文献

1. Moonen, G., Grau-Wagemans, M. P., and Selak, I. (1982). Plasminogen activator-plasmin system and neuronal migration. *Nature* 298, 753-755.
2. Tani, N., Matsumoto, K., Ota, I., Yoshida, S., Takada, Y., Shiosaka, S., and Matsuura, N. (2001). Effects of fibronectin cleaved by neuropsin on cell adhesion and migration. *Neurosci Res* 39, 247-251.
3. Krystosek, A., and Seeds, N. W. (1981). Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science* 213, 1532-1534.
4. Gurwitz, D., and Cunningham, D. D. (1988). Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 3440-3444.
5. Dent, M. A., Sumi, Y., Morris, R. J., and Seeley, P. J. (1993). Urokinase-type plasminogen activator expression by neurons and oligodendrocytes during process outgrowth in developing rat brain. *Eur J Neurosci* 5, 633-647.
6. Hantai, D., Rao, J. S., Kahler, C., and Festoff, B. W. (1989). Decrease in plasminogen activator correlates with synapse elimination during neonatal development of mouse skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 362-366.
7. Suidan, H. S., Stone, S. R., Hemmings, B. A., and Monard, D. (1992). Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron* 8, 363-375.
8. Pittman, R. N., and DiBenedetto, A. J. (1995). PC12 cells overexpressing tissue plasminogen activator regenerate neurites to a greater extent and migrate faster than control cells in complex extracellular matrix. *J Neurochem* 64, 566-575.
9. Dihanich, M., Kaser, M., Reinhard, E., Cunningham, D., and Monard, D. (1991).

- Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 6, 575-581.
10. Carroll, P. M., Tsirka, S. E., Richards, W. G., Frohman, M. A., and Strickland, S. (1994). The mouse tissue plasminogen activator gene 5' flanking region directs appropriate expression in development and a seizure-enhanced response in the CNS. *Development* 120, 3173-3183.
 11. Chen, Z. L., Momota, Y., Kato, K., Taniguchi, M., Inoue, N., Shiosaka, S., and Yoshida, S. (1998). Expression of neuropsin mRNA in the mouse embryo and the pregnant uterus. *J Histochem Cytochem* 46, 313-320.
 12. Tomizawa, K., He, X., Yamanaka, H., Shiosaka, S., and Yoshida, S. (1999). Injury induces neuropsin mRNA in the central nervous system. *Brain Res* 824, 308-311.
 13. Hirata, A., Yoshida, S., Inoue, N., Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Taniguchi, M., Matsuyama, T., Kato, K., Iizasa, H., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shiosaka, S. (2001). Abnormalities of synapses and neurons in the hippocampus of neuropsin-deficient mice. *Mol Cell Neurosci* 17, 600-610.
 14. Chen, Z. L., Yoshida, S., Kato, K., Momota, Y., Suzuki, J., Tanaka, T., Ito, J., Nishino, H., Aimoto, S., Kiyama, H., and Shiosaka, S. (1995). Expression and activity-dependent changes of a novel limbic-serine protease gene in the hippocampus. *J Neurosci* 15, 5088-5097.
 15. Frey, U., Muller, M., and Kuhl, D. (1996). A different form of long-lasting potentiation revealed in tissue plasminogen activator mutant mice. *J Neurosci* 16, 2057-2063.
 16. Huang, Y. Y., Bach, M. E., Lipp, H. P., Zhuo, M., Wolfer, D. P., Hawkins, R. D., Schoonjans, L., Kandel, E. R., Godfraind, J. M., Mulligan, R., Collen, D., and

- Carmeliet, P. (1996). Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8699-8704.
17. Yoshida, S., and Shiosaka, S. (1999). Plasticity-related serine proteases in the brain. *Int J Mol Med* 3, 405-409.
 18. Komai, S., Matsuyama, T., Matsumoto, K., Kato, K., Kobayashi, M., Imamura, K., Yoshida, S., Ugawa, S., and Shiosaka, S. (2000). Neuropsin regulates an early phase of schaffer-collateral long-term potentiation in the murine hippocampus. *Eur J Neurosci* 12, 1479-1486.
 19. Matsumoto-Miyai, K., Ninomiya, A., Yamasaki, H., Tamura, H., Nakamura, Y., and Shiosaka, S. (2003). NMDA-dependent proteolysis of presynaptic adhesion molecule L1 in the hippocampus by neuropsin. *J Neurosci* 23, 7727-7736.
 20. Tsirka, S. E., Gualandris, A., Amaral, D. G., and Strickland, S. (1995). Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377, 340-344.
 21. Chen, Z. L., and Strickland, S. (1997). Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91, 917-925.
 22. Robichon, A., and Kuks, P. (1991). Proteolysis in rat hypothalamic neurosecretory granules: characterization of an alpha-chymotrypsin-like activity in the pathway of intracellular processing of prohormones. *Endocrinology* 128, 1974-1980.
 23. Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., Sonderegger, P., Kinter, J., Becker, L. M., Lacbawan, F., Krasnewich, D., Muenke, M., Lawrence, D. A., Yerby, M. S., Shaw, C. M., Gooptu, B., Elliott, P. R.,

- Finch, J. T., Carrell, R. W., and Lomas, D. A. (1999). Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature* 401, 376-379.
24. Shimizu-Okabe, C., Yousef, G. M., Diamandis, E. P., Yoshida, S., Shiosaka, S., and Fahnestock, M. (2001). Expression of the kallikrein gene family in normal and Alzheimer's disease brain. *Neuroreport* 12, 2747-2751.
25. Melchor, J. P., Pawlak, R., and Strickland, S. (2003). The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (A β) degradation and inhibits A β -induced neurodegeneration. *J Neurosci* 23, 8867-8871.
26. Smyth, M. J. and Trapani, J. A. (1998). Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunology Today* 16, 202-207.
27. Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 10, 735-747
28. Sayers, T. J., Wiltrot, T. A., Smyth, M. J., Ottaway, K. S., Pilaro, A. M., Sowder, R., Henderson, L. E., Sprenger, H., and Lloyd, A. R. (1994). Purification and cloning of a novel serine protease, RNK-Tryp-2, from the granules of a rat NK cell leukemia. *J Immunol* 152, 2289-2297.
29. Przetak, M. M., Yoast, S., and Schmidt, B. F. (1995). Cloning of cDNA for human granzyme 3. *FEBS Lett* 364, 268-271.
30. Sayers, T. J., Lloyd, A. R., McVicar, D. W., O'Connor, M. D., Kelly, J. M., Carter, C. R., Wiltrot, T. A., Wiltrot, R. H., and Smyth, M. J. (1996). Cloning and expression of a second human natural killer cell granule tryptase, HNK-Tryp-2/granzyme 3. *J Leukoc Biol* 59, 763-768.
31. Shresta, S., Goda, P., Wesselschmidt, R., and Ley, T. J. (1997). Residual

- cytotoxicity and granzyme K expression in granzyme A-deficient cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 20236-20244.
32. Wilharm, E., Parry, M. A. A., Friebel, R., Tschesche, H., Matschiner, G., Sommerhoff, C. P. and Jenne, D. E. (1999). Generation of catalytically active granzyme K from *Escherichia coli* inclusion bodies and identification of efficient granzyme K inhibitors in human plasma. *J Biol Chem* 274, 27331-27337.
 33. Wilharm, E., Tschopp, J., Jenne, D. E. (1999) Biological activities of granzyme K are conserved in the mouse and account for residual Z-Lys-SBzl activity in granzyme A-deficient mice. *FEBS Lett* 459, 139-142.
 34. Gershenfeld, H. K., and Weissman, I. L. (1986). Cloning of a cDNA for a T cell-specific serine protease from a cytotoxic T lymphocyte. *Science* 232, 854-858.
 35. Matsumoto, K., Ishii, N., Yoshida, S., Shiosaka, S., Wanaka, A., and Tohyama, M. (1998). Molecular cloning and distinct developmental expression pattern of spliced forms of a novel zinc finger gene *wiz* in the mouse cerebellum. *Brain Res Mol Brain Res* 61, 179-189.
 36. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning-Laboratory Manuals*, 2nd edn. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 37. Mizuguchi, H., Nakagawa, T., Nakanishi, M., Imazu, S., Nakagawa, S., and Mayumi, T. (1996). Efficient gene transfer into mammalian cells using fusogenic liposome. *Biochem Biophys Res Commun* 218, 402-407.
 38. Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
 39. Taniguchi, M., Tani, N., Suemoto, T., Ishimoto, I., Shiosaka, S., and Yoshida, S. (1999). High expression of alternative transcript of granzyme M in the mouse retina.

- Neurosci Res 34, 115-123.
40. Hedstrom, L., Lin, T. Y., and Fast, W. (1996). Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* 35, 4515-4523.
 41. Merchenthaler, I., Vigh, S., Petrusz, P., and Schally, A. V. (1982). Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat* 165, 385-396.
 42. Panula, P., Yang, H. Y., and Costa, E. (1984). Comparative distribution of bombesin/GRP- and substance-P-like immunoreactivities in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 224, 606-617.
 43. Vincent, S. R., McIntosh, C. H., Buchan, A. M., and Brown, J. C. (1985). Central somatostatin systems revealed with monoclonal antibodies. *J Comp Neurol* 238, 169-186.
 44. Inagaki, S., Sakanaka, M., Shiosaka, S., Senba, E., Takatsuki, K., Takagi, H., Kawai, Y., Minagawa, H., and Tohyama, M. (1982). Ontogeny of substance P-containing neuron system of the rat: immunohistochemical analysis--I. Forebrain and upper brain stem. *Neuroscience* 7, 251-277.
 45. Olschowka, J. A., O'Donohue, T. L., Mueller, G. P., and Jacobowitz, D. M. (1982). The distribution of corticotropin releasing factor-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides* 3, 995-1015.
 46. Shiosaka, S. (1992). Ontogeny of the central somatostatinergic system, In *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS*, A. Björklund, T. Hökfelt, and M. Tohyama, ed. (Amsterdam: Elsevier), pp. 369-398.

47. Moller, M., Ravault, J. P., and Cozzi, B. (1996). The chemical neuroanatomy of the mammalian pineal gland: neuropeptides. *Neurochem Int* 28, 23-33.
48. Wiegand, U., Corbach, S., Minn, A., Kang, J., and Muller-Hill, B. (1993). Cloning of the cDNA encoding human brain trypsinogen and characterization of its product. *Gene* 136, 167-175.
49. Tucker, H. M., Kihiko, M., Caldwell, J. N., Wright, S., Kawarabayashi, T., Price, D., Walker, D., Scheff, S., McGillis, J. P., Rydel, R. E., and Estus, S. (2000). The plasmin system is induced by and degrades amyloid-beta aggregates. *J Neurosci* 20, 3937-3946.
50. Hinh-Schauer, C., Estebanez-perpina, E., Wilharm, E., Fuentes-Prior, P., Klinkert, W., Bode, W. and Jenne, D. E. (2002) The 2.2-Å crystal structure of human pro-granzyme K reveals a rigid zymogen with unusual features. *J Biol Chem* 277, 50923-50933.
51. Babe, L.M., Yoast, S., Dreyer, M. and Schmidt, B. F. (1998) Heterologous expression of human granzyme K in *Bacillus subtilis* and characterization of its hydrolytic activity in vitro. *Biotechnol Appl Biochem* 27, 117-124.
52. Takano, M., Mori, Y., Shiraki, H., Horie, M., Okamoto, H., Narahara, M., Miyake, M. and Shikimi, T. (1999) Detection of bikunin mRNA in limited portions of rat brain. *Life Sci* 65, 757-62.
53. Nyaruhucha, C. N., Kito, M., and Fukuoka, S. I. (1997). Identification and expression of the cDNA-encoding human mesotrypsin(ogen), an isoform of trypsin with inhibitor resistance. *J Biol Chem* 272, 10573-10578.
54. Hershberger, R. J., Gershenfeld, H. K., Weissman, I. L., and Su, L. (1992). Genomic organization of the mouse granzyme A gene. Two mRNAs encode the

- same mature granzyme A with different leader peptides. *J Biol Chem* 267, 25488-25493.
55. Trapani, J. A., Klein, J. L., White, P. C., and Dupont, B. (1988). Molecular cloning of an inducible serine esterase gene from human cytotoxic lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6924-6928.
56. Boeck, R., and Kolakofsky, D. (1994). Positions +5 and +6 can be major determinants of the efficiency of non-AUG initiation codons for protein synthesis. *EMBO J* 13, 3608-3617.
57. Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J* 16, 2482-2492.
58. Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81, 741-766.
59. Price, J. L. and Morris, J. C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 45, 358-368.
60. Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Oshima, N., and Ihara, Y. (2001). Alzheimer beta amyloid deposition enhanced by apoE epsilon4 gene precedes neurofibrillary pathology in the frontal association cortex of nondemented senior subjects. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 731-739.
61. Price, J. L., Ko, A.I., Wade, M. J., Tsou, S. K., McKeel, D. W. and Morris, J.C., (2001) Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol* 58, 1395-1402.
62. Oldendorf, W. H. (1974). Lipid solubility and drug penetration of the blood brain barrier. *Proc Soc Exp Biol Med* 147, 813-815.

63. Wood, S. J., Maleeff, B., Hart, T., and Wetzel, R. (1996). Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide A β . *J Mol Biol* 256, 870-877.
64. Naiki, H., and Nakakuki, K. (1996). First-order kinetic model of Alzheimer's beta-amyloid fibril extension in vitro. *Lab Invest* 74, 374-383.
65. LeVine, H., III (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2, 404-410.
66. Agdeppa, E. D., Kepe, V., Liu, J., Flores-Torres, S., Satyamurthy, N., Petric, A., Cole, G. M., Small, G. W., Huang, S. C., and Barrio, J. R. (2001). Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21, RC189.
67. Styren, S. D., Hamilton, R. L., Styren, G. C., and Klunk, W. E. (2000). X-34, a fluorescent derivative of Congo red: a novel histochemical stain for Alzheimer's disease pathology. *J Histochem Cytochem* 48, 1223-1232.
68. Soto, C., Sigurdsson, E. M., Morelli, L., Kumar, R. A., Castano, E. M., and Frangione, B. (1998). Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med* 4, 822-826.
69. Paxinos, G., and Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. (San Diego, CA: Academic press).
70. Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Burki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., Waridel, C.,

- Calhoun, M.E., Jucker, M., Probst, A., Staufenbiel, M., Sommer, B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13287-13292.
71. Shoghi-Jadid, K., Small, G. W., Agdeppa, E. D., Kepe, V., Ercoli, L. M., Siddarth, P., Read, S., Satyamurthy, N., Petric, A., Huang, S. C., and Barrio, J. R. (2002). Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 10, 24-35.
72. Dishino, D. D., Welch, M. J., Kilbourn, M. R., and Raichle, M. E. (1983). Relationship between lipophilicity and brain extraction of C-11-labeled radiopharmaceuticals. *J Nucl Med* 24, 1030-1038.
73. Kitamoto, T., Ogomori, K., Tateishi, J., and Prusiner, S. B. (1987). Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest* 57, 230-236.
74. Zhuang, Z. P., Kung, M. P., Hou, C., Skovronsky, D. M., Gur, T. L., Plossl, K., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Kung, H. F. (2001). Radioiodinated styrylbenzenes and thioflavins as probes for amyloid aggregates. *J Med Chem* 44, 1905-1914.
75. Haroutunian, V., Purohit, D. P., Perl, D. P., Marin, D., Khan, K., Lantz, M., Davis, K. L., and Mohs, R. C. (1999). Neurofibrillary tangles in nondemented elderly subjects and mild Alzheimer disease. *Arch Neurol* 56, 713-718.
76. Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel, D. W., Jr, Morris, J. C., Growdon, J. H., and Hyman, B. T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci* 16, 4491-4500.
77. Weldon, D. T., Rogers, S. D., Ghilardi, J. R., Finke, M. P., Cleary, J. P., O'Hare, E.,

- Esler, W. P., Maggio, J. E., and Mantyh, P. W. (1998). Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo. *J Neurosci* 18, 2161-2173.
78. Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H. J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., and Saido, T. C. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med* 6, 143-150.
79. Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S. R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D. M., Miller, C. A., Strickland, D. K., Ghiso, J., and Zlokovic, B. V. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106, 1489-1499.
80. Wisniewski, H. M., Wen, G. Y., and Kim, K. S. (1989). Comparison of four staining methods on the detection of neuritic plaques. *Acta Neuropathol (Berl)* 78, 22-27.
81. Kuo, Y. M., Kokjohn, T. A., Beach, T. G., Sue, L. I., Brune, D., Lopez, J. C., Kalback, W. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufienbiel, M., and Roher, A. E. (2001). Comparative analysis of amyloid-beta chemical structure and amyloid plaque morphology of transgenic mouse and Alzheimer's disease brains. *J Biol Chem* 276, 12991-12998.
82. Bornemann, K. D. and Staufienbiel, M. (2000). Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 908, 260-266.
83. Klunk, W. E., Debnath, M. L., Pettegrew, J. W. (1994). Development of small molecule probes for the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Neurobiol*

Aging 15, 691-698.

84. Klunk, W. E., Debnath, M. L., Koros, A. M., and Pettegrew, J. W. (1998). Chrysamine-G, a lipophilic analogue of Congo red, inhibits A beta-induced toxicity in PC12 cells. *Life Sci* 63, 1807-1814.
85. Sadler, I. I., Smith, D. W., Shearman, M. S., Ragan, C. I., Tailor, V. J., and Pollack, S. J. (1995). Sulphated compounds attenuate beta-amyloid toxicity by inhibiting its association with cells. *Neuroreport* 7, 49-53.
86. Lorenzo, A., and Yankner, B. A. (1994). Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12243-12247.