

学位論文

アンギオテンシン受容体とアドレナリン β 受容体間の
相互作用によるアミロイド β タンパク質産生制御機構の解析

岩手医科大学大学院薬学研究科医療薬学専攻
医療薬学コース・分子病態解析学分野
菊池 光太

目次

	頁
論文要旨-----	2
略語集-----	3
序論-----	4
材料および方法-----	7
結果-----	9
考察-----	11
結論-----	13
引用文献-----	14
謝辞-----	18
図表集-----	19

論文要旨

アルツハイマー病(Alzheimer's Disease; AD)は、脳実質内にアミロイドβタンパク質(amyloid β-protein; Aβ)を主成分とする老人斑の形成を特徴としている。そのため、AβはADの重要な原因分子の一つであると考えられている。最近、血圧を調節するアンギオテンシンIIタイプ1受容体(Angiotensin II type 1 receptor; AT₁R)がAβ産生に関与し、アンギオテンシンII受容体拮抗薬(Angiotensin II receptor blocker; ARB)の一つであるテルミサルタン(Telmisartan; Telm)がAT₁Rを介してAβ産生を増加させることが示された。しかしながら、AT₁RがAβ産生にどのように関与しているのかを示す明確なメカニズムは明らかとなっていない。一方、興味深いことに、Gタンパク質共役受容体であるAT₁Rは、やはりAβ産生に関与することが示されているアドレナリンβ₂受容体(β₂-adrenergic receptor; β₂-AR)とのヘテロ二量体化によるシグナル伝達の調節があることが強く示唆されている。したがって、本研究では、AT₁Rとβ₂-ARの相互作用がAβ産生制御に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とし、著者らは、Telm処理によるAβ産生増加が、β-AR拮抗薬処理による影響を受けるかどうかを解析した。その結果、Telm処理によるAβ産生増加は、β₁-AR選択的拮抗薬処理よりもβ₂-AR選択的拮抗薬であるICI-118,551(ICI)処理により強く抑制されることが明らかとなった。さらに、AT₁Rの欠失細胞では、Aβ産生に対するβ₂-AR選択的拮抗薬の効果が抑制された。以上のことから、AT₁Rとβ₂-ARの相互作用はAβ産生制御に関与している可能性があることが示された。

略語集

アルツハイマー病 Alzheimer's Disease: AD
家族性 AD Family Alzheimer's Disease: FAD
孤発性 AD Sporadic Alzheimer's Disease: SAD
アミロイド β タンパク質 amyloid β -protein: A β
神経原線維変化 Neurofibrillary tangles: NFTs
アミロイド前駆体タンパク質 Amyloid precursor protein: APP
プレセニリン Presenilin: PS
アンギオテンシン II タイプ 1 受容体 Angiotensin II type 1 receptor: AT₁R
アドレナリン β_1 受容体 β_1 -adrenergic receptor: β_1 -AR
アドレナリン β_2 受容体 β_2 -adrenergic receptor: β_2 -AR
アンギオテンシン II 受容体拮抗薬 Angiotensin II receptor blocker: ARB
G タンパク質共役型受容体 G protein-coupled receptor: GPCR
マウス胚線維芽細胞 Mouse embryonic fibroblasts: MEFs
テルミサルタン Telmisartan: Telm
プロプラノロール Propranolol: Prop
アテノロール Atenolol: Aten
ビソプロロール Bisoprolol: Biso
ICI-118,551 塩酸塩: ICI
平均値 \pm 標準誤差 means \pm standard error of the mean: means \pm SEM

序論

アルツハイマー病(Alzheimer's Disease)

アルツハイマー病(Alzheimer's Disease; AD)は記憶力の低下や、認知障害などを主症状とする進行性の神経変性疾患である。ADには比較的若年に発症し劇的に症状が進行する家族性AD(Family Alzheimer's Disease; FAD)や、家系に関係なく主に老化に伴い発症する孤発性AD(Sporadic Alzheimer's Disease; SAD)に分類されるが、AD患者のほとんどはSADである。ADの罹患者数は2014年時点で日本国内において約350万人、2017年時点で全世界では約3500万人を超えと言われており、10年後には4800万人にも達すると推計されている(Global Alzheimer's Disease Prevalent Cases Forecast, 2017-2027)。経済的、人道的な観点から、ADの原因解明とそれに基づく予防・治療・診断法の解明は切実な社会的課題と言える。現在、「アリセプト(ドネペジル塩酸塩：エーザイ)」をはじめとして各種アルツハイマー型認知症治療薬が臨床現場で用いられているが、AD罹患による脳内アセチルコリン濃度の減少における対症療法などであり、根本的な治療薬とはなっていない。したがって、超高齢社会を迎えている我が国において、ADの治療法・予防法を確立することは、極めて重要な課題である。

AD脳の病理学的特徴として、①脳実質内において細胞外へアミロイドβタンパク質(amyloid β-protein; Aβ)の沈着による老人斑(Senile Plaques)の形成、②細胞内の異常リン酸化されたタウタンパク質による神経原線維変化(Neurofibrillary tangles; NFTs)が知られており、これにより脳実質の広範な神経細胞脱落やシナプス密度の低下などが認められる[1]。特にAβの沈着はAD脳に特異的かつAD発症初期から観察されることなどからAβ蓄積の予防やAβ除去法の確立が重要な課題となっている。

APP プロセッシングによるアミロイドβ産生

Aβは、1回膜貫通型の受容体構造を持った膜タンパク質であるアミロイド前駆体タンパク質(amyloid precursor protein; APP)から産生される。APPは小胞体のリボソームで合成されたのちN末端側が小胞体内に取り込まれ、N型糖鎖修飾を受けてimmature APPとなる。その後、ゴルジ体へ輸送されO型糖鎖修飾を受けてmature APPとなり、細胞膜表面上でα、β、およびγセクレターゼ複合体などの酵素活性により切断される。

APP の切断には、神経栄養効果などに寄与する非アミロイド産生経路と、神経毒性のある A β を産生するアミロイド産生経路の 2 つの異なる経路がある (図 i)。非アミロイド産生経路では、APP は α セクレターゼによって N 末端側の細胞外ドメインからなる断片(sAPP α)が細胞外に放出され、C 末端側の 83 アミノ酸からなる断片(C83)が細胞膜中に残る。この経路では、 α セクレターゼによる APP 切断部位は A β ドメイン内にあるため、A β ペプチドは産生されない。一方、アミロイド産生経路では、 β セクレターゼおよび γ セクレターゼと呼ばれる 2 つのプロテアーゼによる連続的な切断が関与する。まず、 β セクレターゼが APP を切断し、N 末端側の細胞外ドメイン(sAPP β)を放出し、C 末端側の 99 アミノ酸断片(C99)が細胞膜に留まる。そして、C99 の N 末端が γ セクレターゼにより切断され、産生された A β ペプチドはミスフォールドにより凝集し、アルツハイマー病の特徴である繊維状になる。A β の最も一般的なアイソフォームは 40 残基と 42 残基の長さで、これは γ セクレターゼ切断の部位によって異なる[2](図 ii)。分泌された A β の多くは A β 40 であるが、かなり割合は小さいものの A β 42 も存在する。A β 42 は凝集能が強く、老人斑の主要な成分であるため、AD の発症の原因分子と考えられている[2]。

アルツハイマー病の危険因子と A β 産生制御の機構

AD 発症には、プレセニリン(Presenilin; PS)のミスセンス変異などに代表される遺伝的因子の他、中年期以降の高血圧などが危険因子として知られているが、その分子機構は不明である[3]。このような背景のもとに著者らは、AD 発症の要因となる A β 産生と、血圧制御に関与するアンギオテンシン受容体機能との関連の解析を進めてきた。血圧を調節するアンギオテンシン II タイプ 1 受容体 (Angiotensin II type 1 receptor; AT₁R)欠失マウスは、A β 産生酵素である γ セクレターゼ活性の低下を引き起こし、脳内の A β 蓄積を減少させることが明らかとなっている[4]。AT₁R の欠失は γ セクレターゼを構成しているプレセニリン複合体を不完全に生成することで、 γ セクレターゼ活性の変化を通して A β 産生を調節している可能性が示されている。さらに、降圧薬の一種であるアンギオテンシン受容体拮抗薬 (Angiotensin receptor blocker; ARB) のうち、テルミサルタン (Telmisartan; Telm)は、AT₁R を介して A β 産生を増加させることが見出されている[4][5]。これらのことから、著者らは、血圧制御に関与するアンギオテンシン受容体の発現変化や活性変化が AD 発症の一つの原因として可能性があるのでは

はないかと考えている。一方で、やはり血圧の制御に関連するアドレナリン β_2 受容体(β_2 -adrenergic receptor; β_2 -AR)も γ セクレターゼ活性を調節することが示されているが、その詳細な作用機構は不明である[6] [7]。

GPCR 間のカップリングによるシグナル伝達調整

G タンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor; GPCR)は膜タンパク質の受容体として最も大きなスーパーファミリーを形成しており、医療用医薬品の一般的な標的とされている[11]。驚くべきことに、GPCR の 90%以上が脳で発現しており、シナプス伝達を介して認知機能や情動、代謝など重要かつ多様な生理的機能に関与している[12]。さらに、古典的に単量体として機能すると考えられていた GPCR は、実際にはホモもしくはヘテロ二量体を形成しており、他の GPCR ファミリーメンバーとヘテロ二量体化することで、細胞内シグナル伝達が制御され、二量体形成による生理活性の調節機構が注目を浴びてきている[13] ([13]総説)。また、GPCR の多量体化が通常組織中で認められ、受容体の機能に重要な結果をもたらす可能性があることを示す研究結果が増加してきている[15]。ただし、GPCR ファミリーメンバーのヘテロまたはホモ二量体によるシグナル伝達の調節機構の詳細なメカニズムはまだ解明されていない。また、GPCR への作動薬または拮抗薬の結合は、多量体化した GPCR に立体構造変化を引き起こし下流へのシグナル伝達をもたらす可能性があることも指摘されている。

AD に関して、GPCR は α 、 β 、および γ セクレターゼによる、APP 切断のそれぞれの段階に関与していることが示唆されている([16]総説)。また、GPCR の 1 つである AT_1R は、 β_2 -AR を含む他の GPCR ファミリーメンバーとのヘテロ二量体化によるシグナル伝達の調節を行っている可能性が強く示唆されている[8] [9] [10]。ただし、現時点ではこれらの GPCR が $A\beta$ 産生系にどのように影響を及ぼすかは明らかとなっていない。

そこで、本研究では AD 治療の潜在的な薬物標的を知るために、 AT_1R と β_2 -AR の受容体間相互作用が $A\beta$ の産生制御に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。この目的のため、Telm 処理による $A\beta$ 産生増加が β_2 -AR 選択的拮抗薬の影響を受けるかどうかを解析したので報告する。

材料および方法

1)細胞株と細胞培養

AT₁R 欠失マウス胚線維芽細胞(mouse embryonic fibroblasts; MEFs)を生成するために、C57BL/6 が元となった AT₁R 欠失マウス(The Jackson Laboratory)の 13.5 日齢の胚から MEFs を単離した[4]。C57BL/6 MEFs および AT₁R 欠失 MEFs に、レトロウイルスベクターを用いて、ヒトアミロイド前駆体タンパク質(hAPP695)cDNA を遺伝子導入した[17]。2 種類の細胞は、10%FBS(Sigma-Aldrich) を添加した DMEM(和光純薬工業)で培養した。細胞は、組織培養インキュベーター内で 5%CO₂ 条件下で 37°C で培養した。

2)試薬

ARB の一種であるテルミサルタン(Telmisartan; Telm)、および $\beta_{1,2}$ -AR 非選択的拮抗薬であるプロプラノロール(Propranolol; Prop)は、Sigma-Aldrich から購入し、DMSO に溶解したものをを用いた。 β_1 -AR 選択的拮抗薬のアテノロール(Atenolol; Aten)、およびビソプロロール(Bisoprolol; Biso)、および β_2 -AR 選択的拮抗薬の ICI-118,551 塩酸塩(ICI)は Sigma-Aldrich から購入し、DMSO に溶解した。

3)細胞溶解物の調製

hAPP695 を発現する線維芽細胞からの細胞溶解物は、プロテアーゼ阻害剤混合物を含む RIPA バッファー(50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、150 mM NaCl、1%NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%ラウリル硫酸ナトリウム)で調製した。細胞溶解物のタンパク質濃度は、BCA タンパク質アッセイキット(Thermo Fisher Scientific)を使用して決定した。

4)A β 酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)

細胞は 10%ウシ胎児血清入り DMEM(富士フィルム和光純薬株式会社)培地中にコンフルエントの約 80%となるように播種し、試薬処理 72 時間後の培養液

中の A β 40 および A β 42 量を、富士フィルム和光純薬株式会社から購入した ELISA キットで測定した。なお、すべてのサンプルは 3 回以上測定した。また、細胞溶解物のタンパク質濃度結果を用いて、ELISA 結果を補正した。

5) 統計解析

すべての統計解析データは平均値 \pm 標準誤差(means \pm SEM)として示した。ELISA で得られたデータの検定には一元配置分散分析と Bonferroni-Dunn test を行い、P 値 <0.05 は、統計的に有意と見なした。

結果

1) Telm 処理による A β 産生増加に及ぼす β -AR 拮抗薬、プロプラノロールの効果

当研究室、劉らによって AT₁R が A β 産生に関与していることが明らかとなっている[4]。また、ARB の一種である Telm が AT₁R を介して A β 産生を増加させることを見出している[4][5]。しかしながら、AT₁R が A β 産生をどのように調節しているか、AT₁R と A β 産生との関係について詳細なメカニズムは明らかになっていない。一方、G タンパク質共役型受容体である AT₁R が、他の GPCR とのヘテロ二量体化によりシグナル伝達が調節されることが強く示唆されている。そこで、著者らは AT₁R が A β 産生をどのように調節しているかを明らかにするため、AT₁R と β_2 -AR などが γ セクレターゼ活性を調節することに着目した[6][7]。

まず著者らは Telm 処理によって引き起こされる A β 産生増加が、 β_1 および β_2 -AR 非選択的拮抗薬である Prop の影響を受けるかどうか解析した。その結果、Telm 処理による A β 産生増加は、Prop を添加することにより用量依存的に減少することが明らかとなった(図 1A)。このことから、Telm によって引き起こされる A β 産生増加経路に AT₁R と β -AR の相互作用があることが強く示唆された。

2) β_2 -AR 選択的拮抗薬は、Telm 処理による A β 産生増加を抑制する。

1) で用いた Prop は $\beta_{1,2}$ -AR 非選択的拮抗薬である。そこで、次に、 β_1 -AR または β_2 -AR のどちらが Telm 処理による A β 産生増加の減少に関与するかを解析した。この目的のために、 β_1 -AR 選択的拮抗薬である Aten と Biso、および β_2 -AR 選択的拮抗薬である ICI の Telm 処理による A β 産生増加に対する影響を調べた。その結果、ICI は Telm による A β 産生増加を用量依存的に明らかに抑制したが(図 2A)、Aten 処理および Biso 処理は Telm による A β 産生増加を ICI ほど抑制できなかった(図 2B)。この結果は、Telm による A β 産生増加が β_2 -AR 選択的拮抗薬により減少することを示し、AT₁R と主に β_2 -AR 間の相互作用が A β 産生制御に関与していることを示唆している。

Biso 処理では、Telm による A β 産生増加を少し阻害していたが、阻害作用に用量依存性は見られなかった。Biso は β_1 -AR 選択的拮抗薬として用いられて

いるが、そのごく一部が β_2 -AR に拮抗することが知られているため[18]、 β_2 -AR と Biso の結合が、 β_2 -AR と AT_1R の相互作用に影響を及ぼすことにより、Telm 処理による $A\beta$ 産生増加の程度を低下させる可能性がある。または、 β_1 -AR も何らかの形で $A\beta$ 産生経路に関与している可能性も考えられる。

3) AT_1R 欠失細胞の $A\beta$ 産生における β -AR 拮抗薬の効果

次に、 AT_1R と β_2 -AR の相互作用と $A\beta$ 産生との関係をさらに確認するために、 AT_1R 欠失細胞を用いて β_2 -AR 選択的拮抗薬の $A\beta$ 産生に影響を及ぼすか検討した。その結果、図 3A に示すように、 AT_1R 欠失細胞の $A\beta$ 産生に対する Telm の効果は、20 μ M の ICI および Prop 処理によって有意な阻害効果が見られなかった。一方で、野生型細胞では Telm と同じ濃度の ICI または Prop 処理により有意に阻害された(図 3B)。実際、10 μ M の ICI は、Telm 処理による $A\beta$ 産生増加を減少させるのに十分であった(図 2A)。したがってこの結果は、 β_2 -AR 選択的拮抗薬および $\beta_{1,2}$ -AR 非選択的拮抗薬による、Telm 処理による $A\beta$ 産生増加の抑制には AT_1R の存在が必要であることを示している。また、 AT_1R 欠失細胞では、Telm 処理によって $A\beta_{40}$ 産生量に変化は見られないが、 $A\beta_{42}$ 産生量は Telm 処理によってわずかに増加した。ヒトとは異なり、マウスには AT_1R のサブタイプとして、 $AT_{1a}R$ および $AT_{1b}R$ があるが、全ての組織において $AT_{1a}R$ の方が $AT_{1b}R$ よりも優位に多く発現していることが明らかになっている[19] [20]。本研究で用いた AT_1R 欠失細胞は、 $AT_{1a}R$ 欠失細胞である。ARB は両方の AT_1R サブタイプに対して高い親和性を持っているため[19]、 AT_1R 欠失細胞への Telm 処理による $A\beta_{42}$ 産生増加はマウス細胞由来の $AT_{1b}R$ を介している可能性が考えられる。

考察

最近の研究結果から、これまで単量体として機能していると考えられていた GPCR が実際に二量体として存在し、他の GPCR ファミリーメンバーとヘテロ二量体として存在していることが示されてきている[13]。GPCR の1つである AT₁R も、 β_2 -AR を含む他の GPCR メンバーとのヘテロ二量体化によるシグナル伝達の調節の存在が強く示唆されてきている[8][9][10]。例えば、マウス心筋細胞における β_2 -AR 選択的遮断はアンギオテンシン誘発性 AT₁R 依存の心筋収縮を阻害する一方で、マウスへの ARB 投与ではカテコールアミン誘発性の心拍数上昇に対する最大反応を有意に減少させることが示された[8]。 β 遮断薬と ARB のこのトランス阻害効果は、GPCR へ拮抗薬が結合することにより、受容体関連のヘテロ二量体 GPCR が不活性化され、その結果として下流のシグナル伝達が阻害されると考えられる。しかしながら現在、GPCR ファミリーメンバーのヘテロ二量体によるシグナル伝達の詳細なメカニズムは、解明されていない。また、ヘテロ二量体を形成する GPCR ファミリーメンバーを明らかにする必要がある。

当研究室の劉らは AT₁R 欠失マウスが不完全なプレセニリン複合体を生成し、その結果、脳内の A β 沈着が減少することを報告した[4]。したがって、AT₁R はプレセニリン複合体の形成に関与し、 γ セクレターゼ活性を調節していると考えられる[4]。また、Telm 処理が Akt のリン酸化を引き起こし、A β 産生を増加させることも報告しており[5]、この反応はアンギオテンシン II 処理を行った細胞でも同様の反応が見られている。Telm はさまざまな ARB の中で最も高い結合親和性を持っているため、この強い結合がアンギオテンシン II と同様に A β 産生を増加させるシグナル伝達を引き起こすと考えられる。一方、 β_2 -AR もプレセニリン複合体の形成を調節することにより、 γ セクレターゼ活性に影響することが示されている[5]。しかしながら、AT₁R と β_2 -AR のヘテロ二量体化が γ セクレターゼ活性の調節にどのような影響をもたらすかは明らかになっていない。そこで、本研究では、AT₁R と β_2 -AR のヘテロ二量体化が γ セクレターゼ活性に重要であるかどうかを解明することを目的とした。その結果、Telm 処理による A β 産生増加は β_2 -AR 選択的拮抗薬によって抑制されたが、 β_1 -AR 選択的拮抗薬では β_2 -AR 選択的拮抗薬ほどの有意な抑制を示さなかった。さらに、 β_2 -AR 選択的拮抗薬は AT₁R 欠失細胞での A β 産生を阻害しなかった。これらの結果は、Telm 処理

による A β 産生増加における β_2 -AR 選択的拮抗薬の阻害効果は、AT $_1$ R の存在に依存していることを示している。したがって、Telm 処理による A β 産生増加は AT $_1$ R と β_2 -AR の相互作用に起因していると考えられる。アダプタータンパク質の 1 つとして知られている β アレスチンは、 β_2 -AR と相互作用し[21]、 β_2 -AR と AT $_1$ R の相互作用は β アレスチンと β_2 -AR の相互作用を促進することが示唆されている[22] [23]。 β アレスチン 2 は β_2 -AR と結合することによって γ -セクレターゼ活性を調節していると考えられる[24]。AT $_1$ R 上で Telm と結合すると、 β アレスチン 2 と β_2 -AR の相互作用が変化し、 γ セクレターゼ活性に影響を及ぼした可能性が考えられる。

AT $_1$ R と β_2 -AR は脳に存在するため[25] [26]、本研究により、AD 発症に関して次の可能性が考えられる。第一に、脳における A β の蓄積は、加齢に伴う AT $_1$ R と β_2 -AR のヘテロ二量体化の促進によって引き起こされる可能性がある。膜タンパク質またはリン脂質の酸化、糖化は加齢とともに進行することが知られているため[27] [28]、これらの変化は直接的または間接的に、AT $_1$ R および β_2 -AR のヘテロ二量体化の促進を引き起こし、A β 産生を増加させる可能性も考えられる。第二に、GPCR ファミリーのメンバーを標的とする薬の一部は、GPCR 間の二量体化によりシグナル伝達に変化し、A β 蓄積の増加または阻害に影響を与える可能性がある。脳にはセロトニン受容体、ドーパミン受容体、オピオイド受容体を含む多くの GPCR ファミリーメンバーが存在し[12]、これらの GPCR を標的とする抗うつ薬および抗精神病薬を含む多くの薬が A β 産生に影響を及ぼす可能性がある[29]。しかしながら、現時点では、これらの薬剤が AT $_1$ R または β_2 -AR などの GPCR をターゲットとしてヘテロ二量体化を調節することにより A β の蓄積に影響するかどうかは明らかでない。

AT $_1$ R と β_2 -AR のヘテロ二量体化に関するさらに詳細な研究、および、AD の発生または A β 蓄積に対する GPCR ファミリーメンバーを標的とする薬の効果に関する詳細な研究が必要であると考えられる。

結論

AD は、進行性の神経変異性疾患で、罹患者数は増加の一途をたどっており、経済的、人道的な面から早急な診断、予防、治療法の開発が望まれる。AD 脳に特徴的に観察される老人斑の主要構成成分は A β であり、A β 蓄積は AD の発症原因に深く関連する病理であると考えられている。これらの観点から、A β 蓄積抑制を目指し、A β の産生制御機構を明らかにすることは重要と考えられる。本研究では、AT₁R と β_2 -AR との相互作用による A β 産生制御という新しい A β 産生経路の存在を明らかにした(図 4)。

本研究では、ARB の一つである Telm 処理による A β 産生増加は、 β_1 -AR 選択的拮抗薬処理よりも β_2 -AR 選択的拮抗薬である ICI 処理により強く減少することを明らかとした。また、AT₁R 欠失細胞においては、Telm 処理による顕著な A β 産生増加が認められないだけでなく、 β_2 -AR 選択的拮抗薬による A β 産生抑制効果が消失することが明らかとなった。これらのことから、AT₁R と β_2 -AR の相互作用は A β 産生に関与している可能性が示された。

臨床現場での薬物療法において、AT₁R や β_2 -AR などの GPCR は治療上の標的とされており、これらに作用する薬剤は多用されている。今後、これらの薬物に関して、GPCR のヘテロ二量体化による A β 産生系への影響を詳細に研究する必要がある。これらのことが明らかになれば、薬物療法による AD 発症のリスクファクターを考慮した治療選択に新たな知見をもたらしていくのみならず、新しい AD 治療法や予防法が見出せるのではないかと考えている。

引用文献

- [1] P. Scheltens, K. Blennow, M.M.B. Breteler, B. de Strooper, G.B. Frisoni, S. Salloway, W.M. Van der Flier, Alzheimer's disease., *Lancet* (London, England). 388 (2016) 505–17. doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1.
- [2] D.J. Selkoe, J. Hardy, The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years., *EMBO Mol. Med.* 8 (2016) 595–608. doi:10.15252/emmm.201606210.
- [3] D.E. Barnes, K. Yaffe, The Projected Effect of Risk Factor Reduction on Alzheimer's Disease Prevalence, *Lancet Neurol*, 10 (9), (2011) 819-28. doi:10.1016/S1474-4422(11)70072-2.
- [4] J. Liu, S. Liu, Y. Matsumoto, S. Murakami, Y. Sugakawa, A. Kami, C. Tanabe, T. Maeda, M. Michikawa, H. Komano, K. Zou, Angiotensin type 1a receptor deficiency decreases amyloid β -protein generation and ameliorates brain amyloid pathology, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12059. doi:10.1038/srep12059.
- [5] J. Liu, S. Liu, C. Tanabe, T. Maeda, K. Zou, H. Komano, Differential effects of angiotensin II receptor blockers on A β generation., *Neurosci. Lett.* 567 (2014) 51–6. doi:10.1016/j.neulet.2014.03.030.
- [6] Y. Ni, X. Zhao, G. Bao, L. Zou, L. Teng, Z. Wang, M. Song, J. Xiong, Y. Bai, G. Pei, Activation of β 2-adrenergic receptor stimulates γ -secretase activity and accelerates amyloid plaque formation., *Nat. Med.* 12 (2006) 1390–6. doi:10.1038/nm1485.
- [7] R. Bussiere, A. Lacampagne, S. Reiken, X. Liu, V. Scheuerman, R. Zalk, C. Martin, F. Checler, A.R. Marks, M. Chami, Amyloid β production is regulated by β 2-adrenergic signaling-mediated post-translational modifications of the ryanodine receptor., *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 10153–10168. doi:10.1074/jbc.M116.743070.
- [8] L. Barki-Harrington, L.M. Luttrell, H.A. Rockman, Dual inhibition of β -adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo., *Circulation.* 108 (2003) 1611–8. doi:10.1161/01.CIR.0000092166.30360.78.
- [9] H.J. Chun, Z.A. Ali, Y. Kojima, R.K. Kundu, A.Y. Sheikh, R. Agrawal, L. Zheng, N.J. Leeper, N.E. Pearl, A.J. Patterson, J.P. Anderson, P.S. Tsao, M.J. Lenardo,

- E.A. Ashley, T. Quertermous, Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 3343–54. doi:10.1172/JCI34871.
- [10] S. AbdAlla, H. Lothar, A. Langer, Y. el Faramawy, U. Quitterer, Factor XIIIa Transglutaminase Crosslinks AT1 Receptor Dimers of Monocytes at the Onset of Atherosclerosis, *Cell.* 119 (2004) 343–354. doi:10.1016/j.cell.2004.10.006.
- [11] T. Gudermann, B. Nürnberg, G. Schultz, Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function., *J. Mol. Med. (Berl).* 73 (1995) 51–63.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7627630> (accessed May 6, 2019).
- [12] D.K. Vassilatis, J.G. Hohmann, H. Zeng, F. Li, J.E. Ranchalis, M.T. Mortrud, A. Brown, S.S. Rodriguez, J.R. Weller, A.C. Wright, J.E. Bergmann, G.A. Gaitanaris, The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 4903–8. doi:10.1073/pnas.0230374100.
- [13] E. Goupil, S.A. Laporte, T.E. Hébert, GPCR heterodimers: asymmetries in ligand binding and signalling output offer new targets for drug discovery, *Br. J. Pharmacol.* 168 (2013) 1101–1103. doi:10.1111/bph.12040.
- [14] T. Takezako, H. Unal, S.S. Karnik, K. Node, Current Topics in Angiotensin II Type 1 Receptor Research: Focus on Inverse Agonism, Receptor Dimerization and Biased Agonism, *Pharmacol Res.* 123, (2017) 40–50. doi: 10.1016/j.phrs.2017.06.013.
- [15] M. Parmentier, Heterodimer-specific signaling, *Nat. Chem. Biol.* 11 (2015) 244–245. doi:10.1038/nchembio.1772.
- [16] A. Thathiah, B. De Strooper, The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer’s disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 12 (2011) 73–87.
doi:10.1038/nrn2977.
- [17] H. Komano, H. Shiraishi, Y. Kawamura, X. Sai, R. Suzuki, L. Serneels, M. Kawaichi, T. Kitamura, K. Yanagisawa, A new functional screening system for identification of regulators for the generation of amyloid β -protein., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 39627–33. doi:10.1074/jbc.M205255200.
- [18] J.G. Baker, The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 , β_2 and β_3 adrenoceptors, *Br. J. Pharmacol.* 144 (2005) 317–322.
doi:10.1038/sj.bjp.0706048.

- [19] H. Sasamura, L. Hein, J.E. Krieger, R.E. Pratt, B.K. Kobilka, V.J. Dzau, Cloning, characterization, and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 (1992) 253–9. doi:10.1016/s0006-291x(05)80983-0.
- [20] V.J. Dzau, H. Sasamura, L. Hein, Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications., *J. Hypertens. Suppl.* 11 (1993) S13-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315512>.
- [21] S.K. Shenoy, R.J. Lefkowitz, Angiotensin II-Stimulated Signaling Through G Proteins and β -Arrestin, *Sci. Signal.* 2005 (2005) cm14–cm14. doi:10.1126/stke.3112005cm14.
- [22] G. Turu, L. Szidonya, Z. Gáborik, L. Buday, A. Spät, A.J.L. Clark, L. Hunyady, Differential β -arrestin binding of AT1 and AT2 angiotensin receptors., *FEBS Lett.* 580 (2006) 41–5. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.044.
- [23] A.D. Tóth, P. Gyombolai, B. Szalai, P. Várnai, G. Turu, L. Hunyady, Angiotensin type 1A receptor regulates β -arrestin binding of the β 2-adrenergic receptor via heterodimerization., *Mol. Cell. Endocrinol.* 442 (2017) 113–124. doi:10.1016/j.mce.2016.11.027.
- [24] A. Thathiah, K. Horré, A. Snellinx, E. Vandewyler, Y. Huang, M. Ciesielska, G. De Kloe, S. Munck, B. De Strooper, β -arrestin 2 regulates A β generation and γ -secretase activity in Alzheimer's disease., *Nat. Med.* 19 (2013) 43–9. doi:10.1038/nm.3023.
- [25] J.L. Labandeira-García, P. Garrido-Gil, J. Rodríguez-Pallares, R. Valenzuela, A. Borrajo, A.I. Rodríguez-Perez, Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability., *Front. Neuroanat.* 8 (2014) 67. doi:10.3389/fnana.2014.00067.
- [26] G.-S. Chai, Y.-Y. Wang, A. Yasheng, P. Zhao, β 2-adrenergic receptor activation enhances neurogenesis in Alzheimer's disease mice., *Neural Regen. Res.* 11 (2016) 1617–1624. doi:10.4103/1673-5374.193241.
- [27] J. Emerit, M. Edeas, F. Bricaire, Neurodegenerative diseases and oxidative stress., *Biomed. Pharmacother.* 58 (2004) 39–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14739060> (accessed May 7, 2019).
- [28] R.D. Semba, E.J. Nicklett, L. Ferrucci, Does accumulation of advanced

glycation end products contribute to the aging phenotype?, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 65 (2010) 963–75. doi:10.1093/gerona/glq074.

[29] K.A. Jacobson, New paradigms in GPCR drug discovery., *Biochem. Pharmacol.* 98 (2015) 541–55. doi:10.1016/j.bcp.2015.08.085.

謝辞

本研究をまとめるに際し、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました、岩手医科大学大学院薬学研究科神経科学分野の駒野宏人教授に心より感謝いたします。社会人大学院生として入学し、仕事と基礎研究の両立に苦悩していた際に、駒野教授が終始温かいお言葉をかけ続けてくださり、研究を続けることができました。

本研究を進めるに際し、ご指導とご助力をいただきました、日本薬科大学薬学部生命医療薬学分野の前田智司教授、名古屋市立大学医学部病態生化学分野の鄒鶴博士、岩手医科大学大学院薬学研究科神経科学分野の藤田融博士に深く感謝申し上げます。様々な場面での確かつ鋭いご指摘をいただき、その度に自身の未熟さに気づかされ、研究の奥深さを垣間見る視座を与えてくださいました。

また、貴重なお時間を割いて重要な研究手法についてご教示くださり、習得のための研修期間を設けてくださった東北大学大学院薬学研究科分子細胞生物学分野の青木淳賢教授に深く感謝申し上げます。

岩手医科大学薬学研究科臨床医科学分野の那谷耕司教授には研究指導を、機能生化学分野の中西真弓教授には主査を、薬物代謝動態学分野の小澤正吾教授と生体防御学分野の白石博久博士には副査をお引き受けいただき、この場を借りてお礼申し上げます。大変ご多忙のなか議論していただき、研究方針に関わる的確なアドバイスをいただきました。

所属研究室である岩手医科大学大学院薬学研究科神経科学分野で、研究の協力を行ってくれた多くの後輩たちに感謝致します。

最後に、未熟な自分をいつも見守り育ててくれた両親、忙しい時期もひたむきに支え続けてくれた妻と、元気に産まれてきてくれた娘に心より感謝致します。

図表集

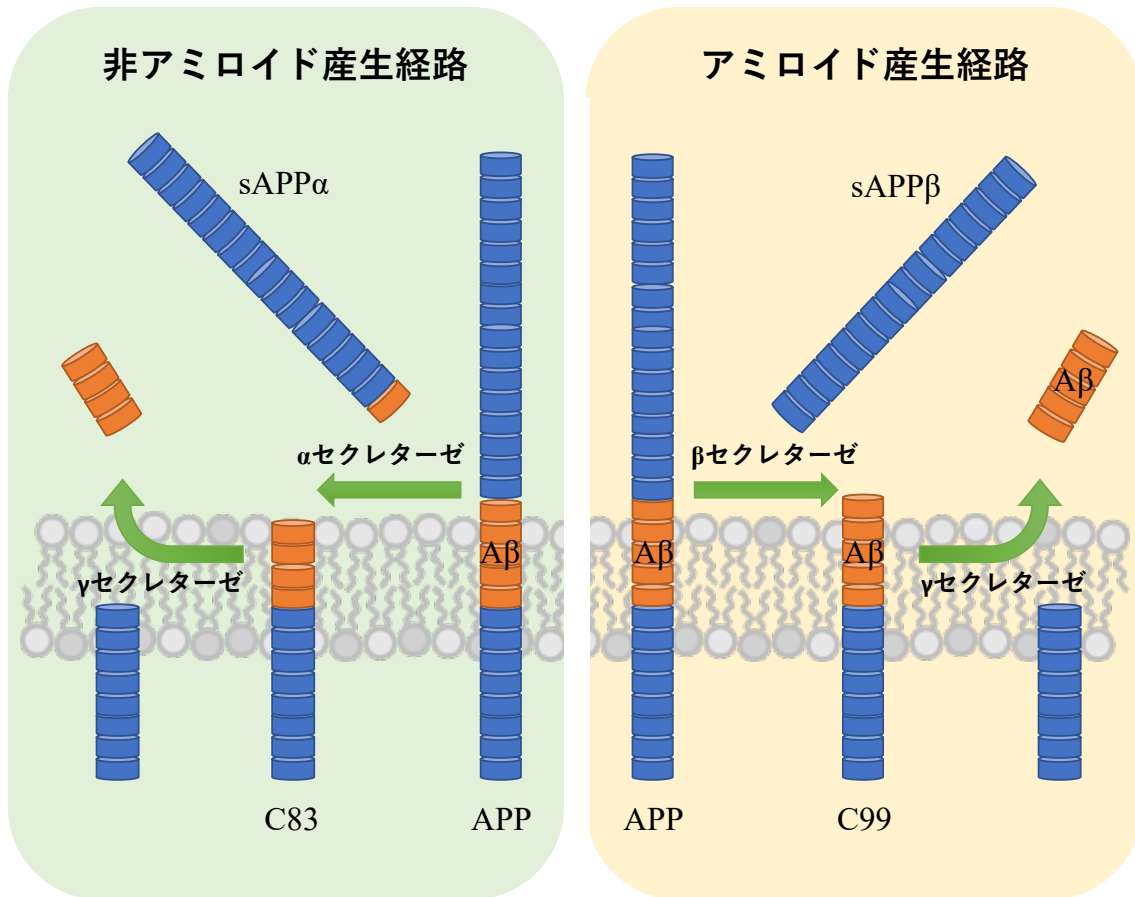


図 i 非アミロイド産生経路とアミロイド産生経路

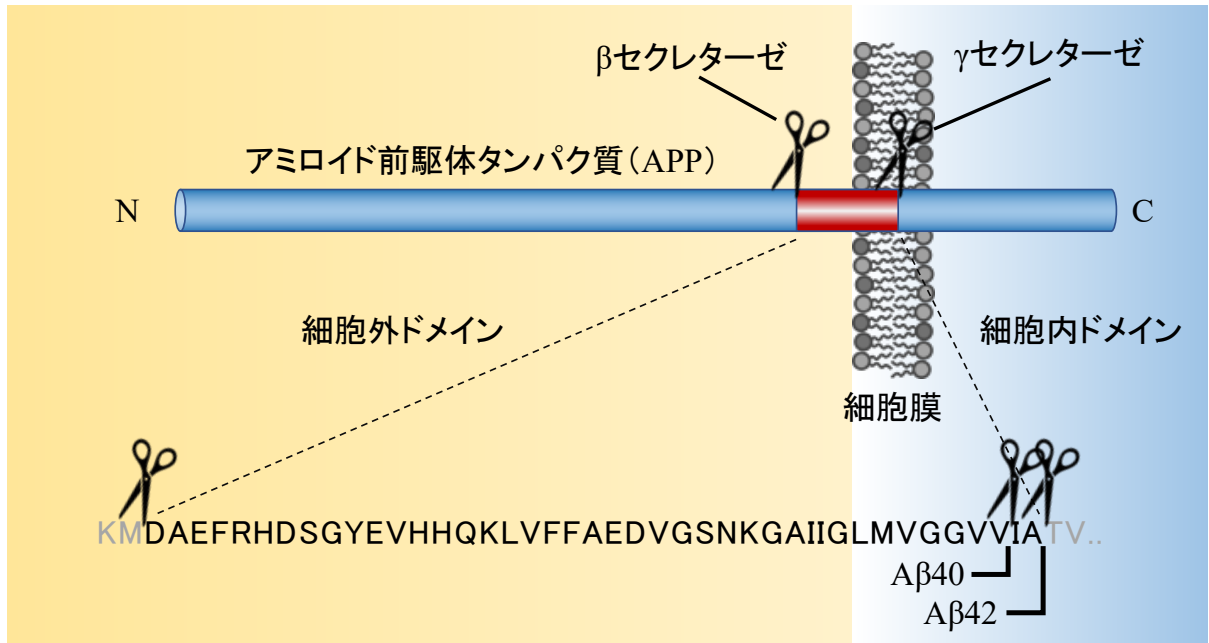


図 ii Amyloid precursor protein (APP) の β および γ セクレターゼによる $A\beta$ 産生

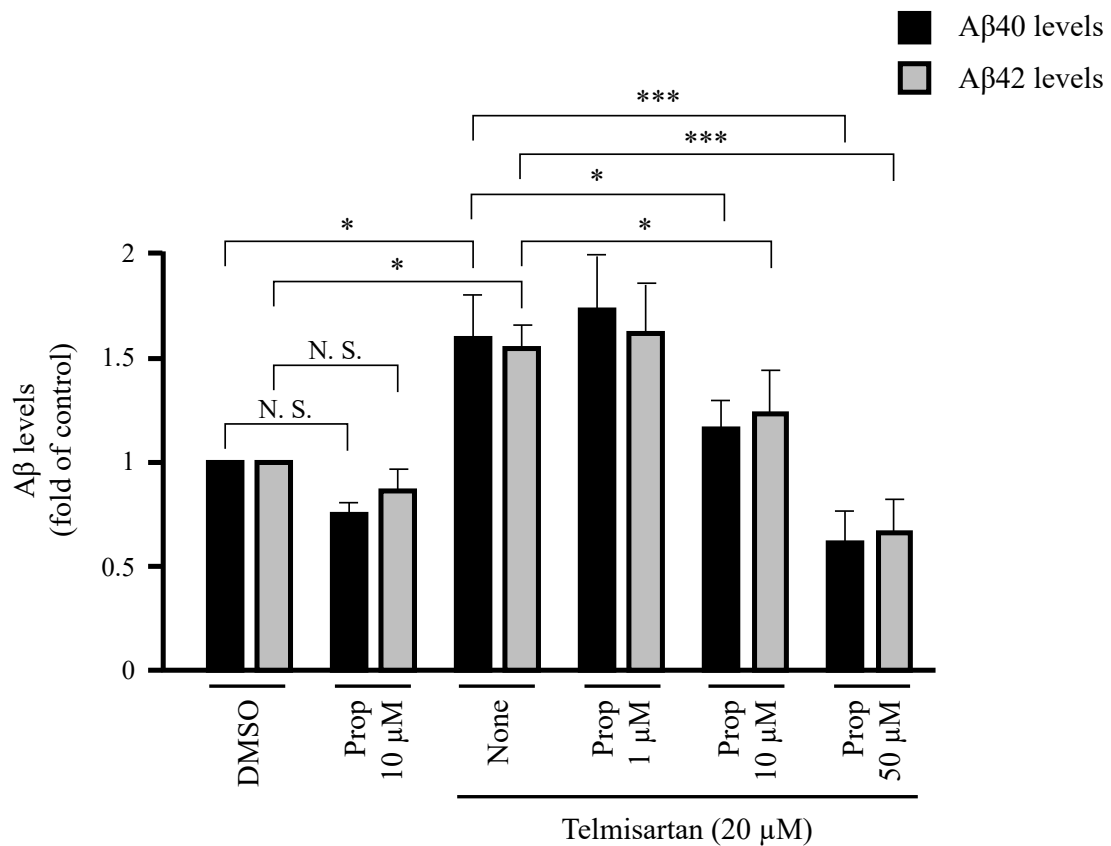


図1. Telm処理によって引き起こされるAβ産生増加は、β-AR拮抗薬のプロプラノロールにより用量依存的に抑制される。

テルミサルタン(Telmisartan; Telm)処理によるAβ産生増加に対するプロプラノロール(Propranolol; Prop)の効果。hAPP695を発現する線維芽細胞を、Telm存在下(+)または非存在下(-)でPropとともに72時間培養した。培養溶液中のAβレベルをELISAで測定した。データは4つの独立した実験の平均値。エラーバーはmeans ± SEMを示した。* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.005(一元配置分散分析とそれに続くBonferroni-Dunn test)。N.S.、有意差なし。

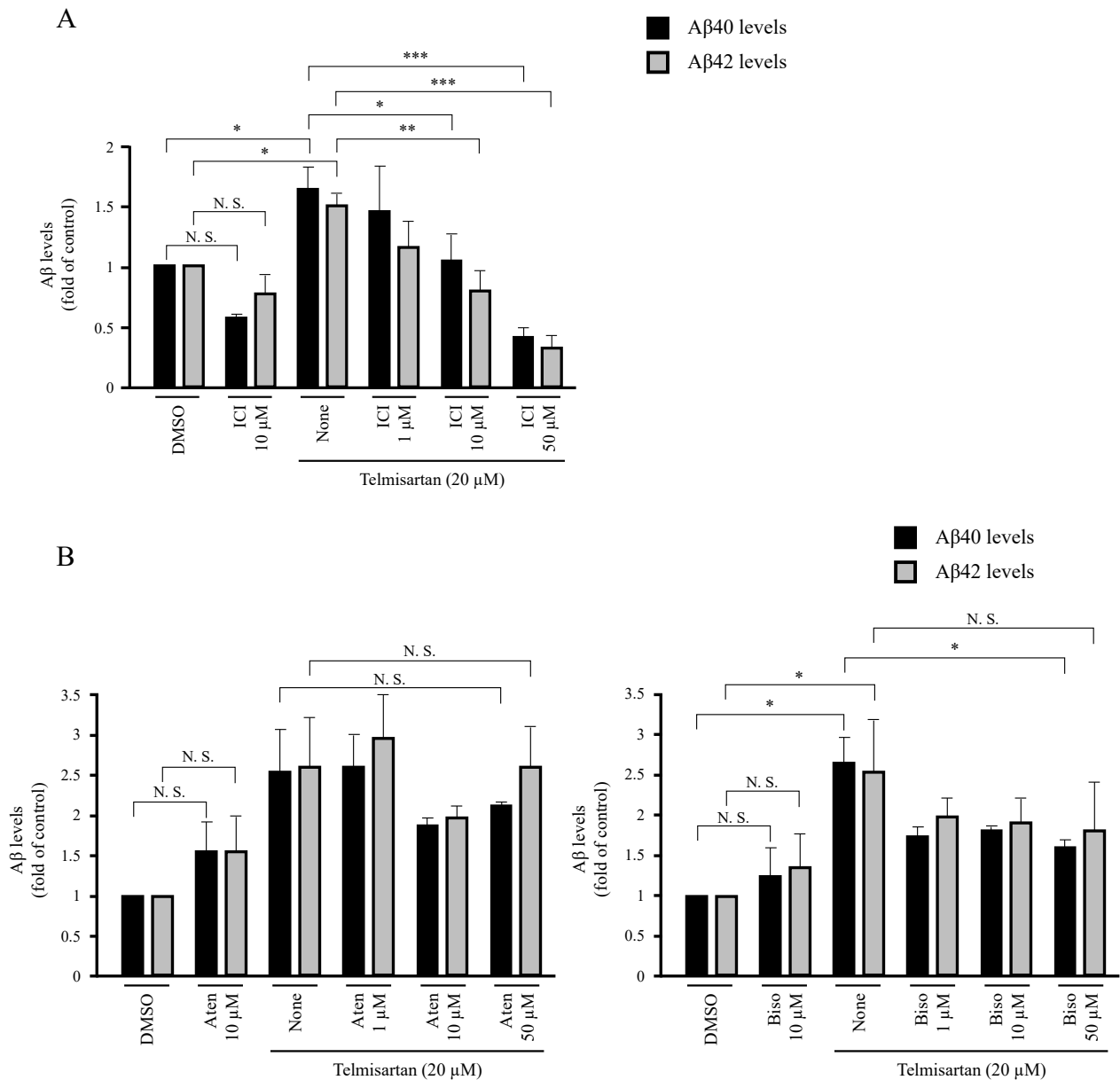


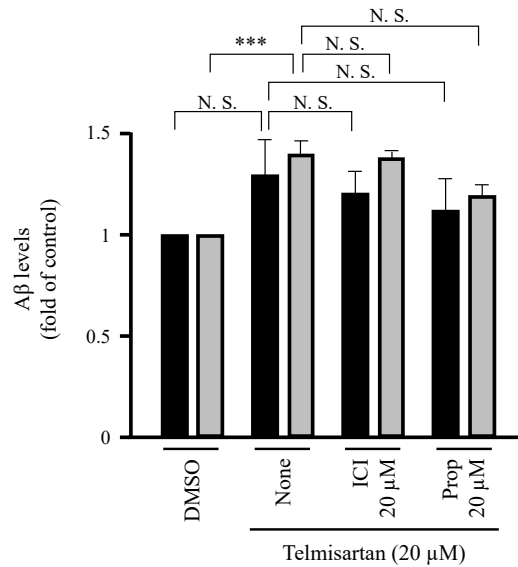
図2. β₂-AR選択的拮抗薬は、Telm処理によるAβ産生増加を抑制する。

A、テルミサルタン(Telmisartan; Telm)によって引き起こされるAβ産生増加に対するβ₂-AR選択的拮抗薬ICI-118,551(ICI)の効果。hAPP695を発現する線維芽細胞を、Telm存在下(+)または非存在下(-)で、72時間、β₂-AR選択的拮抗薬とともに培養した。培養溶液中のAβレベルをELISAで測定した。データは4つの独立した実験の平均値。エラーバーはmeans ± SEMを示した。* P < 0.05、** P < 0.01、*** P < 0.005(一元配置分散分析とそれに続くBonferroni-Dunn test)。N.S.、有意差なし。

B、TelmによるAβ産生増加に対する、β₁-AR選択的拮抗薬のアテノロール

(Atenolol; Aten)、およびビソプロロール(Bisoprolol; Biso)の効果。hAPP695を発現する線維芽細胞を、Telm存在下(+)または非存在下(-)で β_1 -AR選択的拮抗薬とともに72時間培養した。培養溶液中のA β レベルをELISAで測定した。データは4つの独立した実験の平均値。エラーバーはmeans \pm SEMを示した。* P < 0.05(一元配置分散分析とそれに続く Bonferroni-Dunn test)。N.S.、有意差なし。

A $Agtr^{-/-} / APP^{+}$ cell



B $Agtr^{+/+} / APP^{+}$ cell

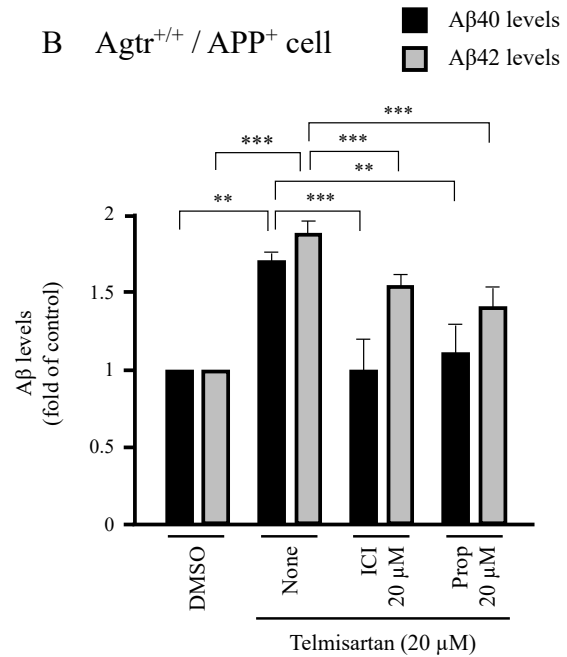


図3. AT_1R の欠失により、 $A\beta$ 産生に対する β_2 -AR選択的拮抗薬の効果が抑制される。

A、hAPP695を発現する AT_1R 欠失線維芽細胞を、Telm存在下(+)または非存在下(-)でICIまたはPropとともに72時間培養した。培養溶液中の $A\beta$ レベルをELISAで測定した。データは4つの独立した実験の平均値。

$Agtr^{-/-} / APP^{+}$ 細胞：hAPP695を発現する AT_1 受容体欠失線維芽細胞

B、APPを発現する野生型線維芽細胞を、Telm存在下(+)または非存在下(-)で72時間、ICIまたはPropとともに培養した。培養溶液中の $A\beta$ レベルをELISAで測定した。データは4つの独立した実験の平均値。

$Agtr^{+/+} / APP^{+}$ 細胞：hAPP695を発現する野生型線維芽細胞

エラーバーはmeans \pm SEMを示した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.005$ (一元配置分散分析とそれに続くBonferroni-Dunn test)。N.S.、有意差なし。

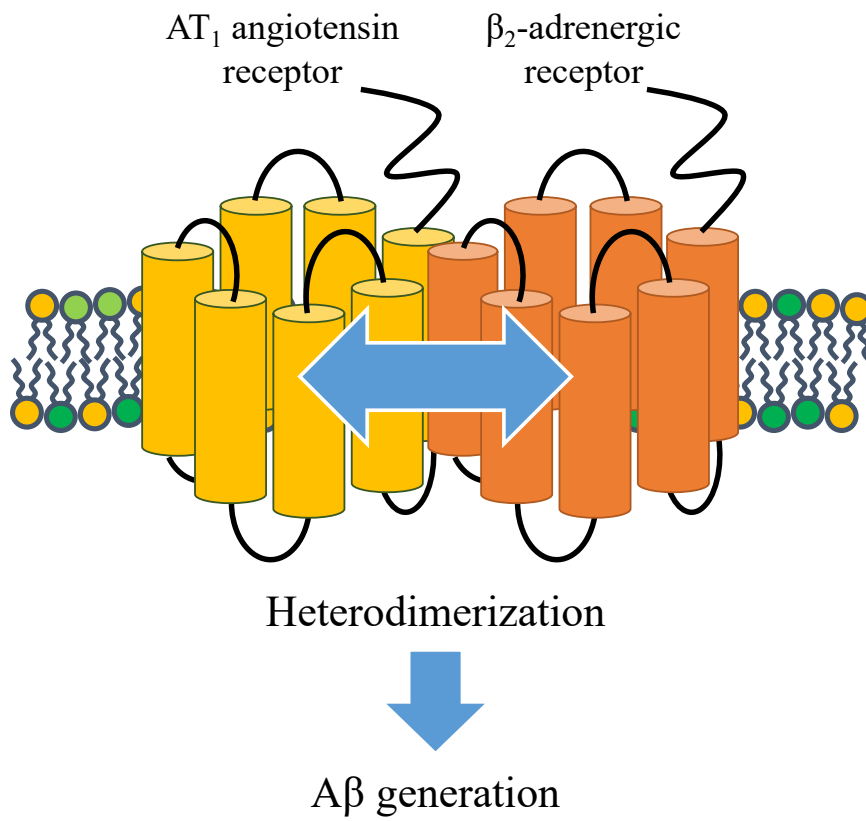


図4. AT₁Rとβ₂-ARのヘテロ二量体化は、Aβ産生制御に関与する。