

퇴행성 뇌질환 치료제 Tacrine 유도체의 프로스타글란딘 생합성 억제효과

신 혜 순[#]

덕성여자대학교 약학대학

(Received January 28, 2005; Revised February 14, 2005)

Inhibitory Effects of Tacrine Derivatives on Activity of Prostanoids Biosynthesis Prostaglandin Biosynthesis: A Potential Use for Degenerative Brain Disease Treatment

Hea Soon Shin[#]

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract — Tacrine analogues for degenerative brain disease treatments have been designed. A series of diazaanthrine derivatives as novel analogues of tacrine has been prepared through the alkyl substitution and the ring expansion. They were expected to retain anti-inflammatory activity by inhibition of prostaglandin production with reduction of side effect as the selective prostaglandin synthase inhibitor. Prostaglandin synthase expression is associated with the deposition of beta-amyloid protein in neuritic plaques in brain inflammation. Therefore selective prostaglandin synthase blockade is important for the prevention and treatment of alzheimer's disease. To evaluate inhibitory effect of prostaglandin synthase, synthetic tacrine derivatives were screened with accumulation of prostaglandin biosynthesis by lipopolysaccharide in aspirin-treated murine macrophage cell. Most of synthetic compounds have shown significant prostaglandin synthase activities *in vitro* screening with 84.3~33.6% inhibition of the prostaglandin E₂ production at 10 µg/ml.

Keywords □ tacrine derivatives, prostaglandin synthase inhibitor

우리나라는 2000년 65세 이상 노인 인구의 구성비가 7% 상회함으로써 고령화사회(aging society)로 접어들었고, 2022년에는 14%를 넘을 것으로 예상되어 고령사회(aged society)로 진입할 것으로 예측된다. 이와 같은 인구구조의 고령화 현상으로 인해 치매인구가 급증하여 1998년 약 15만명에서 2000년에는 18만명으로 늘었고, 2010년에는 30만명으로 급격히 늘어날 것으로 예상된다. 역학조사에 따르면 치매질환 유병율은 65세 이상 노인에서 9.5~13.0% 정도이며, 신약개발에 따른 시장규모는 전 세계 70조원 이상으로 추산되고 있다.^{1,2)}

치매(dementia)는 퇴행성 뇌질환으로서 비중이 큰 원인질환은 알츠하이머질환(alzheimer's disease)과 혈관성 치매(vascular dementia)이다. 우리나라에서 발생빈도가 높은 혈관성 치매는 혈관성 병변이 있으며 환자의 약 2분의 1이 알츠하이머질환을 동시에 갖고 있다. 알츠하이머질환은 환자의 약 3분의 1정도가 뇌혈

관성 병변을 갖고 있으며 그 특징은 재생이 불가능한 신경세포 사멸과 신경세포 내부의 신경원섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)와 세포외의 신경반(neuritic plaques)이다. 이는 β-amyloid의 침착에 의하여 생겨난 것으로 분자량이 큰 전구단백질(amyloid protein precursor, APP)이 β-secretase에 의해 분해된 후 소수성 잔기가 많은 39~43개의 아미노산들이 생겨 서로 응집되기 때문이다. 1907년 Alois Alzheimer가 발표한 환자의 뇌 부검 소견에서도 전형적인 알츠하이머질환 병리적 특징 외에 상당한 정도의 혈관성 변화가 아울러 관찰되었음이 밝혀졌다.³⁻⁵⁾ Oka와 Pasinetti 등도 항염 효과를 갖는 PGS-2 억제제가 β-APP 발현을 감소시키고 β-APP 진행경로를 조절하며 β-amyloid의 집적과 침착을 감소시키는 새로운 약물로 개발될 수 있다고 보고하였다.^{6,7)} 또한 알츠하이머질환 특징인 노인반(senile plaque)의 주변에서 amyloid 단백질 이외에 염증과 관련된 α-1-antichymotrypsin과 α-2-macroglobulin과 같은 단백질이 발견되었으며 이는 항염성 약물이 치매질환의 위험을 감소시키는 것으로 조사된 여러 연구 결과를 증명하였다.⁸⁾

알츠하이머질환 치료제로서 1993년 미국 FDA에서 최초 승인한 제1세대 아세틸콜린분해효소(acetylcholinesterase, AChE)

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-901-8498 (팩스) 02-901-8386
(E-mail) hsshin@duksung.ac.kr

억제제인 Cognex(tacrine, tetrahydroaminoacridine)는 소수성으로 blood brain barrier를 쉽게 통과하는 장점이 있으며 반감기가 짧아 1일 4회 복용해야 하는 번거로운 문제점과 부작용으로서 투약 후 30% 정도가 잠재적으로 간의 alanine aminotransferase를 증가시킴으로써 간독성을 일으킴이 보고되어 현재는 극히 제한적으로 사용되고 있다. 1996년 제2세대 아세틸콜린분해효소 억제제로 Aricept(donepezil)가 승인되었고, 2000년에 Exelon(rivastigmine), 2001년에는 Reminyl(galantamine)이 승인되었다. 현재 사용 중인 아세틸콜린분해효소 억제제류는 신경손상을 회복시키는 작용이 있으나 알츠하이머질환의 진행을 정지시키는 근본적인 치료가 아닌, 초기 상태 및 중기 증세를 지연시키는 수준에 머물고 있는 실정이다.⁹⁻¹¹⁾ 그런데 Tocco 등에 의해 diclofenac이나 meloxicam 등의 prostaglandin synthase-2(PGS-2) 억제제가 치매증상의 시작을 지연시키거나 진행을 느리게 또는 정지시킬 수 있다는 연구결과가 보고되었다.¹²⁾ 한편, Pasinetti 등은 비스테로이드성 항염제(nonsteroidal antiinflammatory drug, NSAID)가 심장마비로부터 회복 후 나타나는 기억력손상과 알츠하이머질환 치매예방에 효과가 있으며 ibuprofen 등은 신경보호 작용을 나타냈고 aspirin이나 indomethacin 등 PGS-1 억제제의 알츠하이머질환의 발병을 현저히 감소시키는 예방효과를 보고한 바 있다. 실제적으로 류마티스성 관절염과 알츠하이머질환 등을 동시에 가지고 있는 환자들의 경우에 NSAID의 병용투여시 알츠하이머질환의 발병을 현저히 감소시킨다는 사실도 밝혀졌다.^{13,14)}

따라서 기존 알츠하이머질환의 치료제로서의 효과도 보유하면서 더불어 PGS 활성저해를 통하여 뇌신경 염증경로를 차단하는 예방효과도 갖춘 약물을 개발하기 위한 연구가 중요하다고 사료된다. PGS는 phospholipase, lipoxigenase 등과 같이 염증의 매개체인 eicosanoids의 생합성과정에 관여한다. PGS는 2종류의 isoform이 있는데, PGS-1은 정상 위점막세포의 PG 생합성을 억제하지 않아서 위·장관 보호작용이 있는 반면에 PGS-2는 그람 음성균의 세포벽 구성성분인 lipopolysaccharide(LPS) 및 tyrosine kinase 등의 자극에 반응하여 즉각적으로 유도되어진다. 일부 신생조직이나 특히 생리적 환경에 의해서도 염증부위에서 활성이 증가되어 PG를 생합성한다.¹⁵⁾ 즉, 염증부위의 PGS-2 효소에 선택적으로 작용하는 항염 선택성이 높은 정도를 기존 아세틸콜린분해효소 억제제인 tacrine 유도체들의 합성에 착안하였고, 동일한 실험모델에 의한 분석조건에 따른 합성 tacrine 유도체들의 PGS-2 선택성의 검색 및 효소면역 분석법을 이용한 PGS-1과 PGS-2에서의 IC₅₀를 계산하여 비교 연구해 보고자 하였다.

실험 방법

시약 및 실험재료

실험에 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM),

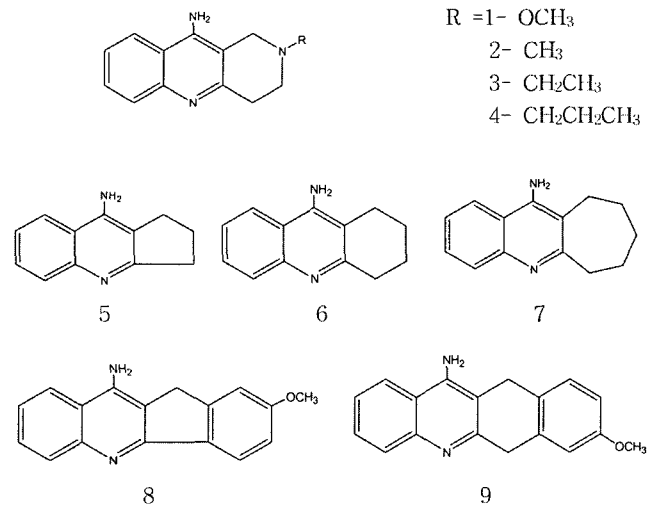


Fig. 1 - Structure of tacrine analogues.

fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA 등은 Gibco-BRL(Grand Island, NY)에서 구입하여 사용하였다. Murine macrophage RAW 264.7 세포주는 한국 세포주은행에서 분양받았으며 prostaglandin E₂(PGE₂) 및 PGE₂-acetylcholinesterase tracer는 Cayman chemical Co(Ann Arbor, MI)에서 구입하였다. Aspirin(acetylsalicylic acid), lipopolysaccharide(LPS, *E. coli* 0111: B4), arachidonic acid(AA), dimethylsulfoxide(DMSO) 등의 시약을 Sigma chemical Co(St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였으며 기타 모든 시약들은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다. 기존 알츠하이머질환 치료제인 tacrine 유도체를 Harvey와 같은 방법으로¹⁶⁾ 구조변형을 시도하여 합성한 화합물들 9종에 대하여 PGS에 대한 저해활성을 나타낼 수 있는지를 확인하였다. 합성 화합물들은 300 MHz Gemini Varian NMR spectrometer와 Perkin-Elmer FT-IR spectrometer GX 및 Agilent 6890 GC 및 5973 MS 등을 사용하여 구조확인한 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

세포 배양 및 약물처리

PGS가 발현되는 세포주인 murine macrophage RAW 264.7 세포를 5% CO₂, 37°C 배양기에서 DMEM, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 및 10% FBS가 함유된 배지로 2~3일 간격으로 계대 배양하였으며 2~3회 계대한 세포를 실험에 이용하였다. 바닥에 부착된 세포를 분리할 때는 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 배양기의 부착면으로부터 분리시킨 다음 원심분리하고 3회 세척한 후 FBS가 함유되어 있지 않은 DMEM으로 50×10⁴ cell/ml가 되도록 현탁시켰다. 이 현탁액에 아스피린을 최종농도가 500 µM이 되도록 첨가하여 세포에 잔존하는 PGS의 활성을 비가역적으로 저해하였다. 이 현탁액을 96 well 세포배양판의 각 well에 200 µl를 가하여 5% CO₂,

37°C에서 4시간 동안 배양하고 세포를 plate의 각 well 바닥에 부착시켰다. 부착된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세척한 후 각 well 표면에 붙어있는 세포를 실험에 사용하였다.

LPS에 의해 유도된 prostaglandin synthase 저해효과 측정

세포가 부착되어 있는 각 well에 1 µg/ml의 LPS를 함유한 10% FBS-DMEM을 200 µl씩 넣었다. 이때 대조군에는 LPS가 없는 배지만을 넣었다. LPS가 포함된 배지로 교환한 후 DMSO에 녹인 검색시료를 적정량 처리하고, 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 18시간 배양하여 그 상층액을 회수하여 유리된 PGE₂량을 효소면역분석법을 사용하여 정량하였다.¹⁸⁾ 즉, 항체가 부착되어 있는 plate의 각 well에서 회수한 상층액과 함께 PGE₂-acetylcholine-esterase tracer를 넣어 상온에서 18시간 배양한 후, well에 남아있는 용액을 털어내고 0.05% tween 20-PBS로 각 well을 5회 세척하고 Ellman 시약 160 µl를 각 well에 넣은 후 7시간 배양하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. PGE₂ 표준품으로 검량선을 작성하여 각 시료를 처리한 배양액 중의 PGE₂ 생성량을 구하였다. PGE₂의 정량은 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 작성하여 각 세포 배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다. 실험군들은 LPS만 가한 대조군은 100% 활성 유발군, LPS와 ASA 등 약물을 가하지 않은 군은 0% 활성 유발군으로 나누었다. 100% 활성은 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 생성된 PGE₂의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 % 저해값을 구하였다. 실험군과 대조군은 duplicate로 3회 이상 동일 실험을 진행하였다.

Prostaglandin synthase-1 및 -2의 IC₅₀ 값 측정

PGS-2 유도발현은 배양된 최종세포수가 5×10⁶ cell/ml로 조정된 96 well 세포배양판의 각 well에 10 µg/ml의 LPS를 처리하고 3%의 FBS가 함유된 DMEM 배지 200 µl를 넣고 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 PGS-2와 PGS-1 활성을 유도시켰다. 16시간 동안 배양한 후, PBS로 세포를 세척하고 각 well에 FBS가 함유되지 않은 DMEM 배지 200 µl를 넣고 검색시료를 적정량 처리하여 5~15분간 37°C에서 방치하였다. 최종농도가 10 µM이 되도록 AA를 처리하고 15~20분간 재배양하였으며 PGS-1 활성 유도의 경우, 어떤 처리도 하지 않은 대식세포를 사용하였다. 반응 종료 후 일정량의 상층액을 회수하여 효소 면역분석법에 따라 ELISA plate reader를 이용하여 흡광도 504 nm를 측정하는 방법으로 유리된 PGE₂를 정량하였다. PGE₂의 정량은 흡광도 변화와 농도와의 관계를 나타내는 표준 검량선을 이용하여 각 세포 배양액에 함유된 PGE₂의 함량을 계산하였다. 각 화합물들의 IC₅₀는 AA를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 PGE₂에 대한, AA를 처리한 실험군에서 생성된 PGE₂량의 차이로부터 % 저

해값을 구한 후 산출하였다. 실험군과 대조군은 duplicate로 3회 이상 동일 실험을 진행하였다.

실험결과 및 고찰

Choline성 신경전달물질 대체방법과는 다른 각도에서 접근하는 알츠하이머질환 치료전략으로 β-amyloid 축적을 감소시키고, 뇌 속에서 방출되는 β-APP를 선택적으로 감소시키는 연구의 중요성이 강조되고 있다. 세포막 구성 성분인 AA를 기질로 하여 프로스타글란딘류의 생합성에 관여하는 PGS 활성을 저해하여 β-amyloid의 침착을 억제하고 알츠하이머질환의 발현시기를 지연시키는 등의 예방효과를 나타낼 수 있는지를 확인해 보고자 합성한 화합물들의 효과를 검색하였다. 선택적인 PGS-2 억제제는 PGS-1의 억제로 인한 위염, 십이지장궤양과 그로 인한 출혈 또한 신장에서 PG 생합성을 방해하는 작용들을 유발시키는 부작용을 막을 수 있기 때문에 기존 알츠하이머질환 치료제인 tacrine 구조를 Harvey의 합성법에 따라 구조변형을 시도하였다. 합성한 화합물로서 9종에 대한 항염활성의 검색실험은 PGS가 발현되는 murine macrophage RAW 264.7 세포주를 이용하였다. 실험결과 분석은 LPS를 처리함으로써 유도된 PGS로 인하여 PG 생합성이 억제된 정도를 정량하였다. 100% 활성은 LPS를 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 생성된 PGE₂의 차이를 기준으로 하여 각 시료의 % 저해값을 구하였다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이, tacrine 구조 C환에 alkyl piperidone group을 도입한 화합물들(1~7)의 효소활성 저해도는 10 µg/ml의 농도에서 84.3±12.3~33.6±22.7% 정도의 PGE₂ 생성 억제효과를 나타내었고, 그리고 tacrine 구조 C, D환을 연결하여 methoxy group으로 치환된 화합물들(8~9)은 80.5±4.62~79.5±2.75% 정도의 PGS 활성 억제효과를 나타내었다. 양성 대조군으로 사용된 celecoxib와 indomethacin은 IC₅₀ 값이 각 0.7 ng/ml과 2.1 µg/ml로 나타나 PGE₂ 생성을 효과적으로 억제하였다. 또한, Fig. 2에 나타난 실험결과가 PGS-2 이외에 tyrosine kinase

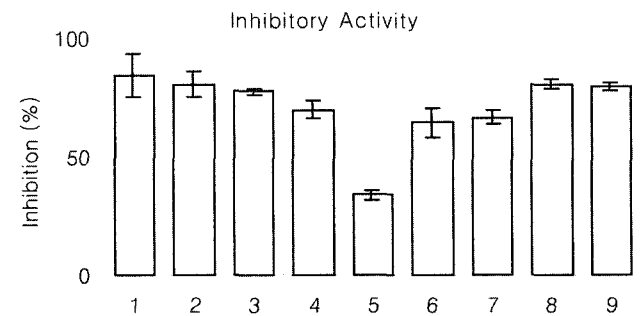


Fig. 2 - % Inhibitory activity of tacrine analogues (1~9) on prostaglandin synthase in LPS-stimulated RAW 264.7 cell at 10 µg/ml.

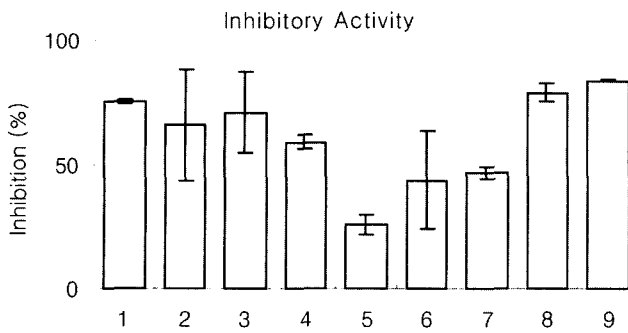


Fig. 3 - % Inhibitory activity of tacrine analogues (1~9) on prostaglandin synthase-2 in LPS-stimulated murine macrophage cell with 10 μ M arachidonic acid.

와 같은 다른 효소저해에 의한 작용이 아님을 입증하기 위하여 PGS-2의 직접적인 저해활성도를 측정하였다. McGeer 등은 PGS-1은 항상성을 유지하는 역할을 하고 PGS-2가 염증유발에 직접적인 관여를 하기 때문에 알츠하이머성 뇌질환의 치료에 보다 효과적으로 중요한 것은 PGS-2 선택성이라고 보고한 바 있다.¹⁷⁾ 따라서 PGS-1과 PGS-2 isoform 중 어느 쪽에 보다 직접적인 저해활성을 갖는가를 판단하기 위하여 진행한 실험결과는 Fig. 3에 나타내었다. 대식세포(macrophage cell)에 LPS 10 μ g/ml로 16 시간 배양하여 PGS-2 발현을 유도시킨 후 AA를 처리함으로써 생성되는 prostaglandin의 변화정도를 효소면역 분석법을 이용하여 정량하였다. 각 유도체들의 IC₅₀ 값은 AA를 처리하지 않은 대조군과 처리한 군의 PGE₂ 생성량의 차이로부터 % PGE₂ 생성 억제율을 구한 후 계산하였다. Fig. 3의 결과에서는 tacrine 구조 C환에 alkyl piperidone group을 도입한 화합물들(1~7)은 58.6 \pm 6.8~75.3 \pm 48.9% 저해능으로 비교적 유의성 있는 정도로 PGS에 대한 저해작용을 나타내었다. 이 중 화합물 4, 5, 6 및 7은 25.6 \pm 7.8~46.4 \pm 11.5% 저해능이 나타나서 아주 미약하나마 PGS 저해작용을 보일 뿐인 것으로 측정되었다. 그리고 tacrine 구조 C, D환을 연결하여 methoxy group으로 치환된 화합물들(8~9)은 78.8 \pm 8.5~83.4 \pm 3.4% 저해능으로 나타내어 가장 강한 PGS 저해 활성을 보였다. 대조약물인 celecoxib와 indomethacin의 측정결과에서는 96%와 86% 저해능으로 나타나서 PGS 저해 활성 IC₅₀ 값은 두 약물 모두 0.1 ng/ml~3 μ g/ml 이하로 계산되었다.

Table I에 나타난 실험결과와 같이 tacrine 구조 C환에 alkyl piperidone group을 도입한 화합물들(1~7)의 PGS-2 활성 IC₅₀는 화합물 1은 32.54 \pm 26.78 μ g/ml로, 화합물 2는 49.62 \pm 17.47 μ g/ml로, 화합물 3은 44.34 \pm 10.57 μ g/ml로 계산되었고, 화합물 4, 5, 6 및 7은 % 저해값이 50% 이하로 나타났기 때문에 IC₅₀ 값은 구할 수 없었다. 그리고 tacrine 구조 C, D환을 연결하여 methoxy group으로 치환된 화합물들(8~9)의 PGS-2 활성 IC₅₀는 화합물 8이 25.76 \pm 47.44 μ g/ml로, 화합물 9는 29.48 \pm 25.67

Table 1 - IC₅₀ values for tacrine analogues on PGS-1 and PGS-2 inhibitory activity in murine macrophage cells

Compounds	IC ₅₀ (μ g/ml)		
	PGS-1	PGS-2	Ratio*
1	54.67 \pm 46.58	32.54 \pm 26.78	1.7 \pm 2.2
2	45.887 \pm 28.33	49.62 \pm 17.47	1.1 \pm 2.3
3	48.23 \pm 46.40	44.34 \pm 10.57	1.0 \pm 0.6
8	64.87 \pm 18.69	25.76 \pm 47.44	2.5 \pm 23.4
9	70.42 \pm 23.66	29.48 \pm 25.67	2.4 \pm 13.8
ibuprofen	3.263 \pm 2.738	1.727 \pm 0.045	1.9 \pm 18.5
indomethacin	0.073 \pm 1.061	0.068 \pm 0.015	1.0 \pm 14.9

The data show mean \pm the S.D. for three determinations calculated from the means of triplicate determinations. *The ratio means the IC₅₀ values for the compounds on PGS-1 relative to PGS-2 activity.

μ g/ml로서 PGS-2 활성저해 선택성이 잠재하는 결과가 확인되었다. 대부분의 화합물들의 결과에서 효소유도 실험과 유사한 결과로 PGS-2 활성저해 효과를 보여 실험의 신뢰도가 높은 것으로 나타났다.

그러나 O'Banion 등의 연구에 따르면 알츠하이머성 뇌질환을 나타내는 CA3 hippocampal neuron과 microglia를 분석한 결과 PGS-1의 발현이 증가하였으며 PGS-1 선택성이 강한 비스테로이드성 항염제가 뚜렷한 억제효과를 보였다고 보고하였다.^{18,19)} PGS-1 저해활성의 분석을 위해서는 aspirin 전 처리를 하지 않은 세포를 사용하였다. PGS-1 저해실험의 결과는 Table I에 나타내었듯이 화합물 1과 2 및 3은 IC₅₀ 값이 54.67 \pm 46.58와 45.88 \pm 28.33 및 48.23 \pm 46.40 μ g/ml로 비교적 유의적인 PGS-1 저해활성을 나타냈다. 화합물 4, 5, 6 및 7은 PGS-2 저해활성의 분석 결과와 마찬가지로 IC₅₀ 값을 계산할 수 없었으며 화합물 8과 9는 IC₅₀ 값이 64.87 \pm 18.69로, 70.42 \pm 23.66 μ g/ml로 다소 약한 정도로 PGS-1 저해활성을 나타내었다.

Rogers 등의 보고에 따르면 뇌신경 질환치료에 aspirin이나 indomethacin 등의 비스테로이드성 항염증제의 투여가 질환의 예방효과를 기대할 수 있음을 확인한 결과가 보고된 바 있었다.²⁰⁾ 한편, Aisen 등은 알츠하이머질환 환자에게 indomethacin을 투여한 결과에서 이 약물이 알츠하이머질환의 진행을 지연시킬 수 있으나 반면에 prednisolone은 효과가 없었다고 보고하기도 하였다.²¹⁾ 한편, PGS-2 선택성(PGS-1/PGS-2)의 IC₅₀ 값 비율(ratio)은 Table I에 나타난 바와 같이 화합물 1과 2 및 3은 1.7, 1.1 및 1.0 결과로 PGS-1 선택성 측면이 보다 강한 것으로 화합물 8과 9는 2.5와 2.4로 PGS-2 선택성 측면이 더 강한 것으로 확인되었다. 위와 같은 실험결과를 통하여 tacrine 구조 C환에 methoxy group이 치환되어 있을 때와 tacrine 구조 C, D환을 연결하고 methoxy group으로 치환된 구조모형에서 PGS-2 저해 효과가 좀 더 우수함을 알 수 있었다.

Lukiw 등의 연구에서는 치매 치료제의 개발연구에서 진통소염제 ibuprofen이 치매발병 위험을 50% 감소시켜 주는 것으로 조사되었으며, aspirin이나 acetaminophen은 이와 같은 치매 발병 감소 효과를 나타내지 못하는 것으로 밝혀지기도 하였다.²²⁾ PGS가 항염증작용 외에 뇌신경 손상을 일으키는 glutamate의 흡수를 간접적으로 감소시키기도 하므로 위장장애나 신장독성의 위험이 우려되지 않는 선택적 PGS-2 저해제는 알츠하이머질환의 발병시기를 지연시키는 등 예방과 치료에 이용될 가능성이 매우 높은 것으로 판단된다. 이와 같은 관점에서 볼 때, tacrine 구조 유도체 8과 9의 경우에는 PGS-1 저해작용보다는 PGS-2에 선택적인 저해활성이 더 현저하게 나타나므로 뇌 세포에 미치는 PGS-2 저해 효능을 구체적인 연구방법으로 증명하는 등의 추가적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R04-2003-000-10138-0) 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Korea National Statistical Office. Statistical Yearbook, 2002.
- 2) Anderson, K., Launer, L. J., Ott, A., Hoes, A. W., Breteler, M. M. and Hofman, A. : Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease the risk for Alzheimer's disease? *The Rotterdam Study. Neurology* **45**, 1441 (1995).
- 3) Combs, C. K., Johnson, D. E., Karlo, J. C., Cannady, S. B. and Landreth, G. E. : Inflammatory mechanism in Alzheimer's disease: inhibition of β -amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR gamma agonists. *J. Neurosci.* **20**, 558 (2000).
- 4) Grundman, M., Corey-Bloom, J. and Thal, L. J. : Perspectives in clinical Alzheimer's disease research and the development of antidementia drugs. *J. Neural. Transm. Suppl.* **53**, 255 (1998)
- 5) Oka, A. and Takashima, S. : Introduction of cyclooxygenase 2 in brains of patients with Down's syndrome and dementia of Alzheimer type: specific localization in affected neurones and axons. *Neuroreport* **8**, 1161 (1997).
- 6) Pasinetti, G. M. : Cyclooxygenase and inflammation in Alzheimer's disease: experimental approaches and clinical interventions. *J. Neurosci. Res.* **54**, 1 (1998).
- 7) Kish, S. J., Mastrogioacomo, F., Guttman, M., Furukawa, Y., Taanman, J. W., Dozic, S., Pandolfo, M., Lamarche, J., DiStefano, L. and Chang, L. J. : Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in

- hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change? *J. Neurochem.* **72**, 700 (1997).
- 8) Montine, T. J., Sidell, K. R., Crews, B. C., Markesbery, W. R., Marnett, L. J., Roberts, L. J. and Morrow, J. D. : Elevated CSF prostaglandin E₂ levels in patients with probable AD. *Neurology* **53**, 1495 (1999).
- 9) Kiminobu, S., Tolga, U., Vinod, K. and Hari, M. : New anti-inflammatory treatment strategy in Alzheimer's disease. *Jpn. J. Pharmacol.* **82**, 85 (2000).
- 10) Tocco, G., Freire-Moar, J., Schreiber, S. S., Sakhi, S. H., Aisen, P. S. and Pasinetti, G. M. : Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **144**, 339 (1997).
- 11) McGeer, P. L., Schulzer, M. and McGeer, E. G. : Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies. *Neurology* **47**, 425 (1996).
- 12) Dray, F., Mamasd, S. and Bizzini, B. : Problems of PGE antisera specificity. *Meth. Enzymol.* **86**, 258 (1982).
- 13) Chanmugam, P., Feng, L., Liou, S., Jang, B., Boudreau, M., Yu, G., Lee, J., Kwon, H., Beppu, T., Yoshida, M., Xia, Y., Wilson, C. B. and Hwang, D. : Radicolin, a protein tyrosine kinase inhibitor, suppresses the expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide and in experimental glomerulo-nephritis. *J. Biol. Chem.* **270**, 5418 (1995).
- 14) Lap, H., Cristiana, P., David, W., Dushyant, P. P., Paul, S. A. and Pasinetti, G. M. : Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **57**, 295 (1999).
- 15) Herschman, H. R. : Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**, 125 (1996).
- 16) McKenna, M. T., Proctor, G. R., Young, L. C. and Harvey, A. L. : Novel tacrine analogues for potential use against Alzheimer's disease: Potent and selective acetylcholinesterase inhibitors and 5-HT uptake inhibitors. *J. Med. Chem.* **40**, 3516 (1997).
- 17) Yasojima, K., Schwab, C., Mcgeer, E. G. and Mcgeer, P. L. : Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain. Res.* **830**, 226 (1999).
- 18) Yermakova, A. V., Rollins, J., Callahan, L. M., Rogers, J. and O'Banion, M. K. : Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 1135 (1999).
- 19) O'Banion, M. K., Chang, J. W., Kaplan, M. D., Yermakova, A. and Coleman, P. D. : Glial and neuronal expression of cyclooxygenase-2: relevance to Alzheimer disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* **433**, 177 (1997).

- 20) Rogers, J., Kirby, L. C., Hempelman, S. R., Berry, D. L., McGeer, P. L., Kaszinak, A. W., Zalinski, J., Cofeld, M., Mansukhani, L., Willson, P. and Korgan, F : Clinical trial of indometacin in Alzheimer's disease. *Neurology* **43**, 1609 (1993).
- 21) Aisen, J. S. and Davis, K. L. : Inflammatory mechanism in Alzheimer's disease: implications for therapy. *Am. J. Psychiat.* **151**, 1105 (1994).
- 22) Lukiw, W. J. and Bazan, N. G. : Cyclooxygenase 2 RNA message abundance, stability and hypervariability in sporadic Alzheimer neocortex. *J. Neurosci. Res.* **50**, 937 (1997).