

原著

中枢移行性アンジオテンシン変換酵素阻害剤投与による ラット脳内ペプチド性物質のプロファイリング

金澤 佐知子¹⁾ 細井 一広¹⁾ 照井 一史¹⁾ 下山 律子¹⁾
中川 潤一¹⁾ 板垣 史郎¹⁾ 早狩 誠^{1,2)}

抄録 本研究は、中枢移行性 ACE 阻害剤 (ACEI) による記憶保持亢進の機序を解明することである。中枢移行性 ACEI (captopril)、非中枢移行性 ACEI (imidapril) および ARB (losartan) 投与ラットでの脳内ペプチドの発現変化を HPLC 法および TOF-MS 法を用いて検索した。その結果、TOF-MS 法では、captopril 投与群で特異的に発現が亢進するペプチドを多数検出できたが、その多くは質量数 3,000 以下であった。なお、これらの質量数はすべて一価イオンとして検出されたことから、すべて物質固有の質量数を反映していた。検出した質量数は、ACE が分解する脳内ペプチド (LH-RH, substance P, β -neoendorphin, neuromedin B, LVV-hemorphin-7, amyloid β -protein) や insulin-regulated aminopeptidase (IRAP) の基質と考えられている vasopressin とは異なる値を示した。脳内には ACE や IRAP 以外にも活性中心に Zn^{2+} を有するメタロプロテアーゼが存在することから、今回得られた多くの質量数は、キレート形成能を有する captopril により阻害されたメタロプロテアーゼの内在性基質の可能性がある。

弘前医学 65 : 95—103, 2014

キーワード : 中枢移行性 ACE 阻害剤 ; 記憶保持能 ; 脳内ペプチド ; TOF-MS.

ORIGINAL ARTICLE

PROFILING OF RAT BRAIN PEPTIDES TREATED WITH CENTRALLY ACTIVE ACE INHIBITOR

Sachiko Kanazawa¹⁾, Kazuhiro Hosoi¹⁾, Kazufumi Terui¹⁾, Ritsuko Shimoyama¹⁾,
Junichi Nakagawa¹⁾, Shirou Itagaki¹⁾, and Makoto Hayakari^{1,2)}

Abstract This study is to be clarified the mechanism(s) of memory improvement by centrally active ACE inhibitor, captopril. We measured the expressed peptides in the rat brain treated with centrally active ACEI (captopril), non-centrally active ACEI (imidapril) and ARB (losartan) by HPLC and TOF-MS. As the result, we detected a large number of substances, which highly expressed in rat brain treated with captopril, by the TOF-MS technique. Molecular mass (m/z) of most of the all substances was less than 3,000. Since all mass number was confirmed as monovalent ions, these values reflected in the mass number derived from the unique substance and were completely different from mass numbers of endogenous substrates, such as LH-RH, substance P, β -neoendorphin, neuromedin B, LVV-hemorphin-7, and amyloid β -protein, which are cleaved by ACE, and vasopressin, which is thought as a substrate for IRAP in brain. However, many Zn^{2+} -containing metalloproteases are present in rat brain. There might be those metalloproteases were inhibited by captopril that could form a chelate to the Zn^{2+} in the active center of enzyme. The many mass numbers obtained in this study can be also endogenous substrates for these metalloproteases.

Hirosaki Med. J. 65 : 95—103, 2014

Key words: centrally active ACE inhibitor; memory retention; brain peptide; TOF-MS analysis.

¹⁾ 弘前大学医学部附属病院 薬剤部
²⁾ 弘前大学大学院医学研究科 薬剤学講座
別刷請求先 : 早狩 誠
平成25年12月2日受付
平成25年12月25日受理

¹⁾ Department of Pharmacy, Hirosaki University
School of Medicine & Hospital
²⁾ Department of Pharmaceutical Science, Hirosaki
University Graduate School of Medicine
Correspondence: M. Hayakari
Received for publication, December 2, 2013
Accepted for publication, December 25, 2013

緒 言

アンジオテンシン変換酵素(ACE; EC 3.4.15.1)はレニン-アンジオテンシン系(RAS)において血圧調節機構に関わる重要な酵素である¹⁾。本酵素の阻害剤(ACEI)は血圧降下作用を有することから、広く血圧降下剤として使用されていた。しかしながら、ACEIは味覚障害や空咳などの副作用が発現することから、現在ではアンジオテンシンⅡ(Ang Ⅱ)受容体拮抗剤(ARB)が広く臨床応用されている。

一方、2007年に開催された米国老年医学会にてSinkらは中枢移行性ACE阻害剤(captopril, fosinopril, lisinopril, perindopril, ramipril,trandolapril)は血液脳関門を通過しないACEIに比べ、認知機能低下を50%ほど遅くすると報告した²⁾。しかしながらその機序は現在まで明らかにされていない。

従来より記憶保持機構には脳内の海馬に強く発現しているアンジオテンシンⅣ(Ang Ⅳ)受容体(AT4)^{3,4)}が記憶保持機構に深く関わっていることが報告されている⁵⁻⁸⁾。ヘモグロビンβ鎖より産生され、かつオピオイド活性を有するLVV-hemorphin-7(Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Tyr;MW=1,324)がこのAT4の内在性リガンドであり^{9,10)}、ラット脳スライスでLVV-hemorphin-7や内在性リガンドであるAng Ⅳがアセチルコリン作動性神経を活性化することが報告されている¹¹⁾。さらにLVV-hemorphin-7やAng Ⅳの脳室内への投与は記憶保持を改善することも報告されている^{12,13)}。

一方Albistonらは、AT4が活性中心にZn²⁺を有するinsulin-regulated aminopeptidase(IRAP)であることを明らかにした^{14,15)}。なお、IRAPはLVV-hemorphin-7やAng Ⅳにより活性が抑制される¹⁵⁾。またHayakariらは精製したラット脳ACEによる合成LVV-hemorphin-7の分解機構を解析し、LVV-hemorphin-7がラット脳内ACEの内在性基質である可能性を示している¹⁷⁾。さらにAng Ⅳは、ラット脳内では微量であるとされている⁹⁾。これらの結果は、ACEまたはペプチダーゼ活性を有するIRAPは、脳内において何らかのペプチドを代謝調節し記憶保持機構に関与し

ていることが示唆される。

本研究では記憶保持機構に関与するペプチド性物質の検索を目的とし、中枢移行性ACE阻害剤captopril、非中枢移行性ACE阻害剤imidapril、ARBのlosartanを投与したラット脳におけるペプチド等の発現変化を解析した。

方 法

1. 実験材料

CaptoprilはSIGMA-Aldrich社(St. Louis, MO)より、losartan potassiumはLKT Laboratories社(St.Paul MN)よりそれぞれ購入した。Imidaprilは田辺三菱製薬株式会社より提供を受けた。各種Protein Chip Arrayおよび質量校正用マーカー(分子量:1,084.25~6,963.52および7,034~147,300)はBio-Rad社(Hercules, PH)より購入した。脳内物質抽出用ワコーゲル100C18は和光純薬株式会社より購入した。

脳内ペプチドの測定にはSELDI Protein Chip System PCS4000 (Bio-Rad社製, Hercules, PH)を用いた。HPLC用試薬およびその他の試薬は全て特級を用いた。

2. 実験動物

Sprague-Dawley (SD)ラット(雄, 体重250 g)は日本クレア株式会社より購入した。飼料はオリエンタル酵母株式会社Certified Diet MFを用いた。飼料は自由摂食させた。

3. RAS抑制剤による記憶保持機能亢進効果

プラットホームの位置を学習したSDラットを、コントロール群、RAS抑制剤(captopril: 5, 10, および20 mg/kg, imidapril: 1 および4 mg/kg, losartan: 21および42 mg/kg)投与群(各群n=5)に分け、モーリス水迷路を用い、既報¹⁸⁾に準拠して記憶保持能改善効果を解析した。各種RAS抑制剤は毎日腹腔内投与し、コントロール群には各薬剤の溶解液である生理食塩水を投与した。

なお、動物実験については弘前大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施した。

4. 脳内ペプチド等の抽出法

ラット脳内ペプチド等は常法により抽出を行った。すなわち各ラット脳(半分)をスライスし9倍量の1%トリフルオロ酢酸(TFA)溶液を加え、水冷中ホモゲナイズ後沸騰水浴中10分間加熱処理した。その後氷冷し、10,000 xgにて30分間冷却遠心した。次に、遠心上清をあらかじめ0.1% TFA 溶液にて平衡化したC18 カラム(2.0 x 5 cm)に付した。0.1% TFA 溶液にて十分洗浄後、0.1% TFA を含む80%アセトニトリルでペプチド分画を溶出した。

溶出液を遠心濃縮乾固後、再度0.1% TFA溶液(ml/組織重量)に溶解し、Amicon Ultra(Millipore社製, cut off 値:10k, Billerica, MA)にて冷却遠心し、ろ液を遠心濃縮した。次にエタノールを加え再度濃縮操作を行った。この操作を繰り返し試料からTFAを除去した後、試料重量と同量の蒸留水に再溶解しHPLCおよび質量分析用試料とした。

5. HPLC 法によるラット脳内ペプチド等のプロファイリング

HPLC 分析はElite LaChrom HPLC システム(日立)を用い以下の条件で行った。カラム; TSK-80 (4.6 x 250 mm, TOSOH), 溶離液; A液: 0.1% TFA 溶液 B液: 80%/アセトニトリル0.1% TFA の2種, グラジエント条件; 0-3分A:B=90:10, 3-60分A:B=40:60, 流速; 1.0 ml/min, 試料注入量; 50 μ l, カラム温度; 35°Cとした。ピークの検出にはDiode Array Detector(HITACHI L-2455)を用い、測定波長は230 nmとした。

6. SELDI Protein Chip System による脳内ペプチド等のプロファイリング

ラット脳内より抽出した試料溶液50 μ lに50 mM 酢酸バッファー(pH4.5)または50 mM トリスバッファー(pH 8.5)150 μ lを加え十分攪拌した。そのうちの150 μ lを強陰イオン交換樹脂(Q10)および弱陽イオン交換樹脂(CM10)装着Protein Chip Arrayに付し、ペプチド等をイオン交換樹脂と十分反応させた後、各バッファーおよび蒸留水にて洗浄し未吸着物質および塩類を除去した。その後エネルギー吸収体(CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)をチャージし十分乾燥さ

せ SELDI Protein Chip System(型式:PCS4000)にて測定した。

7. 数値処理

統計的評価を要する実験結果は平均値 \pm 標準偏差で表した。多群間の比較には、一元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合、Dunnettの多重比較検定を行った。統計学的解析は、IBM SPSS21 Statistics Base(日本アイ・ビー・エム株式会社)を用いた。

結 果

1 記憶保持改善効果の解析

記憶保持能はモーリス水迷路法にて遊泳時間の減少から評価・解析を行った。その結果、RAS抑制剤を投与しないコントロール群は、標的を取り除いた翌日では記憶していたプラットホームへの到達が遅れたが、2日目以降測定日数の経過とともにプラットホームへの到達時間は減少し、且つ測定期間での標準誤差値も減少し、前日の記憶は保持されていた(図1)。

一方、RAS抑制剤投与群において、非中枢移行性ACE阻害剤imidapril(4 mg/kg)群およびlosartan(42 mg/kg)群では、コントロールとほぼ同様の経過をたどり記憶保持改善効果は認められなかった。しかしながら、中枢移行性ACE阻害剤captopril(5, 10, 20 mg/kg)投与群では、コントロール群、imidapril群およびlosartan群に比べ、濃度依存的に二日目以降より標的への到達時間は減少し、測定期日4日目および5日目ではコントロール群に対し有意($p < 0.05$ および $p < 0.01$)に改善した(図1)。

2 RAS 抑制剤投与ラット脳抽出物の HPLC によるプロファイリング

RAS抑制剤投与ラット脳抽出物をHPLC法にて解析した。その結果captopril投与群において濃度依存的に発現が増加するピークは、保持時間約26分のみ検出され(図2)、他に著名な増加傾向を示すピークを明らかにすることはできなかった。

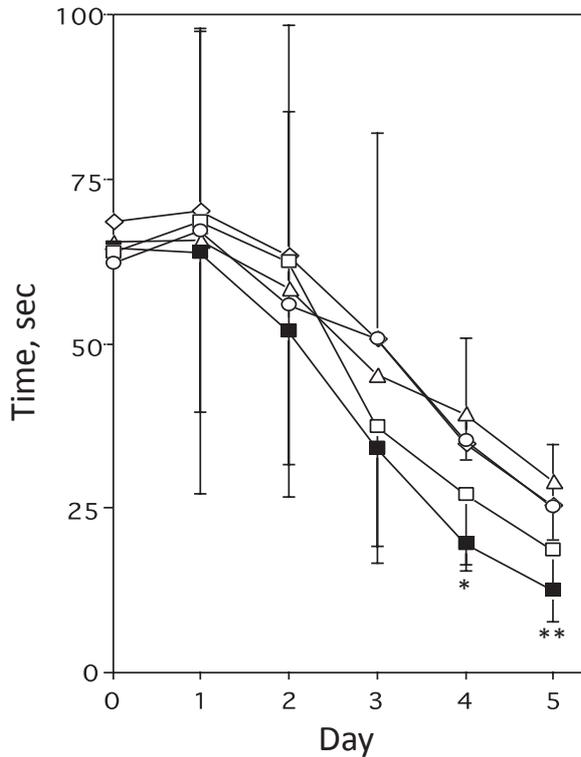


図1 モーリス水迷路法により評価したラット遊泳時間に対するRAS抑制剤の影響。

Control: ○, captopril; 10 mg/kg: □, 20 mg/kg: ■, imidapril; 4 mg/kg: ◇, losartan; 42 mg/kg: △. N = 5, *, p < 0.05 vs control, **, p < 0.01 vs control.

3 RAS抑制剤投与ラット脳内抽出物の SELDI Protein Chip System によるプロファイリング

ラット脳より抽出した試料について、各種イオン交換樹脂が装着されている Protein Chip Array を用い、酸性(pH 4.5)および塩基性(pH 8.5)条件下で解析を行った。なお、本検討では、目的とするペプチド性物質は ACE または IRAP により分解を受けることを想定し、これらの酵素化学的性状から分子量を約10,000以下、且つ captopril 投与群でのみ特異的に発現増加している物質を対象とした。なお、発現増加の判定には、質量数をゲル化した手法(Gel View 法)を用いて判定した。

強陰イオン交換樹脂が装着されている Protein Chip Array(Q10)でのプロファイリングでは、Arrayとの反応条件 pH 4.5で、質量数1,000~3,000において多数の特異的なシグナルが観測できた(表1, 図3A)。一方、pH 8.5の条件下では質量数3,000以上のシグナルが観測された(表

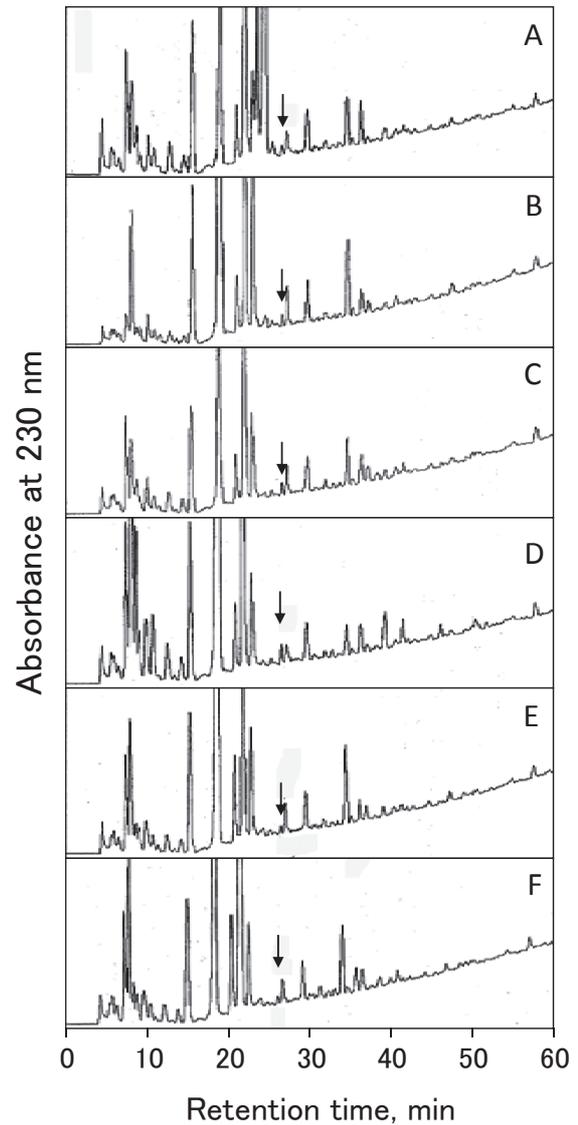


図2 HPLCによるRAS抑制剤投与ラット脳抽出物のプロファイリング。

投与量: コントロール: A, captopril 5 mg/kg: B, captopril 10 mg/kg: C, captopril 20 mg/kg: D, imidapril 4 mg/kg: E, losartan 42 mg/kg: F

1, 図4B)。次に弱陽イオン交換樹脂が装着されている Protein Chip Array(CM10)でのプロファイリングでは、抽出条件 pH 4.5では特異的なシグナルは全く出現しなかった(表1)。一方、pH 8.5では質量数3,000以下で多数のシグナルが観測されたが、質量数3,000以上では特異的なシグナルは観測されなかった(表1, 図5A)。本検討で観測できた質量数について、ACE分解するペプチドとの質量数と比較した結果、angiotensin I (MW=1,296.5), bradykinin

表 1 Captopril 投与ラット脳で特異的に検出した質量数

検出範囲	質量数 (m/z = MW + 1)			
	Array : Q10		Array : CM10	
	pH 4.5	pH 8.5	pH 4.5	pH 8.5
1000 < 2000	1284.9, 1512.3, 1599.1, 1615.8, 1848.8, 1881.6, 1928.1, 1976.3	N.D.	N.D.	1294.8, 1439.5, 1700.6, 1883.3
2000 < 3000	2086.0, 2253.7, 2357.5, 2453.8, 2511.0, 2538.3, 2553.8, 2575.8, 2650.0, 2690.2, 2925.4, 2940.2	N.D.	N.D.	2049.9, 2067.5, 2150.3, 2276.5, 2541.9
3000 < 4000	3,071.00	3,494.00	N.D.	N.D.
4000 < 5000	N.D.	4505.3, 4668.1	N.D.	N.D.
5000 <	5,270.40	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. : 未検出

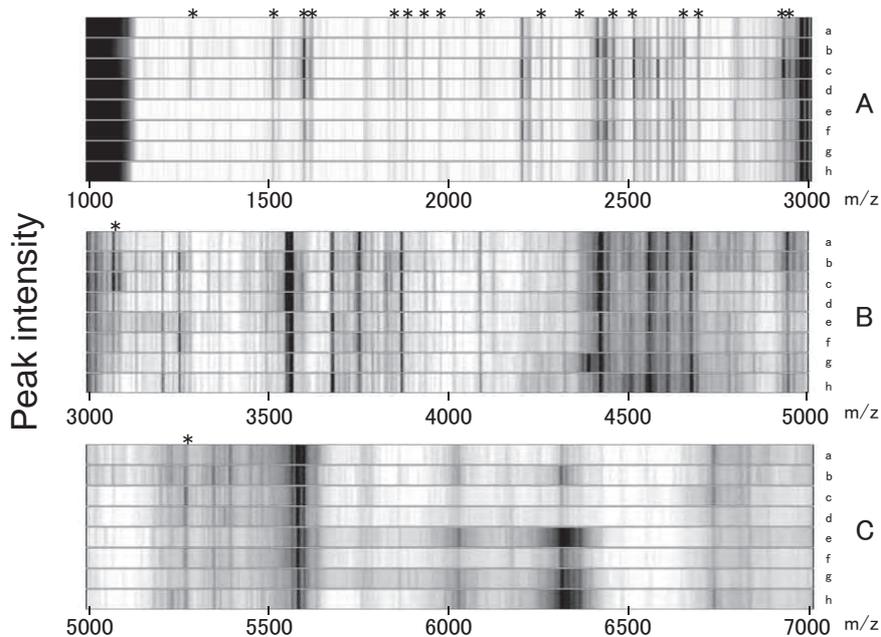


図 3 TOF-MS による RAS 抑制剤投与ラット脳抽出物のプロファイリング : Gel View
 使用 Array : 強陰イオン交換樹脂(Q10), 抽出条件 : pH 4.5, 測定モード : positive, m/z ; 1,000 ~ 3,000 : A, 3,000~5,000 : B, 5,000~7,000 : C, RAS 抑制剤投与量 ; コントロール : a, captopril 5 mg/kg : b, captopril 10 mg/kg : c, captopril 20 mg/kg : d, imidapril 1 mg/kg : e, imidapril 4 mg/kg : f, losartan 21 mg/kg : g, losartan 42 mg/kg : h, *: 検出された質量(質量数は表 1 参照).

(MW=1,060.2), LH-RH(MW=1,182.3), substance P(MW=1,347.6), β -neoendorphin(MW=1,100.3), neuromedin B(MW=1,132.3), neuromedin C (MW=1,120.3), LVV-hemorphin-7(MW=1,324) と該当しなかった. また IRAP の内在性基質として知られている vasopressin(MW : 1,084.3)と該当する質量数も観測できなかった.

考 察

近年中枢移行性アンジオテンシン変換酵素阻害剤を服用している患者では, 記憶の消失が抑制されることが Sinkらにより報告された²⁾. しかしながら, その機序について未だ十分な解明がなさ

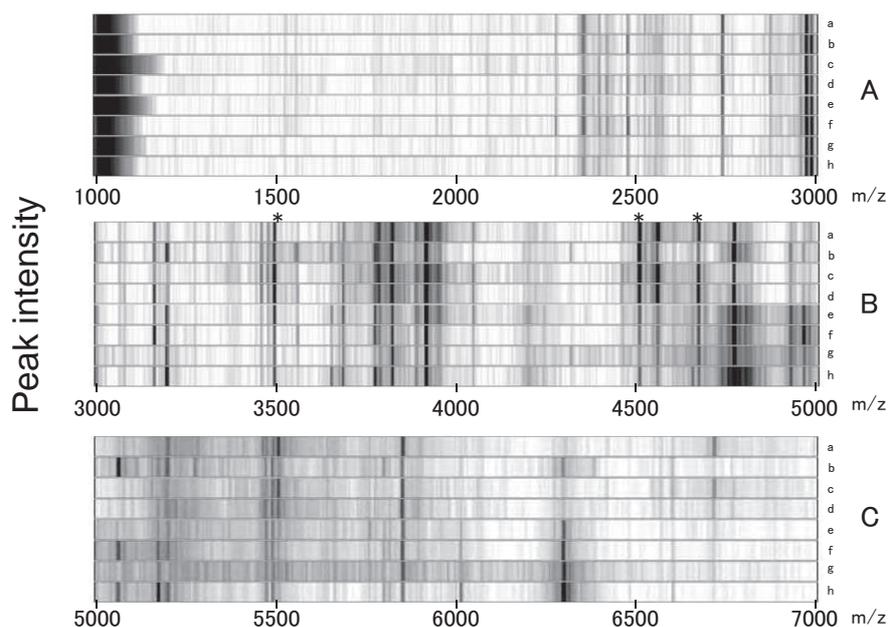


図4 TOF-MSによるRAS抑制剤投与ラット脳抽出物のプロファイリング: Gel View
 使用 Array: 強陰イオン交換樹脂(Q10), 抽出条件: pH 8.5, 測定モード: positive, m/z; 1,000~3,000: A, 3,000~5,000: B, 5,000~7,000: C, RAS抑制剤投与量; コントロール: a, captopril 5 mg/kg: b, captopril 10 mg/kg: c, captopril 20 mg/kg: d, imidapril 1 mg/kg: e, imidapril 4 mg/kg: f, losartan 21 mg/kg: g, losartan 42 mg/kg: h, *: 検出された質量(質量数は表1参照).

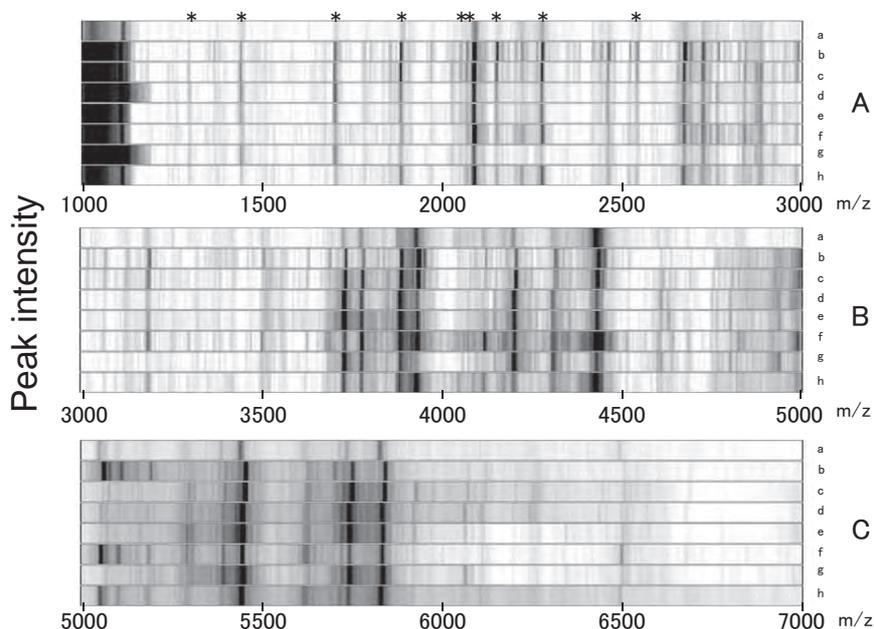


図5 TOF-MSによるRAS抑制剤投与ラット脳抽出物のプロファイリング: Gel View
 使用 Array: 弱陽イオン交換樹脂(CM10), 抽出条件: pH 8.5, 測定モード: positive, m/z; 1,000~3,000: A, 3,000~5,000: B, 5,000~7,000: C, RAS抑制剤投与量; コントロール: a, captopril 5 mg/kg: b, captopril 10 mg/kg: c, captopril 20 mg/kg: d, imidapril 1 mg/kg: e, imidapril 4 mg/kg: f, losartan 21 mg/kg: g, losartan 42 mg/kg: h, *: 検出された質量(質量数は表1参照).

れていない。

本研究では海馬での記憶保持の解析に優れているとされるモリス水迷路法にて各種 RAS 抑制剤投与ラットでの記憶保持能の亢進効果を解析した。その結果、中枢移行性 ACEI である captopril は、濃度依存的に記憶保持能を亢進した。一方非中枢移行性かつ強力な ACEI である imidapril、および ARB である losartan はいずれも記憶保持能の亢進を示さず、これらの結果は Sink らの報告²⁾を裏付ける結果となった(図 1)。

次に captopril による記憶保持能亢進機序の解明を目的とし、ラット脳内で captopril 投与時に発現が亢進するペプチド性物質の検索をペプチドの分析に適している HPLC 法ならびに高感度で高分子量まで分析可能な飛行型質量分析計(TOF-MS: SELDI Protein Chip System PSC4000)を用いて各試料のプロファイリングを行った。その結果、HPLC 法による分析では captopril の濃度に依存して増加するピークが保持時間約 26 分に検出されたが(図 2, B-D)、その他に明らかに発現変化を認めるピークは検出されなかった。

次に強陰イオン交換樹脂を装着した Protein Chip Array では、反応条件 pH 4.5 で質量数 1,000~5,500 以内に発現が亢進しているシグナルを多数確認できたが、pH 8.5 では質量数 3,000~5,000 以内に 3 個のみであった(表 1 および図 3, 4)。一方、弱陽イオン交換樹脂を装着した Array では、抽出 pH 4.5 では全くシグナルを確認することはできなかったが、pH 8.5 で質量数 1,000~3,000 以内にシグナルを多数確認できた(表 1 および図 5)。また、検出したシグナルはすべて質量数が異なることから、それぞれ固有の物質であると考えられる。さらに、質量分析で示される質量数は多価イオンとして示される場合があり、そのようなケースではシグナルが一価イオンであるか二価イオンであるかの判定が必要とされる。今回検出された各質量数についてイオン価数を解析した結果、すべての質量数は一価であり、検出したシグナルは個々の物質の質量数を反映していることが明らかとなった。

ACE は carboxydipeptidase として Ang I の C 末端 His-Leu を切り離し、生理活性のある Ang II を産生する。また ACE は基質特異性が低く、amyloid

β -protein を含む数多くの生理活性ペプチドを分解する^{1, 17, 19-23)}。今回検出された質量数は ACE の内在性基質と考えられるペプチドの質量数とは一致しなかった。なお、ACE による amyloid β -protein の分解には賛否両論があり今後の研究により明らかとなるものと思われる²⁴⁾。

一方 IRAP は、oxytocinase/placental leucine aminopeptidase と呼ばれ、oxytocin や vasopressin を分解する酵素として知られていた²⁴⁾。IRAP はペプチドの N 末端よりアミノ酸を切り離すが、その活性中心に Zn^{2+} を有しているメタロプロテアーゼである¹⁴⁾。さらに活性中心に Zn^{2+} を有するメタロプロテアーゼとしては matrix metalloproteases (MMP) のうち、MMP-2, 3, 9 は脳内でもっとも豊富に発現していること²⁵⁾や ACE と類似の基質特異性を示す中性エンドペプチダーゼが脳内では 6 種類も存在していることが報告されている²⁶⁾。従って酵素の活性中心に存在する Zn^{2+} とキレートを形成する captopril はこれらの酵素の活性を抑制することが推定される。今回の検討で得られた多数の物質が ACE および IRAP によって代謝調節されている可能性については、今後の構造解析の結果に期待したい。なお、今回の検討では、脳内 ACE および IRAP のそれぞれの内在性基質として考えられている LVV-hemorphin-7 および vasopressin の発現変化を確認することはできなかった。しかしながら Hayakari らはラット LVV-hemorphin-7 に対する自作抗体を用いた ELISA 法にて、captopril 投与ラット全脳での LVV-hemorphin-7 濃度を測定した結果では、対照群に比較し有為な上昇を認めている¹⁸⁾。今回用いた分析法では Array に供した組織重量は数 mg 相当であり、検出限界以下であった可能性も考えられ、中枢移行性 ACEI による記憶保持能の亢進効果に LVV-hemorphin-7 が重要な役割を演じている可能性は否定できない。

2007 年米国老年医学会にて中枢移行性 ACE 阻害剤による記憶力低下の予防効果が報告²⁾されて以来、中枢移行性 ACEI の認知症改善効果が注目され数多くの臨床成績が報告されている。認知症の一種のアルツハイマー病と診断された患者における認知能力の追跡調査を行った結果、中枢移行性 ACEI を以前から服用していた患者は、服用していない患者に比べ、認知症の進行速度がわず

かながら減速する傾向を示していた。さらに患者に新たに中枢移行性 ACEI を投薬治療した結果、服用患者らの認知能力が向上している²⁷⁾。

今回検討した内容は、中枢移行性 ACEI による記憶保持能改善効果の機序を解明する上で重要と考えられ、今後これらの物質の構造解析に期待したい。

謝 辞

本研究は科学研究費助成事業(奨励研究: 研究番号25928009)によって行われた。また、一部平成24年度唐牛記念医学研究基金助成(助成金B: 板垣史郎)の支援を受けて行われた。本研究の遂行にあたり imidapril の原末を提供いただいた田辺三菱製薬株式会社に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Erdos EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension* 1990;16:363-70.
- 2) Sink KM, Leng X, Williamson J, Kritchevsky SB, Yaffe K, Kuller L, Yasar S, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cognitive decline in older adults with hypertension: results from the Cardiovascular Health Study. *Arch Intern Med* 2009;169:1195-202.
- 3) Lee J, Chai SY, Morris MJ, Mendelsohn FA, Allen AM. Effect of fimbria-fornix lesion on 125I-angiotensin IV (Ang IV) binding in the guinea pig hippocampus. *Brain Res* 2003;979:7-14.
- 4) Moeller I, Paxinos G, Mendelsohn FA, Aldred GP, Casley D, Chai SY. Distribution of AT4 receptors in the Macaca fascicularis brain. *Brain Res* 1996;712:307-24.
- 5) Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2, and AT4 and their functions. *Regul Pept* 1995;59:269-95.
- 6) Wright JW, Stublely L, Pederson ES, Kramár EA, Hanesworth JM, Harding JW. Contributions of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype system to spatial learning. *J Neurosci* 1999;19:3952-61.
- 7) Nyberg F, Sanderson K, Glamsta EL. The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers* 1997;43:147-56.
- 8) Pederson ES, Krishnan R, Harding JW, Wright JW. A role for the angiotensin AT4 receptor subtype in overcoming scopolamine-induced spatial memory deficits. *Regul Pept* 2001;102:147-56.
- 9) Moeller I, Lew RA, Mendelsohn FA, Smith AI, Brennan ME, Tetaz TJ, Chai SY. The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT4 receptor in the brain. *J Neurochem* 1997;68:2530-7.
- 10) Moeller I, Chai SY, Smith I, Lew R, Mendelsohn FA. Haemorphin peptides may be endogenous ligands for brain angiotensin AT4 receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998;25:S68-71.
- 11) Lee J, Chai SY, Mendelsohn FA, Morris MJ, Allen AM. Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology* 2001;40:618-23.
- 12) Albiston AL, Pederson ES, Burns P, Purcell B, Wright JW, Harding JW, Mendelsohn FA, et al. Attenuation of scopolamine-induced learning deficits by LVV-hemorphin-7 in rats in the passive avoidance and water maze paradigms. *Behav Brain Res* 2004;154:239-43.
- 13) Lee J, Albiston AL, Allen AM, Mendelsohn FA, Ping SE, Barrett GL, Murphy M, Morris MJ, McDowall SG, Chai SY. Effect of I.C.V. injection of AT4 receptor ligands, NLE1-angiotensin IV and LVV-hemorphin 7, on spatial learning in rats. *Neuroscience* 2004;124:341-9.
- 14) Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T, Lee J, et al. Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem* 2001;276:48623-6.
- 15) Lew RA, Mustafa T, Ye S, McDowall SG, Chai SY, Albiston AL. Angiotensin AT4 ligands are potent, competitive inhibitors of insulin regulated aminopeptidase (IRAP). *J Neurochem* 2003;86:344-50.

- 16) Lee J, Mustafa T, McDowall SG, Mendelsohn FA, Brennan M, Lew RA, Albiston AL, Chai SY. Structure-activity study of LVV-hemorphin-7; angiotensin AT4 receptor ligand and inhibitor of insulin-regulated aminopeptidase. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:205-11.
- 17) Hayakari M, Satoh K, Izumi H, Kudoh T, Asano J, Yamazaki T, Tsuchida S. Kinetic-controlled hydrolysis of Leu-Val-Val-hemorphin-7 catalyzed by angiotensin-converting enzyme from rat brain. *Peptides* 2003;24:1075-82.
- 18) 内山道子, 板垣史郎, 金澤佐知子, 細井一広, 照井一史, 下山律子, 早狩 誠. アンジオテンシン変換酵素に焦点を当てた認知症患者への食事内容に関する基礎研究. *弘前医学* 2013;64:41-9.
- 19) Skidgel RA, Erdös EG. Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the lutenizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:1025-9.
- 20) Hayakari M, Satoh K, Ookawa K, Kano H, Murakami S, Ikeda N, Tsuchida S. Kinetic evaluation of beta-neoendorphin hydrolysis by the somatic and testicular isozymes of human angiotensin-converting enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1997;1339:31-8.
- 21) Hemming ML, Selkoe DJ. Amyloid beta-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor. *J Biol Chem* 2005;280:37644-50.
- 22) Oba R, Igarashi A, Kamata M, Nagata K, Takano S, Nakagawa H. The N-terminal active centre of human angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide. *Eur J Neurosci* 2005;21:733-40.
- 23) Eckman EA, Adams SK, Troendle FJ, Stodola BA, Kahn MA, Fauq AH, Xiao HD, et al. Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 2006;281:30471-8.
- 24) Wallis MG, Lankford MF, Keller SR. Vasopressin is a physiological substrate for the insulin-regulated aminopeptidase IRAP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1092-102.
- 25) Rivera S, Khrestchatisky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci* 2010;30:15337-57.
- 26) Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K, Kiryu-Seo S, et al. Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem* 2001;276:21895-901.
- 27) Gao Y, O'Caomh R, Healy L, Kerins DM, Eustace J, Guyatt G, Sammon D, Molloy DW. Effects of centrally acting ACE inhibitors on the rate of cognitive decline in dementia. *BMJ Open* 2013;3:e002881.