

199800366A

---

平成 10 年度  
厚生省厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

---

アルツハイマー病発症の分子機構に関する研究

研究報告書

主任研究者 柳澤 勝彦

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

アルツハイマー病発症の分子機構に関する研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部部長

研究要旨

アルツハイマー病脳におけるアミロイドβ蛋白の蓄積分子機構の解明をとうして、原因論的に多様なアルツハイマー病の発症メカニズムを理解し、本疾患の予防法・治療法開発に有用な情報を提供することを目的とする。本年度は初年度において確立したアルツハイマー病・病態細胞モデルを活用し、Aβ産生異常の分子機構解析、神経細胞内コレステロール代謝の特性解析、さらには神経系におけるリポ蛋白の分離および特性解析を進めた。

分担研究者

駒野宏人	長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長
道川 誠	同上
横山信治	名古屋市立大学医学部 生化学第一講座 教授

発症における中核的病理所見はアミロイドβ蛋白（Aβ）の脳内異常蓄積であるとの認識の上に、Aβ蓄積開始の分子機構を明らかにすることで、アルツハイマー病発症の分子機構を理解することを第一の目的とする。また、本研究により得られた成果を、アルツハイマー病に真に有効な予防法・治療法の開発に資することを第二の目的とする。

A. 研究目的

人口の高齢化が急速に進むなかで、痴呆性老人の増加は医学的関心を超えた大きな社会問題となっている。とりわけ我が国の主要な痴呆性疾患のなかでアルツハイマー病の原因、病態生理には依然不明の点が多く、真に有効な予防法、治療法ははまだ開発されていない。しかし、近年の分子生物学の発展により、本疾患に対する我々の理解は急速に深まり、アルツハイマー病は多様な原因論的背景の上に成立する疾患であることが明らかになっている。本研究は、アルツハイマー病

B. 研究方法

(1) アミロイドβ蛋白（Aβ）沈着開始機構の検討

先に主任研究者らがアルツハイマー病初期脳に選択的に検出した GM1 ガングリオシド結合型 Aβの形成機構を、Aβの細胞内輸送変異ないしは細胞内異常産生の視点から研究を進めている。Aβの細胞内輸送変異の問題に関しては、ヒト・アミロイド前駆体蛋白（APP）遺伝子を導入した

MDCK 細胞を用いて、頂端部および側底部に極性分泌される A $\beta$ の分子特性を解析した。また APP 遺伝子としては全長の野生型 APP および細胞質ドメインを欠落させた APP 遺伝子を用い、APP の細胞内輸送変異のもたらす A $\beta$ 極性分泌への影響を検討した。分泌される A $\beta$ 分子の特性解析にあたっては、抗 A $\beta$ モノクローナル抗体を用いた免疫沈降/Western blot 法を用いた。また、頂端部に極性分泌される特異な A $\beta$ 分子の seeding 活性の評価にあたっては、チオフラビン反応および電子顕微鏡を用いた形態学的観察を行った。

#### (2) 家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリンのアルツハイマー病発症における役割の検討

野生型および変異型プレセニリン遺伝子を導入したマウス神経芽細胞腫 Neuro2a を用いて、プレセニリン遺伝子異常の A $\beta$ 産生に及ぼす効果を解析した。A $\beta$ の検出にあたっては(1)で用いたモノクローナル抗体により免疫沈降/Western blot を行い、2種ある A $\beta$ を分子種別に検出し、デンストメトリーにより定量を行った。また、細胞内における A $\beta$ の産生部位の決定にあたっては、細胞内蛋白輸送の阻害剤である brefeldin A および monensin を用い、その細胞外および細胞内において検出される A $\beta$ の濃度に与える影響から、A $\beta$ 産生部位を検討した。

#### (3) 神経細胞のコレステロール代謝特異性の検討

アルツハイマー病発症における ApoE の役割をコレステロール代謝の視点から理解することを目的に、神経細胞のコレステロール代謝を繊維芽細胞やアストログリア細胞等の非神経細胞との比較において検討した。検討にあたってはコレス

テロール合成系の上流および下流に作用する阻害剤(それぞれコンパクチン、スクアレスタチン)を用い、コレステロールおよび中間代謝産物の産生を阻害し、その細胞生存に及ぼす影響を調べた。

#### (4) 神経細胞のコレステロール代謝に及ぼす ApoE アイソフォーム特異的な作用の検討

コレステロール代謝に関わる ApoE の役割のうち、細胞表面からのコレステロール引き抜き(cholesterol efflux)に着目し、<sup>14</sup>C ラベルの新生コレステロールの細胞外への排出を、ヒト・リコンビナント ApoE をアイソフォーム別に投与し定量的に解析した。

#### (5) 神経系におけるリポ蛋白の同定ならびに特性解析

神経系における ApoE の生理的役割を理解することを目的に、神経系において産生される ApoE 含有リポ蛋白の特性解析を試みた。ラット・アストログリア細胞培養系において培養上清中に排出されるリポ蛋白を分離精製し、その脂質化学的な特性解析を進めた。

### C. 研究結果

#### (1) アミロイド $\beta$ 蛋白(A $\beta$ )沈着開始機構の検討(柳澤)

細胞内において頂端部方向に変異輸送された APP 分子より特異な電気泳動特性を示す A $\beta$ が、A $\beta$ の中間部を認識する抗体によって検出された。本 A $\beta$ 分子は A $\beta$ の N 末側を認識する抗体では検出されなかったが、ギ酸処理後においては、その N 末側認識抗体との反応性が回復することから、何等かの構造変化を獲得している可能性が推察された。また、興味深いことに、本 A $\beta$ 分子の産生は細胞内コレステロールに絶対的に依存して

いることが確認された。さらに重要なことに、本 A $\beta$ 分子は可溶性の A $\beta$ の凝集ならびにアミロイド線維化を促進する作用を有することが確認され、そのアミロイド線維形成促進作用も細胞内コレステロールに絶対的に依存することが確認された。

(2) 家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリンのアルツハイマー病発症における役割の検討 (駒野)

家族性アルツハイマー病において見いだされた 2つのプレセニリン遺伝子変異の発現をマウス神経芽細胞腫 Neuro2a に誘導することにより、2種ある A $\beta$ 分子種のうち自己凝集性に富む A $\beta$ 42の細胞外への排出が増すとともに、細胞内においても同 A $\beta$ 分子が蓄積することを見出した。細胞内において A $\beta$ を検出し得た利点を活用し、細胞内における A $\beta$ 産生について、細胞内の蛋白輸送阻害剤である brefeldin A および monensin を用いて検討した。その結果、ゴルジ装置 (early Golgi compartment) で A $\beta$ の C 末端切断が生じていることを示す実験事実を得た。

(3) 神経細胞のコレステロール代謝特異性の検討 (道川)

神経細胞におけるコレステロール代謝の特性を繊維芽細胞やアストログリア細胞などの非神経細胞との比較において検討した。その結果、従来の報告に一致して、非神経細胞の生存にはコレステロール合成系の中間代謝産物であるイソプレノイドが必須であるのに対して、神経細胞の生存は最終産物であるコレステロールに絶対的に依存することが明らかとなった。

(4) 神経細胞のコレステロール代謝に及ぼす ApoE アイソフォーム特異的な作用の検討 (道川)

神経細胞ならびにアストログリア細胞の細胞表面からの ApoE 依存性のコレステロール引き抜き効果にはアイソフォーム特異性があることを示唆する実験結果が得られた。

(5) 神経系におけるリポ蛋白の同定ならびに特性解析 (横山)

アストログリア細胞の培養系より、ApoE 含有のリポ蛋白が分離・精製され、その脂質化学的特性解析を進めた結果、high density lipoprotein (HDL)類似の特性をもつことが確認された。

#### D. 考察

アルツハイマー病は多様な原因論的背景に発症する「症候群」である可能性がある。従って、本疾患 (本症候群) に真に有効な予防法、治療法の開発には、多様な原因により発症する疾患群に共通した病的過程を理解することが不可欠である。本研究課題においては、A $\beta$ の脳内異常蓄積を全てのアルツハイマー病に共通する病的プロセスの開始機転と位置付け、分子細胞生物学的検討を重ねてきた。

はじめに、主任研究者らが先に初期アルツハイマー病脳において検出した GM1 ガングリオシド結合型 A $\beta$ の形成機序を、極性をもった上皮細胞 (MDCK 細胞)を用いて細胞内における A $\beta$ およびその前駆体蛋白 APP の極性輸送の視点から議論した。その結果、細胞内における極性輸送を側底部方向から頂端部方向へ変異させた APP から、特異な電気泳動特性と seeding 活性をもつ A $\beta$ が産生・分泌することを発見するに至った。本 A $\beta$ 分子は、その形成が細胞内のコレステロールに依存すること、また頂端部方向のみへの厳密な極性分泌を示すことが明らかになった。これらの事実より、この特異な A $\beta$ 分子は細胞内にあつ

てコレステロールを高い濃度で含有し、かつ上皮細胞においては頂端部へ極性輸送される特異な膜ドメインである detergent-insoluble glycosphingolipid microdomain (DIG) 上で形成される可能性が想定された。興味深いことに DIG には GM1 ガングリオシドもコレステロールと同様に多く含まれることから、先の GM1 ガングリオシド結合型 A $\beta$  の形成とも総合して、この特異な膜ドメインは脳内における異常な A $\beta$  分子の形成に何等かの役割を果たしている可能性が考えられる。さて、一般に A $\beta$  は上皮細胞においては側底部方向から細胞外に排出されることが知られている。従って、GM1 ガングリオシド結合型 A $\beta$  や今回新たに発見した seeding A $\beta$  の存在から、アルツハイマー病においては A $\beta$  が本来の生理的な細胞内輸送経路を逸脱しているとする作業仮説を立てるに至った。以上の作業仮説を検証する方法の一つは、アルツハイマー病の多様な発症要因を適用した病態細胞モデル系で A $\beta$  の産生および輸送について広く解析することであると考えられる。本研究においては、その目的に沿って、2つのアルツハイマー病・病態細胞モデル系を作成した。即ち、家族性アルツハイマー病原因遺伝子プレセニリン遺伝子導入の神経細胞培養系とアルツハイマー病発症危険因子 ApoE 投与の神経細胞培養系である。

はじめに、プレセニリン遺伝子導入の神経細胞の解析からは、変異型の発現により2種ある A $\beta$  分子種の中の A $\beta$ 42 の細胞内産生および細胞外への排出が増加することを確認した。このうち、細胞内における A $\beta$ 42 の異常蓄積は本研究によりはじめて確認し得た事実である。前述したように A $\beta$  の細胞内輸送と細胞外への排出は厳密な極性制御をうけている。従って、今回見出したよう

に細胞内の A $\beta$  濃度が著しく増加した場合、本来の輸送経路から逸脱して先に紹介した特異な膜ドメインへ混入する可能性も考えられる。変異型プレセニリンのアルツハイマー病発症における意義をさらに明らかにするためには、今後細胞内において増加した A $\beta$  の細胞外への排出系を詳細に解析することが重要であると考えられる。

次に、ApoE に関する病態細胞モデル系を用いた実験からは、これまでのところ神経細胞の内因性コレステロール合成を抑制した条件下で ApoE4 はアイソフォーム特異的に神経細胞死を誘導すること、また ApoE を介した細部膜からのコレステロールの引き抜き効果にアイソフォームによる差異が存在することが明らかとなった。ApoE のアルツハイマー病発症における役割に関しては、いまだ A $\beta$  産生ないしは蓄積との関係は不明であるが、ApoE の生理的役割がコレステロール輸送にあること、また本研究により A $\beta$  は細胞内のコレステロールと関係して異常な構造変化を獲得し seeding A $\beta$  が形成される可能性がでてきたことより、ApoE の病的意義についても細胞内コレステロール代謝との関連で議論することが重要であると考えられる。また、ApoE がどのようなリポ蛋白に組み込まれ生理的に機能するのかを明らかにすることは、未解決の重要な課題である。今年度の研究において、この問題に対してアストログリア細胞培養系を用いて検討を開始し、その脂質化学的特性解析を進めた。ここで得られた情報は、今後培養細胞モデルを用いて ApoE の病的役割を議論する上で重要であると思われる。

## E. 結論

初年度に引き続き、アルツハイマー病発症の分

子機構を、脳内における A $\beta$ 沈着・凝集開始機構の解析、プレセニリンおよび ApoE の病因論的役割の検討から明らかにすることを目標に研究活動を展開した。今年度までの研究において、アルツハイマー病においては A $\beta$ の細胞内産生および細胞内輸送上の異常が潜在的に存在している可能性が示唆された。また、細胞外における A $\beta$ の凝集は、単に細胞外における A $\beta$ の濃度が増加しているのではなく、生理的に産生、排出された可溶性 A $\beta$ の凝集を促進する作用をもつ特異な A $\beta$  (seeding A $\beta$ ) が細部内のコレステロールに大きく影響されて形成されるという作業仮説を立てるに至った。神経細胞におけるコレステロール代謝はこれまで殆ど研究されておらず不明のままであるが、アルツハイマー病発症の最強の危険因子である ApoE の生理的役割がコレステロール輸送であることを考慮すると、今後重要な研究課題であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K.  
Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture.  
J. Biol. Chem. (in press)

Michikawa M and Yanagisawa K.

Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death.

J. Neurochem. (in press)

Ito J, Zhang L-Y, Asai M and Yokoyama S.

Differential generation of high density lipoprotein by endogenous and exogenous apolipoproteins in cultured fetal rat astrocytes.

J. Neurochem. (in press)

Kumagai H, Kawamura Y, Yanagisawa K and Komano H.

Identification of a human cDNA encoding a novel protein structurally related to the yeast membrane-associated metalloprotease, Ste24p.

Biochim. Biophys. Acta 1426:468-474, 1999

Mizuno T, Haass C, Michikawa M and Yanagisawa K.

Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid  $\beta$ -protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells.

Biochim. Biophys. Acta 1373:119-130, 1998

Sudoh S, Kawamura Y, Shinji S, Rong W, Takaomi C. S, Fumitaka O, Yoshiyuki S, Komano H and Yanagisawa K.

Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites.

J. Neurochem. 71:1535-1543, 1998

Michikawa M and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed *de novo* cholesterol synthesis.

J. Neurosci. Res. 54:58-67, 1998.

- Yanagisawa K and Ihara Y.  
GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein in  
Alzheimer's disease brain.  
*Neurobiology of Aging* 19:65-67,1998
- Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and  
Yanagisawa K.  
Implications of *presenilin 1* mutations in Alzheimer's  
disease.  
*Mechanisms of Ageing and Development*  
(in press)
- Michikawa M. and Yanagisawa K.  
Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on  
neuronal cells in culture.  
*Mechanisms of Aging and Development*  
(in press)
- Yokoyama S.  
Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux.  
*Biochim. Biophys. Acta* 1392:1-15,1998
2. 学会発表
- 道川 誠、柳澤勝彦  
シンポジウム「アルツハイマー病の分子遺伝学と  
治療の展望」  
Alzheimer 病におけるアポリポ蛋白 E の役割-コ  
レステロール代謝の観点から  
第 17 回日本薬理学会年会  
シンポジウム 3月 24-26 日 京都
- 道川 誠、柳澤勝彦  
アポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的作用の  
検討 (第 2 報): 培養神経細胞における内因性コ  
レステロール合成と細胞死  
第 39 回日本神経学会総会 5月 20-22 日 京都
- 須藤慎治、川村勇樹、駒野宏人、柳澤勝彦  
プレセニリン 1 ミスセンス変異遺伝子により増  
加するA $\beta$ 42 の細胞内産生部位  
第 39 回日本神経学会総会 5月 20-22 日 京都
- 水野哲也、道川 誠、柳澤勝彦  
MDCK 細胞頭頂側に分泌される特異なアミロイ  
ド $\beta$ 蛋白の解析  
第 39 回日本神経学会総会 5月 20-22 日 京都
- 柳澤勝彦  
GM1 ガングリオシド結合型アミロイド $\beta$ 蛋白  
第 41 回神経化学会 9月 21-23 日 東京
- 道川 誠、柳澤勝彦  
培養神経細胞におけるコレステロール合成抑制  
と細胞死  
第 41 回神経化学会 9月 21-23 日 東京
- 磯部一郎、道川 誠、柳澤勝彦  
グリア細胞の MTT 還元能に与える amyloid  $\beta$ 蛋  
白の影響  
第 41 回神経化学会 9月 21-23 日 東京
- 須藤慎治、川村勇樹、駒野宏人、柳澤勝彦  
プレセニリン 1 遺伝子変異により増加するA $\beta$ 42  
の細胞内産生部位の検討  
第 41 回神経化学会 9月 21-23 日 東京
- 水野哲也、中田 誠、Rong Wang、

Christian Haass、柳澤勝彦

MDCK 細胞においてコレステロール依存性に産生される特異なアミロイド $\beta$ 蛋白の解析

第 41 回神経化学会 9 月 21-23 日 東京

水野 哲也

特異なアミロイド $\beta$ 蛋白産生におけるコレステロール依存性

第 17 回日本痴呆学会 10 月 1-2 日 東京

道川 誠

コレステロール合成と神経細胞死

第 17 回日本痴呆学会 10 月 1-2 日 東京

駒野宏人

プレセニン 1 ミスセンス変異による $A\beta_{42}$ 産生促進のメカニズムについて

第 71 回日本生化学会 10 月 14-17 日 名古屋

柳澤勝彦

アミロイド $\beta$ 蛋白沈着開始の分子機構

戦略的基礎研究推進事業「脳を知る」のシンポジウム ” 脳神経科学の最先端 1998”

12 月 11 日 大阪

柳澤勝彦

脳内 $A\beta$ 沈着開始機構を考える:"seeding  $A\beta$ "の産生について

アルツハイマー病関連疾患に関するシンポジウム 2 月 6 日 東京

柳澤勝彦

アルツハイマー病の脳神経細胞死

第 96 回日本内科学会講演会 3 月 30 日 東京

Michikawa M. Pathogenesis of Alzheimer's disease.

The German-Japanese Workshop Medical Problems Posed by an Aging Population

April.2629,1998, Heiderberg ,Germany

Michikawa M and Yanagisawa K.

Isoform-specific effects of apolipoprotein E on neuronal cells in culture.

International Conference on Alzheimer's disease. July 18-23, 1998, Amsterdam, Netherland.

Komano H, Kumagai H, Kawamura Y, Sudoh S and Yanagisawa K.

Characterization of a human homologue of yeast novel membrane associated metalloprotease, Ste24p.

International Conference on Alzheimer's disease. July 18-23, 1998, Amsterdam, Netherland.

Mizuno T, Haass C and Yanagisawa K.

Cholesterol-dependent generation of amyloidogenic  $\beta$ -protein in MDCK cells.

Annual Meeting, American Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, U.S.A.

Sudoh S, Kawamura Y, Wang R, Komano H and Yanagisawa K.

FAD-linked presenilin1 mutations increase the intracellular levels of  $A\beta_{1-42}$  and  $A\beta_{x-42}$  which are generated at distinct sites.

Annual Meeting, American Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, U.S.A.



厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

アミロイド $\beta$ 蛋白蓄積開始機序の研究

主任研究者 柳澤勝彦 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部部长

研究要旨

アルツハイマー病脳におけるアミロイド $\beta$ 蛋白 ( $A\beta$ ) の蓄積開始機序の分子レベルでの解明を目指し、先に主任研究者らがアルツハイマー病初期脳において選択的に見出した GM1 ガングリオシド結合型  $A\beta$  の形成機構を、 $A\beta$  およびその前駆体である APP の細胞内極性輸送の視点から上皮細胞である MDCK 細胞を用いて検討した。その結果、細胞内の極性輸送が側底部方向から頂端部方向に大きく変異した APP から細胞内コレステロールに依存して特異な  $A\beta$  が産生・排出されることが確認された。この  $A\beta$  の分子特性を詳細に解析した結果、可溶性  $A\beta$  の凝集・アミロイド線維化を促進する作用のあることが確認された。

A. 研究目的

$A\beta$  はアルツハイマー病の中核的病理所見である老人斑アミロイドの主要構成成分であり、前駆体蛋白 APP の生理的な代謝の結果、産生される。 $A\beta$  の脳内異常蓄積はアルツハイマー病成立において一義的に重要な過程であると一般に理解されているが、 $A\beta$  の凝集ならびにアミロイド線維化の分子機構については不明のままである。多くのアルツハイマー病研究者は細胞外の  $A\beta$  濃度が何等かの理由により上昇することが  $A\beta$  凝集の直接的原因と考えている。実際、ある種の家族性アルツハイマー病原因遺伝子の発現によっては細胞外に排出される  $A\beta$  量が 2 倍から数倍増加することが報告されている。しかしながら、細胞外液中の生理的な  $A\beta$  濃度は数 nM であるのに対して、凝集に必要とされる  $A\beta$  濃度は数十  $\mu$ M であるとされ、わずかな濃度の上昇のみで  $A\beta$  凝集が進行

するとは考えにくい。

先に我々がアルツハイマー病脳において見出した GM1 ガングリオシド結合型  $A\beta$  の病的な意義をめぐって、他の研究グループは  $A\beta$  は GM1 ガングリオシドと結合することにより、その二次構造を変え、可溶性  $A\beta$  の凝集を加速させアミロイド線維形成を促進されることを示した。即ち、単に  $A\beta$  濃度の上昇によるのではなく、構造変化などの質的に異常な  $A\beta$  が産生され、 $A\beta$  の凝集ならびにアミロイド線維化が促進されるという可能性が俄に浮上してきた。

本研究は GM1 ガングリオシド結合型  $A\beta$  の形成機構の議論から“seed”として働く異常な  $A\beta$  産生の可能性を検討し、アルツハイマー病脳におけるアミロイド形成機序を解明すること目的とする。

## B. 研究方法

### (1) MDCK 細胞培養および A $\beta$ 検出

トランスウエル上に MDCK 細胞を培養し、頂端部コンパートメント(apical compartment) および側底部コンパートメント (basolateral compartment) に排出される A $\beta$ を中間部および N 末端部を認識する抗 A $\beta$ モノクローナル抗体を用いて免疫沈降/Western blot 解析を行った。

### (2) 細胞外排出 A $\beta$ の定量

MDCK 細胞から細胞外上清中に排出される A $\beta$ の定量は 2 種の抗 A $\beta$ モノクローナル抗体を用いた sandwich enzyme immunoassay により行った。

### (3) コレステロール代謝調節

MDCK 細胞におけるコレステロール代謝を調節するため、内因性コレステロール合成阻害剤であるコンパクチン、細胞表面コレステロールの結合剤であるフィリピンを用いた。また、これらの効果がコレステロール代謝を介したものであることを確認するため、培養上清中に可溶性コレステロールを投与し検討した。

### (4) 可溶性 A $\beta$ の凝集・アミロイド線維化促進作用の検討

MDCK 細胞より排出される A $\beta$ に可溶性 A $\beta$ の凝集ならびにアミロイド線維化を促進させる作用 (seeding ability) があるか否かを検討するため、合成 A $\beta$ の溶液内に MDCK 細胞培養上清より免疫沈降で得られた A $\beta$ を加え、可溶性 A $\beta$ の凝集・アミロイド線維化をアミロイド構造を特異的に認識して蛍光を発するチオフラビン反応ならびに電子顕微鏡を用いた形態学的観察により評価した。

## C. 研究結果

細胞内の極性輸送を側底部方向から頂端部方

向へ変異させた APP 分子から A $\beta$ の中間部を認識する抗体によって免疫沈降され、A $\beta$ の N 末側を認識する抗体によっては免疫沈降されない特性をもつ A $\beta$ が検出された。本 A $\beta$ はギ酸処理により N 末側を認識する抗体との反応性が出現した。また細胞のコンパクチン処理によっても同抗体の反応性が認められた。一方、本 A $\beta$ 分子の質量分析の結果はコンパクチン処理の前後において不変であり、これらの結果を総合すると本 A $\beta$ 分子の特性は分子量の違いによるのではなく、何等かの構造変化を獲得している可能性が推察された。

次に、本 A $\beta$ 分子による可溶性 A $\beta$ の凝集・アミロイド線維化促進作用を検討したところ、側底部方向へ排出される A $\beta$ 等との比較において著しいアミロイド線維形成促進作用が認められた。また興味深いことに、このアミロイド線維形成促進作用は、細胞をコンパクチンないしはフィリピンで処理することにより顕著に抑制された。また、これらの薬剤処理の際、定量した培養上清中の A $\beta$ 量には変化がみられず、アミロイド線維形成促進作用の薬剤処理による変化は、細胞外に排出される A $\beta$ 量が減少することによるのではなく、抗 A $\beta$ モノクローナル抗体との反応性の変化とも総合して何等かの構造変化に基づく現象であると推察された。さらに、本 A $\beta$ 分子によって形成が促進されたアミロイド線維は電子顕微鏡を用いた形態学的な観察においても、幅が10nm のヘリカル構造を示し、従来より知られている A $\beta$ による典型的なアミロイド構造を伴う線維であることが確認された。

## D. 考察

アルツハイマー病脳における A $\beta$ 凝集・アミロ

イド線維化のメカニズムは不明である。今回の研究結果は A $\beta$ の凝集を促進させる効果をもつ構造変化をともなった A $\beta$ の存在をはじめて示唆したといえる。先に主任研究者らが見い出した GM1 ガングリオシド結合型 A $\beta$ の知見と総合して、細胞内においてコレステロールや GM1 ガングリオシドに富み、しかも極性輸送されることが知られている特異な膜ドメインが、seeding 作用をもつ A $\beta$ の産生に深く関わっている可能性が出てきたといえる。このような議論は、アルツハイマー病とならび脳内にアミロイド構造物を蓄積し著しい神経細胞死を示すプリオン病の原因蛋白であるプリオン蛋白が構造変化により凝集性のアイソフォームに変換されること、またこの構造変化が今回の研究においても議論したコレステロールを多く含む特異な膜ドメイン上で生じていることを支持する実験事実があることなどを考慮すると、これらの脳アミロイドーシスに共通する分子基盤の存在が想定される。seeding A $\beta$ の病的意義をさらに検討するためには、我々が作成したアルツハイマー病・病態細胞モデル等を対象にこれらの形成機構の詳細を明らかにすることが必要であると考えられる。

#### E. 結論

細胞内の極性輸送を変異させた APP 分子より、細胞内コレステロールに依存して、可溶性 A $\beta$ の凝集ならびにアミロイド線維化を促進する作用 (seeding ability) を有する A $\beta$ が産生されることが確認された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K.

Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture. J. Biol. Chem. (in press)

Michikawa M and Yanagisawa K.

Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. J. Neurochem. (in press)

Mizuno T, Haass C, Michikawa M and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid  $\beta$ -protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells. Biochim. Biophys. Acta 1373:119-130, 1998

Sudoh S, Kawamura Y, Shinji S, Rong W, Takaomi C. S, Fumitaka O, Yoshiyuki S, Komano H and Yanagisawa K.

Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites. J. Neurochem. 71:1535-1543, 1998

Michikawa M and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed *de novo* cholesterol synthesis.

J. Neurosci. Res. 54:58-67,1998.

Yanagisawa K and Ihara Y.

GM1 ganglioside-bound amyloid  $\beta$ -protein in Alzheimer's disease brain.

Neurobiology of Aging 19:65-67,1998

Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and Yanagisawa K.

Implications of *presenilin 1* mutations in Alzheimer's disease.

Mechanisms of Ageing and Development

(in press)

Michikawa M and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture.

Mechanisms of Aging and Development

(in press)

## 2. 学会発表

道川 誠、柳澤勝彦

シンポジウム「アルツハイマー病の分子遺伝学と治療の展望」

Alzheimer 病におけるアポリポ蛋白 E の役割-コレステロール代謝の観点から

第 17 回日本薬理学会年会 シンポジウム  
3 月 24-26 日 京都

道川 誠、柳澤勝彦

アポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的作用の検討 (第 2 報): 培養神経細胞における内因性コレステロール合成と細胞死

第 39 回日本神経学会総会 5 月 20-22 日 京都

須藤慎治、川村勇樹、駒野宏人、柳澤勝彦

プレセニリン 1 ミスセンス変異遺伝子により増加する A $\beta$ 42 の細胞内産生部位

第 39 回日本神経学会総会 5 月 20-22 日 京都

水野哲也、道川 誠、柳澤勝彦

MDCK 細胞頭頂側に分泌される特異なアミロイド  $\beta$  蛋白の解析

第 39 回日本神経学会総会 5 月 20-22 日 京都

柳澤勝彦

GM1 ガングリオシド結合型アミロイド  $\beta$  蛋白

第 41 回神経化学会 9 月 21-23 日 東京

道川 誠、柳澤勝彦

培養神経細胞におけるコレステロール合成抑制と細胞死

第 41 回神経化学会 9 月 21-23 日 東京

磯部一郎、道川 誠、柳澤勝彦

グリア細胞の MTT 還元能に与える amyloid $\beta$  蛋白の影響

第 41 回神経化学会 9 月 21-23 日 東京

須藤慎治、川村勇樹、駒野宏人、柳澤勝彦

プレセニリン 1 遺伝子変異により増加する A $\beta$ 42 の細胞内産生部位の検討

第 41 回神経化学会 9 月 21-23 日 東京

水野哲也、中田 誠、Rong Wang、

Christian Haass、柳澤勝彦

MDCK 細胞においてコレステロール依存性に産生される特異なアミロイド  $\beta$  蛋白の解析

第 41 回神経化学会 9 月 21-23 日 東京

柳澤勝彦

アミロイドβ蛋白沈着開始の分子機構  
戦略的基礎研究推進事業「脳を知る」のシンポジウム ” 脳神経科学の最先端 1998”

12 月 11 日 大阪

柳澤勝彦

脳内Aβ沈着開始機構を考える:"seeding Aβ"の産生について

アルツハイマー病関連疾患に関するシンポジウム 2 月 6 日 東京

柳澤勝彦

アルツハイマー病の脳神経細胞死

第 96 回日本内科学会講演会 3 月 30 日 東京

Michikawa M and Yanagisawa K.

Isoform-specific effects of apolipoprotein E on neuronal cells in culture.

International Conference on Alzheimer's disease. July 18-23, 1998, Amsterdam, Netherland.

Komano H, Kumagai H, Kawamura Y, Sudoh S and Yanagisawa K.

Characterization of a human homologue of yeast novel membrane associated metalloprotease, Ste24p.

International Conference on Alzheimer's disease. July 18-23, 1998, Amsterdam, Netherland.

Mizuno T, Haass C and Yanagisawa K.

Cholesterol-dependent generation of amyloidogenic β-protein in MDCK cells.

Annual Meeting, American Society for Neuroscience

November 7-12, 1998, Los Angeles, U.S.A.

Sudoh S, Kawamura Y, Wang R, Komano H and Yanagisawa K. FAD-linked presenilin 1 mutations increase the intracellular levels of Aβ1-42 and Aβx-42 which are generated at distinct sites.

Annual Meeting, American Society for Neuroscience  
November 7-12, 1998, Los Angeles, U.S.A.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

プレセニリン 1 (*Presenilin 1*) 遺伝子変異によるアミロイドβ蛋白沈着機構に関する研究

分担研究者 駒野宏人 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部室長

研究要旨

*PS1* ミスセンス変異によるアルツハイマー病発症機構の解明を目的に、ヒトミスセンス変異 *PS1* を誘導発現するマウス神経細胞株を樹立し、それを用いて Aβ産生における *PS1* ミスセンス変異の影響の解析を進めている。我々および他のグループのこれまでの研究により、変異 *PS1* が存在すると Aβ42 産生に必要なγ-セクリターゼ (42 特異的γ-セクリターゼ) による切断が高まることが明らかとなってきた。本年度は、*PS1* ミスセンス変異による Aβ42 産生増加機構をさらに詳細に解析することを目的に、42 特異的γ-セクリターゼに着目し、42 特異的γ-セクリターゼによる APP の切断が、細胞内のどの部位でおき、変異 *PS1* によってどのように影響を受けるかを検討した。その結果、ミスセンス変異 *PS1* が存在すると細胞内の early Golgi compartment に局在するγ-セクリターゼの活性が上昇することが明らかとなった。また、γ-セクリターゼの候補プロテアーゼとして ER あるいは early Golgi compartment に局在する新規の複数回膜貫通型メタロプロテアーゼの同定も併せて行った。

A. 研究目的

プレセニリン 1 (*PS1*)は家族性アルツハイマー病 (AD)の主要原因遺伝子である。我々は、*PS1* ミスセンス変異による AD 発症機構の解明を目的に、ヒトミスセンス変異 *PS1* を誘導発現するマウス神経細胞株(*Neuro2a* 細胞)を樹立し、これを用いて細胞内 Aβ (アミロイドβ蛋白)代謝におよぼす変異 *PS1* の影響の解析をすすめている。

Aβは、アミロイド前駆体蛋白(APP)から 2 カ所の切断によって生成され、Aβの N-末端、C-末端は、それぞれ、未同定のβ-セクリターゼ、γ-セクリターゼと呼ばれるプロテアーゼによる切断を受けて産生されると考えられている。我々のこれまでの研究により、変異 *PS1* が Aβ42 産生に必要

なγ-セクリターゼ (42 特異的γ-セクリターゼ) による切断を高めていることが強く示唆された。

本研究では、*PS1* ミスセンス変異による Aβ42 産生増加機構をさらに詳細に解析することを目的に、42 特異的γ-セクリターゼに着目し、42 特異的γ-セクリターゼによる APP の切断が、細胞内のどの部位でおき、変異 *PS1* によって、どのように影響を受けるを検討した。APP からの Aβの生成は、既述したように二つの切断が必要であるが、β-セクリターゼ切断部位からはじまる APP の C-末端 100 アミノ酸 (APPC-100) を細胞内に発現させた場合では、γ-セクリターゼの切断だけで Aβが生成される。したがって、APPC-100 から生成される Aβ1-42 の産生部位は 42 特異的γ-セク

リターゼによる APP の切断が起きる細胞内部位を反映することになる。我々は、このことを利用し、APPC-100 からの A $\beta$ 1-42 の産生について、細胞内産生部位、変異 PS1 の影響を解析した。また、PS1 ミスセンス変異による $\gamma$ -セクリターゼへの作用機構を知るため $\gamma$ -セクリターゼの同定も試みた。

## B. 研究方法

(1) 細胞:マウス神経細胞株 Neuro 2a を用いた。ラックスイッチ遺伝子発現誘導システム-前年度報告したように PS1 遺伝子をラクトースオペロンのオペレータの下流につないだプラスミドおよびラクトースリプレッサー遺伝子をもつプラスミドとを同時に Neuro2a 細胞に遺伝子導入し安定形質株を得た。これにより培地に IPTG (イソプロピル- $\beta$ -D チオガラクトシド) を添加することにより PS1 遺伝子発現の誘導を調節できる神経細胞株を樹立した。

(2) プラスミド:pCEP4(Invitrogen 社)をベクターとしたヒューマン APP695 cDNA を含むプラスミド pCEPAPP695, APP-C100 含むプラスミド pCEPAPP-C100 を構築した。APP-C100 は、APP の C 末端 100 アミノ酸配列をコードする。

(3) A $\beta$ の検出:A $\beta$ は、アミノ酸 40 個よりなる A $\beta$ 40、42 個よりなる A $\beta$ 42 の存在が知られているが、各々に対する特異的単クローン抗体を用いて、高感度イムノブロット法[Ida *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 22908-22914]により検出した。細胞内 A $\beta$ は 1 %Triton X-100 により可溶化した。

(4)A $\beta$ 産生部位の解析:細胞内分泌輸送を抑制する薬剤 brefeldin A (小胞体からゴルジ体への輸送阻害剤) および monensin (ゴルジ体の中間囊からトランスゴルジ網への輸送阻害剤)を用いた。

これらの薬剤処理により細胞内の A $\beta$ が蓄積するか産生が阻害されるかで、A $\beta$ 産生部位を推定した。

## C. 研究結果

(1) ミスセンス変異 PS1 の誘導により APPC-100 からの A $\beta$ 1-42 産生が増加した。その増加程度は、全長 APP から A $\beta$ 1-42 産生させた場合とほぼ同じであった。

(2) APPC-100 からの A $\beta$ 1-42 産生は、brefeldin A(BFA)処理で抑制され、monensin 処理では抑制されなかった。したがって、42 特異的 $\gamma$ -セクリターゼ活性は、early Golgi compartment に存在すると考えられる。

(3) APPC-100 からの A $\beta$  1-42 産生部位は、変異 PS1 を発現させても野生型と変わらないことが示唆された。

(4) APPC-100 からの A $\beta$ 1-40 産生も、A $\beta$ 1-42 で認められたように、BFA 処理で抑制され、monensin 処理で抑制されなかった。したがって、42 特異的 $\gamma$ -セクリターゼおよび 40 特異的 $\gamma$ -セクリターゼとは、細胞内でおなじように、early Golgi compartment に局在していると思われる。

(5) ER あるいは early Golgi compartment に存在するプロテアーゼとしては、これまで、ER に存在するシグナルペプチダーゼやゴルジに存在する Kexin family を構成しているプロセッシングプロテアーゼ以外には全く知られていない。最近、酵母において、接合フェロモン、a-ファクターのプロセッシングプロテアーゼが同定された(Fujimura-Kamada K. *et al.*, 1997. *J. Cell. Biol.* 136: 271-285)。このプロテアーゼは、6 回膜貫通型のメタロプロテアーゼで ER あるいは early Golgi compartment に局在している。そこで、

我々は、 $\gamma$ -セクリターゼの候補として、このプロテアーゼに注目し、ヒトより、これとホモロジーのある遺伝子を分子生物学的手法でヒト脳 cDNA ライブラリーより単離した。その結果、酵母のものと約 60%ホモロジーをもつ複数回膜貫通型メタロプロテアーゼが同定され、その蛋白の局在を調べたところ、ER と early Golgi compartment に存在していることがわかった。

#### D. 考察

APP-C100 を使った実験からミスセンス変異 PS1 は 42 特異的 $\gamma$ -セクリターゼ活性をあげることが明瞭に示された。

また、 $\gamma$ -セクリターゼ活性の細胞内部位を調べたところ、40および 42 どちらの $\gamma$ -セクリターゼも early Golgi compartment に存在することが示唆された。変異 PS1 は、early Golgi compartment に存在する 42 特異的 $\gamma$ -セクリターゼ活性を選択的に促進すると考えられる。

我々は、ER や early Golgi compartment に局在する新規のメタロプロテアーゼを $\gamma$ -セクリターゼの候補として同定したが、これが $\gamma$ -セクリターゼ活性をもつかいなかは今後の解析が必要である。

#### E. 結論

本研究により、 $A\beta$ 産生経路において、 $\gamma$ -セクリターゼ活性は early Golgi compartment に存在することが示唆され、変異 PS1 は、early Golgi compartment に存在する $\gamma$ -セクリターゼ活性のうち、42 特異的 $\gamma$ -セクリターゼ活性を促進するという結果が得られた。今後は、変異 PS1 が、どのように early Golgi compartment での 42 特異的 $\gamma$ -セクリターゼ活性を増加させているかを明

らかにする必要がある。

また、 $\gamma$ -セクリターゼ活性の候補として新規プロテアーゼの cDNA をクローニングした。この遺伝子のコードする蛋白は 6 回あるいは 7 回膜貫通型メタロプロテアーゼで、ER や early Golgi compartment に局在していることが明らかとなった。このプロテアーゼがセクリターゼ活性をもつかいなかは今後の解析が必要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sudoh S, Kawamura Y, Shinji S, Rong W, Takaomi C. S, Fumitaka O, Yoshiyuki S, Komano H and Yanagisawa K.

Presenilin 1 mutations linked to familial Alzheimer's disease increase the intracellular levels of amyloid  $\beta$ -protein 1-42 and its N-terminally truncated variant(s) which are generated at distinct sites.

J. Neurochem.71:1535-1543,1998

Komano H, Seeger M, Gand S, Wang G. T, Krafft G. A and Fuller R.S.

Involvement of yeast cell surface glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases in  $\alpha$ -secretase-type cleavage and ectodomain solubilization of human Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein

J. Biol. Chem. 273:31648-31651,1998.

Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and Yanagisawa K.

Implications of *presenilin 1* mutations in Alzheimer's disease.

Mechanisms of Ageing and Development.



(in press)

Kumagai H, Kawamura Y, Yanagisawa K and Komano H.

Identification of a human cDNA encoding a novel protein structurally related to the yeast membrane-associated metalloprotease, Ste24p.

Biochim. Biophys. Acta 1426:468-474, 1999

Sudoh S, Kawamura Y, Wang R, Komano H and Yanagisawa K.

FAD-linked presenilin1 mutations increase the intracellular levels of A $\beta$ 1-42 and A $\beta$ x-42 which are generated at distinct sites.

Annual Meeting, American Society for Neuroscience November 7-12, 1998, Los Angeles, U.S.A.

## 2. 学会発表

須藤慎治、川村勇樹、駒野宏人、柳澤勝彦

プレセニン 1 ミスセンス変異遺伝子により増加するA $\beta$ 42 の細胞内産生部位

第 39 回日本神経学会総会 5月 20-22日 京都

須藤慎治、川村勇樹、駒野宏人、柳澤勝彦

プレセニン 1 遺伝子変異により増加するA $\beta$ 42 の細胞内産生部位の検討

第 41 回神経化学会 9月 21-23日 東京

駒野宏人、須藤慎治、川村勇樹、柳澤勝彦

シンポジウム

プレセニン 1 ミスセンス変異遺伝子によるA $\beta$ 42 産生促進機構について

第 71 回日本生化学会 10月 14-17日 名古屋

Komano H, Kumagai H, Kawamura Y, Sudoh S and Yanagisawa K.

Characterization of a human homologue of yeast novel membrane associated metalloprotease, Ste24p.

International Conference on Alzheimer's disease. July 18-23, 1998. Amsterdam, Netherland.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

アルツハイマー病におけるアポリポプロテイン E の分子機構の解明

分担研究者 道川 誠 国立療養所中部病院・長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部室長

研究要旨

神経系細胞におけるコレステロール代謝に対する、apolipoprotein E (ApoE)のアイソフォーム特異的な作用につき検討した。ApoE は神経細胞およびアストロサイトからコレステロールを引き抜く (efflux) こと、さらに efflux の程度が ApoE のアイソフォーム別で違いがあること (ApoE2>ApoE3>ApoE4) を明らかにし、ApoE はアイソフォームの違いによりコレステロール代謝に異なった影響を与えていると考えられた。

A. 研究目的

痴呆老人の増加は我が国をはじめとして先進国の抱える深刻な問題である。なかでもアルツハイマー病は脳血管性痴呆と並んで痴呆性疾患患者数の大きな割合を占めるにも関わらずその原因は不明であることから、その病因解明は予防法、治療法の開発に重要であると考えられる。最近 apolipoprotein E (ApoE)のアイソフォームの一つである ApoE4 がアルツハイマー病の強力な危険因子であることが明らかとなったが、ApoE のアルツハイマー病発症に関与する分子機構についての詳細は明らかではない。昨年度、我々は、外傷後においてコレステロール生合成が低下し、ApoE の産生が増加する状況が、アルツハイマー病の脳内病態に類似した条件である可能性を考え、コレステロール合成を抑制した培養モデルを確立し、(1) ApoE4 がアイソフォーム特異的に神経細胞死を引き起こし、その原因として細胞内コレステロール合成が関与していること、(2)

培養神経細胞では、HMG-CoA reductase inhibitor によって細胞死が誘導されるが、その主要原因は他の増殖性細胞と大きく異なりコレステロールの低下によることを明らかにした。

(2) は (1) の結果を支持すると考えられた。今年度は ApoE がコレステロールの細胞内への取り込み以外にも、細胞膜からの efflux を介して、ApoEが細胞のコレステロールを出入全体で制御していることを明らかにすることを目的に研究した。

B. 研究方法

(1) 神経細胞培養：妊娠 17-18 日目のラット胎仔脳を無菌的に取り出し、膜を剥離した後メスで細かく切断した後、0.25%のトリプシンで 37°C、20 分間 incubation した後、パスツールピペットでピペッティングして、神経細胞を単離し poly-D-lysine でコートした 12 ウェルディッシュあるいは 75mm<sup>2</sup> フラスコに N2 添加した

DMEM/F12 の無血清培地で培養した。

(2) アストロサイト培養：上記で得られた細胞を 10%ウシ胎児血清入りの DMEM によりフラスコで培養し、2 週間後に蒔き換え、さらに 1-2 週間後に 12 ウェルディッシュに蒔き直したものをを用いた。

(3) アイソトープラベル：細胞を [<sup>14</sup>C]acetate で 24 時間ラベルし、翌日 DMEM で 3-5 回洗った後、DMEM+0.1%BSA 培地に交換し、同時にヒト・リコンビナント ApoE2, E3, E4 を加えた。4-48 時間後に培地および細胞を分離し、それぞれからクロロフォルム：メタノール法により脂質を抽出し、TLC で展開後 BAS2000 でコレステロールおよびリン脂質を定量した。さらに培地を KBr を用いた密度勾配法により 11 のフラクションに分離し、それぞれのフラクションに含まれるコレステロールおよびリン脂質を定量した。また各フラクションに含まれる ApoE 量をウエスタンブロットにより評価した。

### C. 研究結果

ApoEはアストロサイトに対しても神経細胞に対してもコレステロールおよびリン脂質を培地中へ引き抜く作用を持つことが明らかになった。またこの efflux 作用はアイソフォーム特異的であり、その強さは ApoE2>ApoE3>ApoE4 の順であった。さらに ApoE による efflux ではコレステロールおよびリン脂質からなる粒子は比重 1.07-1.21 の HDL と同じ比重のフラクションに存在した。

### D. 考察

中枢神経系におけるコレステロール代謝は血液脳関門により出入の制限を受けていることか

ら、体循環系とは独立した系が存在すると考えられる。しかし、中枢神経系におけるコレステロール代謝に関する研究は少なく、その知見はきわめて限られている。中枢神経系で脂質代謝を司る主なアポリポ蛋白として ApoE および ApoA1 が知られており、脂質を運搬するリガンドとして働いていると考えられる。従ってアルツハイマー病の危険因子 ApoE4 の発症機構を検討する際には当然コレステロールをはじめとする脂質の取り込みに着目することになる。昨年度我々が行った研究では ApoE4 は ApoE3 よりもより多くのコレステロールを取り込み、結果として細胞内コレステロール代謝を抑制していることを報告した。一方こうした脂質運搬のリガンドとしての作用の他に ApoE はコレステロール及びリン脂質を細胞膜から細胞外へ引き抜く (efflux) 作用をもつことが非神経細胞において明らかにされてきた。このことは、中枢神経系においても ApoE が脂質の取り込み以外に efflux 作用を介してコレステロール代謝を制御している可能性を示している。本年度の当研究では ApoE がコレステロールおよびリン脂質を efflux し HDL を形成する acceptor であること、その作用は E2>E3>E4 の順に大きいことを中枢神経系細胞で明らかにした。この結果は昨年度の結果と合わせると次の考え方を支持する結果と考えられる。すなわち、ApoE は、酵素やイオンチャンネルの機能維持に重要な細胞膜のコレステロール代謝をコレステロールの細胞内外への輸送を介してアイソフォーム特異的に制御していることを、本研究で明らかにした。以上の結果から、ApoE のアイソフォームの違いによるアルツハイマー病発症促進の違いは、ApoE のアイソフォームの違いによるコレステロール代謝に対する作用の違いから説明すること

が可能ではないかと考えられる。

## E. 結論

(1) ApoE はアストロサイトに対しても神経細胞に対してもコレステロールおよびリン脂質を培地中へ引き抜く作用をもつことが明らかになった。

(2) またこの efflux 作用はアイソフォーム特異的であり、その強さは ApoE2>ApoE3> ApoE4 の順であった。

(3) さらに ApoE による efflux により形成される粒子は、コレステロールおよびリン脂質からなり、その比重は 1.07-1.21 の HDL と同じ比重のフラクションに存在した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Michikawa M and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E4 induces neuronal cell death under conditions of suppressed *de novo* cholesterol synthesis.

J.Neurosci.Res.4: 58-67, 1998.

Mizuno. T, Haass C, Michikawa M and Yanagisawa K.

Cholesterol-dependent generation of a unique amyloid  $\beta$ -protein from apically missorted amyloid precursor protein in MDCK cells.

Biochim. Biophys. Acta 1373: 119-130, 1998.

Michikawa M and Yanagisawa K.

Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell

death.

J.Neurochem.(in press)

Michikawa M and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture.

Mechanisms of Aging and Development

(in press)

### 2.学会発表

道川 誠

「コレステロール代謝からアルツハイマー病をみる：アポリポ蛋白 E の役割」

ミニシンポジウム「アルツハイマー病研究最前線の紹介、問題点」 2月9日 東京

道川 誠、柳澤勝彦

シンポジウム「アルツハイマー病の分子遺伝学と治療の展望」

Alzheimer 病におけるアポリポ蛋白 E の役割-コレステロール代謝の観点から

第 17 回日本薬理学会年会 シンポジウム

3月24-26日 京都

道川 誠、柳澤勝彦

アポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的作用の検討 (第 2 報) : 培養神経細胞における内因性コレステロール合成と細胞死

第 39 回日本神経学会総会 5月20-22日 京都

水野哲也、道川 誠、柳澤勝彦

MDCK 細胞頭頂側に分泌される特異なアミロイド  $\beta$  蛋白の解析