
平成 11 年度
厚生省厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

中枢神経系におけるコレステロールの果たす役割
およびその代謝機構解明に関する研究
(H11-長寿-019)

研究報告書

主任研究者 道川 誠

総括研究報告書

中枢神経系におけるコレステロールの果たす役割およびその代謝機構解明に関する研究

主任研究者 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 本研究班では中枢神経系におけるコレステロール代謝の全体像を分子生物学、脂質生化学および細胞生物学的手法を用いて多角的に明らかにする為に、①神経細胞およびアストログリア細胞におけるアポリポ蛋白 E の産生・分泌とコレステロールの取り込みおよび Efflux 機構の解明②コレステロールの細胞内輸送の分子機構の解明、③疾患検体におけるコレステロールおよび関連蛋白等の解析を行った。その結果、コレステロール代謝の維持が神経細胞の生存に重要であること、その代謝は主に apoE によってアイソフォーム特異的に制御されること、アストロサイトにおいてはその細胞内機構にはカベオーラという cholesterol および sphingomyelin の豊富なドメインが関与する可能性が示唆された。

分担研究者

福山隆一	京都府立医科大学医学部 脳血管系老化研究センター
伊藤仁一	名古屋市立大学 医学部第一生化学

A. 研究目的

わが国の人口の高齢化は他国に類をみない急速なスピードで進んでおり、高齢者の増加に伴う様々な課題に直面しつつある。加齢に伴う変化の一つとして中枢神経を含む幾つかの組織におけるコレステロール産生能の低下が報告されている。また脂質代謝に深く関与する apoE ε4 がアルツハイマー病をはじめとする age-related disease の危険因子であることが明らかにされて

いる。従って、こうした神経変性疾患の発症機構の解明及びその治療法の開発には神経系におけるコレステロールを含む脂質代謝の全体像を明らかにしておくことが必要である。本研究班は、加齢に従って変化するコレステロール代謝の全貌を神経系細胞において明らかにすることを最終目的に、主に神経系細胞におけるコレステロール代謝の基本的メカニズム及びその役割を明らかにし、apoE ε4 の関与する age-related disease である神経変性疾患の病態解明に貢献することを目指す。

B. 研究方法

神経系細胞（アストロサイトおよび神経細胞）における脂質代謝の全体を明らかにするために
(1) 培養神経系細胞の脂質代謝に対する apoE

の効果を取り込みと搬出双方から検討する系の確立および解析 (2) アストロサイトからの脂質搬出における細胞内分子機構を解析する系の確立および解析 (3) 疾患における脂質および関連蛋白の変化を解析するために、アルツハイマー病患者脳脊髄液中の β アミロイド、アポリポ蛋白 E(apoE)、グリア線維性酸性蛋白質の測定、リポ蛋白分画の生化学的検討、およびの apoE 遺伝子多型の解析のためのアッセイ系を確立し、検討した。

C. 研究結果

神経細胞に対する脂質搬出作用における apoE アイソフォーム特異性の検討 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 efflux 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。ApoE によりアストロサイトから搬出されたコレステロールおよびリン脂質から成る HDL は、その構成成分である apoE の神経細胞表面の apoE 受容体への結合にアイソフォーム別に差があることが明らかになった (apoE4>apoE3>apoE2)。

神経系細胞におけるコレステロール efflux 機構の解明 ラットアストロサイトは自ら産生する apoE に依存して、主に sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC), cholesterol (CHO) から成り、CHO content の高い HDL を細胞外

に産生した。一方、アストロサイトは外来性 apoAI に応じて CHO-poor HDL を細胞外に産生すると同時に、細胞内 free CHO pool が低下して ACAT によるコレステロールのエステル化が減少した。アストロサイトの apoAI 反応性は繊維芽細胞に比べるときわめて低く、繊維芽細胞が 24 時間まで CHO efflux 作用が継続したのに対し、アストロサイトは約 8 時間で停止した。アストロサイトを sphingomyelinase (SMase) で前処理すると、caveolae-like domain の PC content はほとんど影響を受けなかったにもかかわらず、CHO content は著しく減少した。また、apoAI-mediated CHO efflux は SMase 処理により上昇した。apoAI による CHO efflux は SMase 処理中に最も強く、時間の経過と共に著しく減少した。ACAT-available CHO pool は SMase 処理後 apoAI 刺激により減少した。培溶液中に SM を添加すると、apoAI-mediated CHO efflux は抑制された。一方、SMase 処理されたアストロサイトは SMase 処理後 1 時間から細胞内での SM 合成が促進され、細胞内あるいは細胞膜での SM content の上昇が apoAI による CHO 搬出に強く影響を与えることが示唆された。

遺伝性疾患脳髄黄色腫症およびアルツハイマー病患者検体の解析 (1) コレステロールの代謝異常が脳に及ぼす影響を検討するモデルとして、ミトコンドリア内のコレステロール代謝酵素 CYP27 の異常によって起こるヒトの常染色体性劣性遺伝性疾患、脳髄黄色腫症 (CTX) 患者一例の遺伝子異常を解析した。この結果を用いて、患者家族の遺伝子診断を行った。患者、および家族の体液中のコレステロール値、および

その代謝産物であるコレスタノール値と、変異遺伝子の保有との連関を検討した。患者では脳脊髄液中にこれらが上昇していること、および CT 画像の検討から、大脳実質にもこれらが蓄積している可能性が確かめられた。しかし、ヘテロ接合体の患者家族の血清値は正常であった。以上の結果より、本患者における精神発育遅滞は、遺伝子変異により CYP27 の酵素活性が失われ、コレステロールおよびコレスタノールが大脳組織に蓄積、組織が破壊され、神経細胞死が引き起こされたためであろうと推定されたが、この病態にはその他の遺伝子や環境因子の関与も強く働いていると推測された。(2) AD 患者脳脊髄液中のアポリポ蛋白 E(apoE)、およびリポ蛋白に含まれるその他の蛋白質を検討した。これと対比するため、アミロイドベータ蛋白質(Aβ40 と 42)、グリア線維性酸性蛋白質(GFAP)量も測定した。疾患の背後にある加齢の影響を勘案するため、これら蛋白質の正常コントロール(0 才から約 90 才)での値も測定した。AD 患者については、痴呆度(MMSE)との相関を調べた。また、APOE の 2ヶ所の遺伝子多型を検討した。以上の結果、AD 患者の大脳では早期より神経細胞およびアストロサイトがともに崩壊し、病期が進むにつれ神経細胞は脱落し、アストロサイトの反応性が高まっていくことが推定された。また、APOEε4 はこれらの変化にあまり連関しないこと、APOE プロモーター領域の多型は日本人は欧米人と異なり、APOEε4 と連鎖平衡にあることが示された。

D. 考察

中枢神経系におけるコレステロール代謝は血管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の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、apoE は神経系細胞から脂質を搬出し、HDL を形成する能力があること、その作用に apoE2>apoE3>apoE4 の順にアイソフォーム別に違いがあることを明らかにした。さらに、このようにして形成された HDL の取り込みに際しては、その構成成分である apoE アイソフォームの違いにより受容体への affinity に違いがあることを明らかにした。すなわち、apoE はアイソフォーム特異的にコレステロールを含む脂質代謝を取り込みおよび搬出双方から制御していることが明らかになった。このことは、apoE が、酵素の働き、イオンチャンネルの機能維持および細胞間情報伝達等に重要な細胞膜のコレステロール代謝をアイソフォーム特異的に制御していることを意味する。

また、endogenous および exogenous な lipid acceptor である apoA1 による lipid efflux の結果、どちらからでも HDL を産生するが、脂質構成に違いがあり、それは細胞内メカニズムの違いに依存することが明らかになった。apoE についても同様の機構が働いている可能性があり、示唆に富む結果である。また、コレステロールと神経疾患の関連についての解析では、コレス

テロールの異化異常を来たす遺伝性疾患脳腱黄色腫症患者における精神発育遅滞は、遺伝子変異により CYP27 の酵素活性が失われ、コレステロールおよびコレスタノールが脳組織に蓄積、組織が破壊され、神経細胞死が引き起こされたためであろうと推定された。またアルツハイマー病患者検体の解析からは AD 患者の脳では早期より神経細胞およびアストロサイトがともに崩壊し、病期が進むにつれ神経細胞は脱落し、アストロサイトの反応性が高まっていくことが推定された。

E. 結論

コレステロール代謝の維持が神経細胞の生存に重要であること、その取り込み及び搬出機構は主に apoE によってアイソフォーム特異的に制御されること、またアストロサイトにおけるコレステロール搬出機構の細胞内機構にはカベオラという cholesterol および sphingomyelin の豊富なドメインが関与する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Michikawa M and Yanagisawa K.

Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture. *Mechanisms of Ageing and Development* 107:233-243,1999.

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 274:15110-15114,1999.

Michikawa M and Yanagisawa K.

Inhibition of cholesterol production, and not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J. Neurochem.* 72:2278-2285,1999.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K.

Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis

by amyloid β -protein and chloroquine. *Neurosci. Lett.* 266:129-132,1999.

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H.

Expression of the mRNA for two isoforms of neural plakophilin-related arm-repeat protein/ δ -catenin in rodent neurons and glial cells. *Neurosci. Lett.* 277: 185 -188,1999.

Owada K, Sanjo N, Kobayashi T, Mizusawa H, Muramatsu H, Muramatsu T and Michikawa M. Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons. *J. Neurochem.* 73: 2084-2092, 1999.

Shiga K, Fukuyama R, Kimura S, Nakajima K and Fushiki S. Mutation of the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) results in truncation of mRNA expressed in leucocytes in a Japanese family with cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67:675-677, 1999.

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.* 72: 2362-2369, 1999.

Li W, Tada T, Miwa T, Okada N, Ito J, Okada H. Tateyama H and Eimoto T. mRNA expression of complement components and regulators in rat smooth muscle cells. *Microbiol. Immunol.* 43: 585-593, 1999.

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

Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1483:81-90, 2000.

Michikawa M, Fan Q-W, Isobe I and Yanagisawa K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 74:1008-1016, 2000.

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.

A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial. *Exp. Neurol.* (in press)

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K and Fushiki S.

Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subjects, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *European Neurol.* (in press)

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S and Yanagisawa K. Age-dependent change in the level of A β 40 and A β 42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of A β 42 to A β 40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *European Neurol.* (in press)

Ito J and Yokoyama S. Sialosylcholesterol induces regulation of astrocyte filament network. *Biochim. Biophys. Acta* (in press)

2. 学会発表

道川 誠、范 企文、磯部 一郎、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：培養神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロール efflux に及ぼす影響
第 42 回日本神経化学学会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

磯部 一郎、柳澤勝彦、道川 誠
合成 amyloid β -蛋白を用いたラットグリア細胞培養系における老人斑モデル
第 42 回日本神経化学学会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

川村勇樹、范 企文、林 秀樹、道川 誠、柳澤勝彦、駒野宏人
中枢神経系細胞における 2 種の NPRAP/ δ -catenin アイソフォームの発現解析
第 42 回日本神経化学学会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

林 秀樹、水野哲也、道川 誠、柳澤勝彦
カベオラとは異なるコレステロール高含有ドメインにおけるアミロイド前駆体蛋白
第 42 回日本神経化学学会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

川村勇樹、范企文、林秀樹、道川誠、柳澤勝彦、駒野宏人 神経細胞およびグリア細胞における NPRAP/ δ -catenin mRNA の発現 第 72 回 日本生化学会 1999 年 10 月 8 日 横浜

滋賀健介、福山隆一、木村茂、中島健二、伏木信次 ステロール水酸化酵素遺伝子のスプライドナー部位の G->A 点突然変異により

mRNA truncation をきたした脳腱黄色腫症家系の遺伝子解析 第 34 回日本人類遺伝学会 1998 年 10 月 甲府

滋賀健介、中島健二、矢追毅、福山隆一、伏木信次 リンパ球を用いた脳腱黄色腫症 (CTX) 家系の CYP27 遺伝子転写産物の解析 第 39 回日本神経学総会 1999 年 5 月 20-22 日 東京

伊藤仁一、張 力勇、横山信治
ラットアストロサイトによるコレステロール放出におけるリポタンパク質の役割 第 41 回日本神経化学学会 9 月 21-23 日 東京

伊藤仁一、張 力勇、横山信治
ラットアストロサイトが合成・分泌する apolipoprotein E のアストロサイトからの細胞脂質搬出における役割 第 71 回日本生化学会 10 月 14-17 日 名古屋

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H. Expression of the gene for δ -catenin/NPRAP in neurons and glial cells. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Fan Q-W, Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M. Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the central nervous system cells in culture. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Michikawa M, Fan Q-W and Yanagisawa K. Apolipoprotein E-mediated lipid efflux from neurons and astrocytes is isoform-specific. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K. Enhancement of MTT exocytosis by amyloid β -protein and chloroquine in rat glial cells. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K. Diversity of the localization of amyloid precursor protein in detergent-insoluble glycopingolipid-rich microdomains. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

分担研究報告書

神経系細胞における脂質代謝に果たすアポリポプロテイン E の役割の解明

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 神経系細胞に対す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) を明らかにした。また、このようにして産生された HDL 様の粒子の受容体に対する affinity を検討した結果、apoE2<apoE3<apoE4 であった。以上から、apoE はコレステロール代謝にアイソフォームの違いにより取り込みと搬出の双方から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。現在までに我々は、外傷後においてコレステロール合成が低下し、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事を明らかにした。1999年度は apoE が細胞膜からの搬出機構を介して、細胞のコレステロールを制御している可能性および、このような apoE による脂質 efflux により形成される HDL を用いて、より生理的条件下で脂質の取り込みについて検討した。

B. 研究方法

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 ウェルあるいは径

75mm² フラスコに N2 添加した DMEM/F12 の無血清培地で培養した。

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 12well dish にまき直したものをを用いた。

アイソトープラベル:細胞は[¹⁴C]acetate で 24 時間ラベルされ、翌日 DMEM で 3-5 回洗った後、DMEM+0.1%BSA 培地に交換し、同時に human recombinant 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 10 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。こうして得られた HDL を透析後、摂氏 4 度に保った培地中に添加し神経細胞の受容体に結合させた。結合した脂質はヘキサノール:イソプロパノール (3:2) で抽出後 TLC 展開し、定量した。

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。また、ApoE によりアストロサイト

から搬出されたコレステロールおよびリン脂質から成る HDL は、その構成成分である apoE の神経細胞表面の apoE 受容体への結合にアイソフォーム別に差があることが明らかになった (apoE4> apoE3>apoE2)。

D. 考察

中枢神経系におけるコレステロール代謝は血管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の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。今年度の研究では、apoE は神経系細胞から脂質を搬出し、HDL を形成する能力があること、その作用には apoE2>apoE3>apoE4 の順にアイソフォーム別に違いがあることを明らかにした。さらに、そうして形成された HDL の取り込みに際しては、その構成成分である apoE アイソフォームの違いにより受容体への affinity に違いがあることを明らかにした。これらの結果から apoE はアイソフォーム特異的にコレステロールを含む脂質代謝を取り込みおよび搬出双方から制御していることが明らかになった。このことは、apoE が、酵素の働き、イオンチャンネルの機能維持および細胞間情報伝達等に重要な細胞膜のコレステロール代謝をアイソフォーム特異的に制御していることを意味する。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

ApoE はアストロサイトから HDL を形成し、その作用にはアイソフォーム特異性がある (apoE2>apoE3>apoE4) こと、この HDL は神経細胞の受容体に対してアイソフォーム特異的な affinity の強さを持ち、その強さは apoE4>apoE3>apoE2 の順であることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Michikawa M and Yanagisawa K.
Apolipoprotein E4 isoform-specific actions on neuronal cells in culture.
Mech. Ageing Dev. 107: 233-243, 1999.

Michikawa M and Yanagisawa K.
Inhibition of cholesterol production but not of Nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death.
J. Neurochem. 72: 2278-2285, 1999.

Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C and Yanagisawa K.
Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid β -protein in cell culture.
J. Biol. Chem. 274: 15110-15114, 1999.

Owada K, Sanjo N, Kobayashi T, Mizusawa H, Muramatsu H, Muramatsu T and Michikawa M.
Midkine inhibits caspase-dependent apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase in cultured neurons.
J. Neurochem. 73: 2084-2092, 1999.

Isobe I, Michikawa M and Yanagisawa K.
Enhancement of MTT, a tetrazolium salt, exocytosis

by amyloid β -protein and chloroquine in cultured rat astrocytes.
Neurosci. Lett. 266: 129-132, 1999.

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H.
Expression of the mRNA for two isoforms of neural plakophilin-related arm-repeat protein/ δ -catenin in rodent neurons and glial cells
Neurosci. Lett. 277, 185-188, 1999.

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C and Yanagisawa K.
Amyloid precursor protein in unique cholesterol-rich microdomains different from caveolae-like domains.
Biochim. Biophys. Acta 1483: 81-90, 2000.

Michikawa M, Fan Q.-W., Isobe I and Yanagisawa K.
Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture.
J. Neurochem. 74: 1008-1016, 2000.

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.
A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial culture.
Exp. Neurol. (in press)

2. 学会発表

磯部 一郎、柳澤勝彦、道川 誠
合成 amyloid β -蛋白を用いたラットグリア細胞培養系における老人斑モデル
日本神経化学会 広島 1999年9月15-17日

道川 誠、范 企文、磯部 一郎、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: 培養神経細胞及びアストロサイトにおけるコレステロール efflux に及ぼす影響
日本神経化学会 広島 1999年9月15-17日

アポリポ蛋白 E のアイソフォーム特異的作用の検討 (第3報): 培養神経細胞におけるコレステロール代謝にたいする影響
日本神経学会 東京 1999年5月15-17日

Michikawa M, Fan Q.-W., and Yanagisawa K.
Apolipoprotein E-mediated lipid efflux from neurons and astrocytes is isoform-specific.
29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

分担研究報告書

遺伝性脳髄黄色腫症の遺伝子異常の検討およびアルツハイマー病患者脳脊髄液・

DNA のアポリポ蛋白を中心とする生化学的・分子遺伝学的解析

分担研究者 福山隆一 京都府立医科大学附属脳血管系老化研究センター・病態病理学部門講師

研究要旨 コレステロールの代謝異常が脳に及ぼす影響を検討するモデルとして、コレステロール代謝酵素 *CYP27* の異常によって起こるヒトの常染色体性劣性遺伝性疾患、脳髄黄色腫症患者とその家族の遺伝子異常を解析し、その体液中のコレステロール値、およびその代謝産物であるコレスタノール値と、変異遺伝子の保有との連関を検討した。本患者における精神発育遅滞は、遺伝子変異により *CYP27* の酵素活性が失われ、コレステロールおよびコレスタノールが脳組織に蓄積、組織が破壊され、神経細胞死が引き起こされたためと推定された。また、この病態にはその他の遺伝子や環境因子の関与も強く働いていると推測された。アルツハイマー病(AD)の脳の病態を知るため、AD 患者脳脊髄液中のアポリポ蛋白 E(*APOE*)、リポ蛋白に含まれるその他の蛋白質、およびアミロイドベータ蛋白質、グリア線維性酸性蛋白質量を測定し、痴呆度との相関を調べた。また、*APOE* の 2ヶ所の遺伝子多型を検討した。以上の結果、AD 患者の脳では早期より神経細胞およびアストロサイトが崩壊し、病期が進むにつれ神経細胞は脱落、アストロサイトの反応性が高まると推定された。*APOE* ϵ 4 はこれらの変化に関連せず、*APOE* プロモーター領域の多型は日本人では *APOE* ϵ 4 と連鎖平衡にあることが示された。

A. 研究目的

脳変性疾患の治療法の開発は高齢化社会を迎えている我が国において急務である。アルツハイマー型老年期痴呆(SDAT)は近年増加の一途をたどっており、その発病機構の解明が待たれる。私たちはアミロイドベータ蛋白質のカルシウム・コリン流入およびリソゾームの活性化効果や、脳におけるミトコンドリア遺伝子の発現低下などが AD の病態発生に関与するとの証拠を示してきた。一方、近年まで、多くのグループによってアポリポ蛋白 E 遺伝子(*APOE*)の一つの遺伝子型 ϵ 4 の保持と AD の発病時期・進行の連関が

示されてきた。この事実は脳における何らかの脂質代謝異常が AD の病態発生の基礎にあることを示唆している。私たちはミトコンドリアとコレステロール代謝異常が複雑にからみあい、さらにプレセニリンを中心とするアミロイド代謝障害とも連動し、AD が進行していくものと考えている。本研究はコレステロール異化経路の異常にもとづく脳の変化を考察し、AD 患者の脳脊髄液中のアポ E 蛋白質などを測定、さらに、*APOE* 内の 2 多型の遺伝子頻度を AD とコントロール群と比較することにより、脳のコレステロール代謝に深い係わりをもつ apoE の AD 発症におけ

る機能的連関を総合的に探究しようと試みた。

B. 研究方法

(1) CTX 患者の脳脊髄液、患者および家族、近親者の血液サンプル
インフォームドコンセントが得られた患者家族近親者（患者 39 才、両親、兄、姉、姪 2 人）より血液 DNA と RNA を抽出した。生化学的検査のため、患者血清および脳脊髄液を当大学の基準にもとずいて採取した。患者および家族の匿名性保持のため、姓名については患者の家族名のみ知らされたが、それ以外の名前および住所は主治医から告げられていない。その他患者および家族個人を特定できる情報はいっさい知らされていない。発表の際には患者・家族氏名は使われていない。以上の理由により、倫理上の問題はないと判断した。

(2) 脳脊髄液、血液サンプル

当病院神経内科に凍結保存されている過去のサンプル(平成 11 年まで)を用いた。患者あるいは家族から、臨床生化学的および研究的検査のためとのインフォームドコンセントを得ている。コントロールとしてこれらのうち正常範囲と診断された者、本学中央検査部で検査済みの破棄される少量のサンプルから(平成 11 年まで)、生化学的検査上正常範囲にあるものをランダムに抽出し使用した。サンプルは匿名性に配慮するためできるだけ番号で取り扱い、試料は使いきるか、解析終了後破棄した。発表に際して患者名、コントロール者名は全く記載せず、個人を特定しうる情報は保持されていない。以上の理由から、実験期間内(平成 11 年まで)では本研究遂行上の倫理的問題はないと判断した。

(3) 遺伝子異常の検索

PCR-SSCP 法により CYP27 遺伝子を分析し、異

常の見いだされた断片は、サブクローニング後、塩基配列を決定した。制限酵素 *Nla*III による切断のパターンに変化が見いだされたので、患者家族を含む多数の血液 DNA を、PCR-RFLP 法により解析した。CYP27 の転写産物を白血球由来 RNA を使って検出する方法を確立し、患者および近親者血液の白血球中の異 CYP27mRNA を RT-PCR 法により検討した。apoE のイソフォームの検討にはすでに報告のある Hixson らの方法(*J.Lipid Res.* 1990)を、-491A/T 多型について Bullido らの方法(*Nature Genet.* 1998)を用いた。

(4) apoE、A β 40、A β 42、GFAP の定量すべてサンドイッチ ELISA 法によって測定した。標準曲線を得るため、市販のヒト血漿 apoE、ヒト大脳 GFAP および合成アミロイドペプチドを用いた。

(5) 脳脊髄液の生化学的検討

全蛋白質量、コレステロールおよびコレスタノール量は臨床生化学的に測定された。Mn²⁺-ヘパリン法(Puchois ら、*Clin. Chem.*1987)による沈殿物をオフアレルの 2 次元電気泳動法により展開し銀染色して、ゲルの apoE と apoA-I のスポット濃度を計測した。

(6) 統計処理

2 群間比較に *t*-検定、多群間比較に Bonferroni の correction による分散分析法、比率の比較に Mann-Whitney 検定、2 パラメーター間の関係に直線回帰法、2 対複数のパラメーター間の比較に χ^2 乗検定を用いた。

C. 研究結果

本 CTX 患者の CYP27 遺伝子の第 7 エクソンと第 7 イントロンのスプラスジャンクションの配列 GT が AT に変異していた。この変異は制限

酵素 *NlaIII* により切断されるようになることが塩基配列の検討の結果わかったので、患者家族の遺伝子を PCR-RFLP 法にて検討すると、すべてその変異に関してヘテロ接合体であった。患者白血球の *CYP27* の mRNA は RT-PCR 法による検討の結果、コントロールより短くなっていた。患者家族の白血球の *CYP27* の mRNA はコントロールと同様のものと、患者の異常 mRNA と同様のものの 2 種類が検出された。患者および家族の血清と患者の脳脊髄液中のコレステロールとコレスタノール量は患者のもののみ上昇していた。患者の脳 CT では低吸収領域が脳白質と小脳に見られた。リポ蛋白分画の 2 次元電気泳動法による分析と apoE 蛋白の定量の結果、アポリポ蛋白 A-I の apoE に対する比率が CTX 患者ではコントロールの約 4 倍に上昇していた。

コントロールの脳脊髄液中 β アミロイド(1-40/1-42)、apoE および GFAP はそれぞれの加齢変化は、(1) β アミロイド(1-40)は幼小児期は低く、20 才頃一番高く、それ以降じよじよに減少、(2) β アミロイド(1-42)濃度は類似の変化を示したが、それほど著明ではない、(3) apoE 濃度は幼小児期に一番高く、青年期に低い時期があり、中年期再び高くなり、以降じよじよに減少、(4) GFAP 濃度はあまり変化しなかったが加齢と共に上昇する傾向を示した。

β アミロイド(1-40)と(1-42)量は AD(981 \pm 409 pM、73.6 \pm 41.8 pM)とコントロール群(894 \pm 759 pM、139 \pm 202 pM)とに差はなかったが、 β アミロイド(1-42)の(1-40)に対する比率が上昇していた($p < 0.01$)。 β アミロイド(1-40)濃度は MMSE に対して正の相関を示した($p < 0.05$)。 apoE 量は AD 患者のほうが高値を示した(1.23 \pm 0.56 vs 0.836 \pm 0.55 μ g/ml, $p < 0.04$)。

MMSE とは早期発病型で負の直線的相関を示した($p < 0.0001$)。 GFAP 量は AD 患者の方が高かった(9.09 \pm 8.1 vs 3.69 \pm 1.4 ng/ml, $P < 0.001$)。 MMSE と直線相関はなかったが($p = 0.20$)、中-高度痴呆群(MMSE = 12 \pm 3)のほうが軽-中度痴呆群(MMSE = 21 \pm 3)より高値を示した($p < 0.05$)。 リポ蛋白分画の 2 次元電気泳動法による分析の結果、apoA-I の apoE に対する比率は AD のほうが、コントロールより低値であった(1.04 \pm 0.32 vs 0.70 \pm 0.29)。 京都府近隣在住の AD 患者においても *APOE4* の遺伝子頻度は約 3 倍ほど高かった(7.16、 $p < 0.03$)。 *APOE* の -491 位の多型では TT のホモ接合体頻度、-491T 対立遺伝子頻度が AD 群で高かった($p < 0.05$ 、 $p < 0.02$)。 期待頻度からのずれを比較すると、欧米では *APOE4* と -491T は連鎖不平衡にあるが、日本人ではこれらはハーディ・ワインバーグ平衡にあることが推定された。

D. 考察

劣性遺伝性の CTX はコレステロールの 27 位を水酸化する酵素 *CYP27* 遺伝子の突然変異により酵素機能が障害され、代謝産物が蓄積することによって生じるとされる。本患者の *CYP27* の点変異はスプライスジャンクションにあり、その mRNA はエクソン 7 を欠失していることが示唆された。実際、患者白血球より抽出した RNA を用いて *CYP27* の転写産物を解析し、エクソン 6 と 8 の融合を証明できた。患者の血液、髄液中のコレスタノールが上昇していた。患者は精神発育遅滞を示しているが、CT 所見と考え合わせると、脳と小脳にコレスタノールが蓄積している可能性が高い。コレステロール値は髄液でのみ上昇していた事実は、脳と末梢のコレステロール

代謝は独立しているというこれまでの研究結果を支持する。また、大脳の蓄積物中にはコレステロールも含まれていることを示唆する。CTX 患者大脳の病態発生にはコレステロールやコレスタノールという代謝産物の蓄積による細胞障害、脱髄が原因として考えうる。一方、PCR-SSCP 法、PCR-RFLP 法、RT-PCR 法の組み合わせにより、患者家族の *CYP27* 変異の状況を遺伝子診断し、両親、兄弟 2 人および姪 2 人がヘテロ接合体であることを確定したが、彼らの血液コレスタノール値は正常範囲であり、遺伝子量効果が見られなかった。これまで *CYP27* の酵素活性と mRNA の検査は肝と皮膚の biopsy という侵襲的方法しか行なわれておらず、私たちが検討した血液を用いる方法は臨床診断に役立つと考えられる。本患者で見いだされた *CYP27* の第 7 イントロン GT の AT への変異は日本では初めてのケースであるが、イタリアでは同様の変異が一例報告されている(Garuti ら、*J. Lipid Res.* 1996)。このケースでは知能は正常と報告されており、知能障害が進行性である本患者と異なる。このことは *CYP27* 以外の遺伝子か、あるいは何らかの環境要因が本症の表現型には強く影響を与えうることを示唆している。CTX 患者の脳脊髄液中の apoA-I の上昇は血液脳関門の破綻を示唆している。大脳血管の内皮細胞におけるコレステロール代謝異常が原因であろうが、今後の組織化学的検討が待たれる。

今回測定した 4 種類の蛋白質の脳脊髄液中濃度の加齢変化から、われわれは大脳実質の加齢変化の様子を以下のように推定している。(1) 幼小児期、神経細胞より産生されるβアミロイドはアストロサイトの分泌する apoE によって大脳より効果的に除去されているが、(2) 青年期以降で

は apoE 産生が減少し、一方βアミロイドは増加するので、この除去効率は相対的に減少する、(3) 老年期には神経細胞数は減少するので、βアミロイド産生は減少する一方、アストロサイトも崩壊減少しているため、apoE 産生も減少している。このような加齢変化を背景に、AD が何らかの要因によって発生すると、(1) βアミロイド(1-42) が相対的に上昇し、apoE を巻き込んで大脳実質に沈着、老人斑を形成し、(2) この沈着と神経細胞死により、細胞外βアミロイド量は AD の進行とともに減少するが、一方、(3) アストログリアも障害されるため、細胞外 GFAP 量は初期より高値を示し、(4) その後の反応性グリオシスのため、apoE 量は亢進する、というシナリオが考えられる。神経原線維変化の構成蛋白タウの脳脊髄液中濃度は AD の進行とともに上昇すると報告されているが、これは上記(2)の神経細胞死によるものとみられる。リポ蛋白分画の 2 次元電気泳動法による分析の結果、apoA-I はコントロールレベルに留まっている可能性が示された。アポリポ蛋白のなかでも大脳由来の apoE のみがユニークに変化しているものと考えられる。トランスジェニックマウスの実験より、apoE の発現はβアミロイド沈着に促進的に関与することはわかっている。βアミロイドは脳脊髄液中のリポ蛋白にも含まれており、apoE がこれを使ってβアミロイドを脳実質から除去しているのも事実である。青年期以降の apoE 濃度とβアミロイド濃度の解離はβアミロイドの大脳からの除去にとって重要なマイナス要因であるに違いない。apoE の機能としてのβアミロイドの除去効率など、今後詳細に検討する必要がある。今回私たちが見出した AD におけるβアミロイド(1-42)分子種のβアミロイド(1-40)に対する相対的上昇機構とし

て、プレセニリンの関与が最も疑われる。βアミロイド(1-42)濃度の加齢変化の背後にも、プレセニリンの発現量あるいは活性の加齢変化があるのかもしれない。apoE を中心とした脂質代謝とプレセニリンの関与するアミロイド代謝には深い関連があると類推される。今後さらに、これらとミトコンドリアのエネルギー代謝の関連の検討が重要となろう。

AD の発生初期において、神経細胞と同時にアストログリアも傷害されている可能性が高まった。孤発性の AD の発生機構は分かっていないが、それが何であれ、アストロサイトにも強く影響するものであることは、その本態を明かにする上で示唆に富んでいる。アストロサイトが障害されれば、興奮毒性物質であるグルタミン酸の細胞外濃度は上昇し、さまざまな神経栄養因子が減少すると考えら、神経細胞死を引き起こしうる。AD におけるアストロサイトの変化を今後詳細に検討すべきである。

私たちの AD 患者群も *APOE4* との関連が認められた。-491T も AD と関連する結果が得られたが、こちらについては、今後、患者数を増やして確認しなければならない。私たちの検討では一般人口でも *APOE4* と -491T が関連していたので、この両者はこれまで遺伝的に一緒に子孫へと分配されてきたことが推定される。広島大学のデータを解析しなおしてみると、同様の結果であった。ところが、欧米のレポートを検討したところ、欧米の人口では *APOE4* と -491T は関連していなかった。このことは欧米人では過去何らかの理由でこれらは連鎖不平衡になっていることを示しており、ハーディ・ワインバーグ平衡にある日本人とは対照的である。諸外国で示された -491A と AD の関連はこの連鎖不平衡によるもの

であって、*APOE* のプロモーター活性の多少と AD 発生の連関は乏しいと考えられる。

E. 結論

- (1) CTX の一症例は *CYP27* 遺伝子の第 7 イントロンの G→A 点変異によることを明かにした。
- (2) CTX の転写産物の解析に血液細胞を用いる非侵襲的方法を開発した。
- (3) AD の脳脊髄液における 3 因子の上昇、すなわち、βアミロイド(1-42)の(1-40)に対する比率の上昇、apoE 濃度のユニークな上昇、GFAP 濃度の上昇が AD には特徴的であることを示した。
- (4) 日本人では *APOEε4* と -491T が連鎖平衡にあることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shiga K, Fukuyama R, Kimura S, Nakajima K and Fushiki S.

Mutation of the sterol 27-hydroxylase gene (*CYP27*) results in truncation of mRNA expressed in leucocytes in a Japanese family with cerebrotendinous xanthomatosis.

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 67:675-677, 1999.

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K and Fushiki S.

Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subjects, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. European Neurol. (in press)

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S and Yanagisawa K.

Age-dependent change in the level of Aβ40 and Aβ42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of Aβ42 to Aβ40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. European Neurol. (in press)

2. 学会発表

滋賀健介、福山隆一、木村茂、中島健二、伏木信次

ステロール水酸化酵素遺伝子のスプライスドナ

一部位の G->A 点突然変異により mRNA
truncation をきたした脳腫黄色腫症家系の遺伝子
解析

第 34 回日本人類遺伝学会 1998 年 10 月 甲府

滋賀健介、中島健二、矢追毅、福山隆一、
伏木信次

リンパ球を用いた脳腫黄色腫症(CTX)家系の
CYP27 遺伝子転写産物の解析

第 39 回日本神経学総会 1999 年 5 月 20-22 日
東京

分担研究報告書

神経系細胞におけるコレステロール efflux 機構の解明

分担研究者 伊藤仁一 名古屋市立大学・医学部 生化学第一講座助教授

研究要旨 アストロサイトのコレステロール efflux 機構を endogenous apoE と exogenous apoAI を介して産生される HDL の分析および細胞内コレステロール輸送を検討することにより解析した。ラットアストロサイトは apoE を分泌し、細胞外に cholesterol-rich HDL を産生した。一方、脳の血管内皮細胞が産生すると考えられる外来性 apoAI にも反応し cholesterol-poor HDL を細胞外に産生すると同時に、細胞内 cholesterol pool が低下して ACAT によるコレステロールのエステル化が減少した。しかしながら、アストロサイトは apoAI に対し、繊維芽細胞に比べるときわめて低い反応性を示した。sphingomyelinase (SMase) で前処理されたアストロサイトは、apoAI-mediated cholesterol efflux が著しく増加し、SMase 処理細胞の細胞膜は特に caveolae-like domain で顕著な cholesterol content の減少が認められた。apoAI による cholesterol efflux は SMase 処理中が最も強く、ACAT-available cholesterol pool は SMase 処理後 apoAI 刺激で減少した。これらのことは SMase 処理で細胞膜 sphingomyelin (SM) が減少し、SM によって細胞膜での局在が制御されていたコレステロール分子の自由度が増加して、apoAI-mediated cholesterol efflux につながったものと考えられる。また、endogenous apoE-mediated cholesterol efflux は SMase により影響を受けなかった。これらの知見は endogenous apoE は exogenous apoAI とは異なる機構を介して cholesterol efflux を促進していることが示唆された。

A. 研究目的

中枢神経組織は体全体のコレステロールの約 20~30% を占める高コレステロール含有組織である。したがって脳内におけるコレステロール代謝は中枢神経細胞の維持のみならず、その機能発現にも極めて重要であることが考えられる。一般に末梢組織細胞におけるコレステロールの搬出・搬入は血中のリポタンパクとの相互作用を介して行われるが、血液脳関門によって隔絶された中枢神経組織はこのような相互作用は成り立た

ず、脳での特異的なコレステロール代謝および細胞間運搬機構の存在が考えられる。本研究は、血液脳関門によって隔絶された脳内におけるニューロンやアストロサイトのコレステロール代謝およびコレステロール運搬機構を理解することを目的として行われた。

B. 研究方法

(1) ラットアストロサイトの培養胎生期 17 日目のラット胎児脳より大脳を摘出し、血管、髄

膜除去、脳細片後、1% Triton X-100 溶液で処理して、10%FCS 含有 F-10 培地で1週間培養し、primary culture とした。この細胞を再度 1% Triton X-100 溶液で処理し、ピペッティング後 6-well multitray あるいは petri dish (直径 15cm)にはん種し、1週間 secondary culture し、実験に供した。

(2)cholesterol loading 3H-cholesteryl oleate とヒト LDL を CETP 存在下で反応して、3H-cholesteryl oleate/ LDL(3H-CE/ LDL) を調製した。3H-CE/LDL を serum 非存在下でラット アストロサイトに 24 時間投与してコレステロールを load した。

(3) 脂質分析 cholesterol (Cho), sphingomyelin(SM),phosphatidylcholine (PC) 合成には 3H-acetate で、さらに SM, PC の合成は ^{14}C -choline chloride を取り込ませてそれぞれの合成を分析した。また、細胞の Cho, SM, PC, CE 量についてはワコーのキットを用いて、酵素法により定量分析した。また培地中に分泌される HDL の分析は sucrose で培地の密度を 1.2 - 1.007 g/ml に調整し、48 時間 49,000 rpm で遠心し、各フラクションの密度と脂質分布を分析し密度 1.2 - 1.08 を HDL 画分とした。

C. 研究結果

ラットアストロサイトは自ら産生する apoE に依存して、主に SM, PC, Cho から成り、Cho content の高い HDL を細胞外に産生した。一方、アストロサイトは外来性 apoAI に反応して Cho-poor HDL を細胞外に産生すると同時に、細胞内 free Cho pool が低下して ACAT によるコレステロールのエステル化が減少した。アストロサイトの apoAI 反応性は繊維芽細胞に比べる

ときわめて低く、繊維芽細胞が 24 時間まで cholesterol efflux 作用が継続したのに対し、アストロサイトは約 8 時間で 停止した。

アストロサイトを sphingomyelinase (SMase)で前処理すると、caveolae-like domein の PC content はほとんど影響を受けなかったにもかかわらず、Cho content は著しく減少した。また、apoAI-mediated Cho efflux は SMase 処理により上昇した。apoAI による Cho efflux は SMase 処理中に最も強く、時間の経過と共に著しく減少した。ACAT-available Cho pool は SMase 処理後 apoAI 刺激により減少した。培溶液中に SM を添加すると、apoAI-mediated Cho efflux は抑制された。一方、SMase 処理されたアストロサイトは SMase 処理後 1 時間から細胞内での SM 合成が促進され、細胞内あるいは細胞膜での SM content の上昇が apoAI による Cho 搬出に強く影響を与えることが示唆されたラットアストロサイトは自ら産生する apoE に依存して、主に SM, PC, Cho から成り、Cho content の高い HDL を細胞外に産生した。一方、アストロサイトは外来性 apoAI に反応して Cho-poor HDL を細胞外に産生すると同時に、細胞内 free Cho pool が低下して ACAT によるコレステロールのエステル化が減少した。アストロサイトの apoAI 反応性は繊維芽細胞に比べるときわめて低く、繊維芽細胞が 24 時間まで cholesterol efflux 作用が継続したのに対し、アストロサイトは約 8 時間で 停止した。アストロサイトを sphingomyelinase (SMase)で前処理すると、caveolae-like domein の PC content はほとんど影響を受けなかったにもかかわらず、Cho content は著しく減少した。また、apoAI-mediated Cho efflux は SMase 処理により上昇

した。apoAI による Cho efflux は SMase 処理中に最も強く、時間の経過と共に著しく減少した。ACAT-available Cho pool は SMase 処理後 apoAI 刺激により減少した。培溶液中に SM を添加すると、apoAI-mediated Cho efflux は抑制された。一方、SMase 処理されたアストロサイトは SMase 処理後1時間から細胞内での SM 合成が促進され、細胞内あるいは細胞膜での SM content の上昇が apoAI による Cho 搬出に強く影響を与えることが示唆された。

D. 考察

アストロサイトの Cho efflux 機構を理解する目的で、スフィンゴミエリンの apoAI-mediated Cho efflux に及ぼす作用を研究した。本実験結果より SMase 処理で細胞膜 SM が減少すると、SMによって細胞膜での局在が制御されていたコレステロール分子の自由度が増加して、apoAI-mediated Cho efflux が上昇したのと考えられる。endogenous apoE に依存した Cho efflux は SMase 作用に影響を受けなかったことから、exogenous apoAI とは異なる機構を介して Cho efflux を惹起するものと考えられる。SMase 処理細胞の細胞膜は特に caveolae-like domain で顕著な Cho content の減少が認められた。このことは SMase が細胞膜でも特に Cho, SM-rich domain と考えられている caveolae-like domain の SM を特異的に消化することにより SM content を著しく低下させ、この領域のコレステロール分子の運動性を高めることが示唆された。こうした caveolae-like domain におけるコレステロール分子の自由度の上昇が apoAI-mediated Cho efflux 促進の driving force になりうるということが考えられ、apoAI との interaction

site (receptor) がこの caveolae-like domain あるいはこの近傍に存在することが示唆された。アストロサイトは繊維芽細胞に比べ、Cho efflux に関する apoAI 反応性が極めて低いことから、caveolae-like domain における sphingomyelin による cholesterol restriction が強いことが示唆された。

E. 結論

(1) アストロサイトは endogenous apoE により cholesterol-rich HDL を、また exogenous apoAI により cholesterol-poor HDL を細胞外に産生することがわかった。

(2) アストロサイトを sphingomyelinase (SMase) 処理すると、apoAI-mediated cholesterol efflux は上昇したが、endogenous apoE 依存性の cholesterol efflux は影響を受けなかった。(3) SMase 処理により、caveolae-like domain の cholesterol content が著しく減少した。phosphatidyl choline content は影響を受けなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hosono A, Tabuchi M and Ito J.
Effect of administration of lactic acid bacteria to pregnant rats in detoxifying Trp-P1 and brain weight gain by the fetus.
Animal Science and Technol. 69:1050-1054, 1998.

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. 72: 2362-2369, 1999.

Li W, Tada T, Miwa T, Okada N, Ito J, Okada H, Tateyama H and Eimoto T.
mRNA expression of complement components and regulators in rat smooth muscle cells.
Microbiol. Immunol. 43: 585-593, 1999.

Ito J and Yokoyama S.

Sialosylcholesterol induces regulation of astrocyte filament network.

Biochimica et Biophysica Acta. (in press)

2. 学会発表

伊藤仁一、張 力勇、横山信治

ラットアストロサイトによるコレステロール放出におけるリポタンパク質の役割

第 41 回日本神経化学会 9月 21-23 日 東京

伊藤仁一、張 力勇、横山信治

ラットアストロサイトが合成・分泌する apolipoprotein E のアストロサイトからの細胞脂

質搬出における役割 第 71 回日本生化学会 10月 14-17 日 名古屋