

---

平成 11 年度  
厚生省厚生科学研究費補助金（脳科学総合研究事業）

---

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

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 アミロイドβ蛋白 (Aβ) の異常凝集分子機構の解明を主軸とし、アルツハイマー病 (AD) 発症メカニズムを理解することを目的とする。本年度はこれまでの研究成果を踏まえ、seeding 活性をもつ特異な Aβ産生における細胞内コレステロールの役割を検討するとともに、AD 発症の原因、危険因子である presenilin、apolipoprotein E の病的意義を細胞生物学的に検討した。

分担研究者

|      |                          |
|------|--------------------------|
| 駒野宏人 | 長寿医療研究センター<br>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<br>生化学第一講座 教授 |

培養細胞(イヌ腎尿細管由来上皮細胞腫:MDCK細胞、マウス奇形芽細胞種:P19細胞)およびラット大脳皮質を実験対象にシヨ糖密度勾配遠心分離法等により細胞亜分画を行う。得られた画分に関して、DIG、細胞膜(bulk plasma membrane)に高濃度に発現することが知られているカベオリン、インテグリン等をマーカーに定量的評価を行うとともに、DIGに高濃度に存在するコレステロールやガングリオシド等の脂質分子の組成を直接的に評価した。P19細胞に関しては、薬剤投与によって神経細胞への分化誘導をかけた条件と非分化の条件の両者で検討し、APPの細胞内局在の神経細胞特異性の有無を検討した。以上の分画により得られたDIG画分を対象にAPPの局在を抗APP抗体を用いてウエスタンブロット法により検討した。

A. 研究目的

アルツハイマー病(AD)の患者数は増加の一途を辿っている一方で、本疾患の発症病態には不明の点が多く、未だ真に有効な治療法、予防法も確立していない。本研究は、AD成立の中核を老人斑を構成するアミロイドβ蛋白(Aβ)の異常凝集に求め、presenilinやapolipoprotein EというAD発症の原因および危険因子を導入した培養細胞病態モデル系を実験対象に、Aβ凝集開始の分子機構を明らかにすることを目的とする

(2) 細胞内 Aβ産生部位の検討

マウス神経芽細胞腫 Neuro2a を用い、IPTG (イソプロピル-β-D チオガラクトシド) 添加による導入 presenilin 遺伝子発現誘導系を対象とした。

B. 研究方法

(1) DIG における APP 局在の検討

A $\beta$ の検出は特異抗体による免疫沈降・ウェスタンブロット法を用い、A $\beta$ の細胞内産生部位の検討は、細胞内蛋白輸送を阻害する薬剤(monensin、brefeldin A)の投与や、小胞体(ER) retention signal やトランスゴルジ網(TGN) sorting signal を遺伝子工学的に付加して、それらのA $\beta$ 産生への影響を評価した。また、A $\beta$ のC末側の切断に関する検討を容易にする為、APPのA $\beta$ を含むC末側(C100)をコードする遺伝子を導入し、A $\beta$ のC末端切断のみでA $\beta$ が産生される細胞培養系を確立した。

### (3) ApoEによる神経細胞コレステロール代謝制御の検討

アストログリアが産生するApoEによって神経細胞がどのような脂質代謝制御を受けるのかを明らかにするため、培養神経細胞培地に<sup>14</sup>Cアセテートを加え、標識された細胞膜内の脂質分子がApoEによって細胞外に引き抜かれる過程を定量的に解析した。ApoEのアイソフォームによる脂質分子引き抜き効率の違いに関する検討は、リコンビナント・ヒトApoE(ApoE2、ApoE3、ApoE4)を用いた。また、コレステロール欠乏状態がもたらす神経細胞生物学的効果を検討する為、無血清培地で培養した神経細胞にコレステロール合成阻害剤(コンパクチン等)を投与し、神経突起の分枝・伸長、軸索内tauのリン酸化状態等を検討した。

### (4) ApoE含有リポ蛋白産生、分泌の分子機構の解明

ラット胎児脳より調整したアストログリア細胞培養系を実験対象に、細胞から培地中に分泌される脂質を放射線脂質標識法や酵素法による微量定量により測定した。またApoEやApoAIなどのアポリポ蛋白の脂質分子引き抜きの分子過程を詳細に検討する為、アストログリアが産生する

これらのアポリポ蛋白を含有する細胞外リポ蛋白と、細胞外から与えられたアポリポ蛋白が細胞膜に作用した結果形成された細胞外リポ蛋白の脂質組成を比較検討した。さらにアストログリアと神経細胞を共培養することで、アストログリアによるApoEの産生・分泌が神経細胞の共存によって、どのような影響を受けるのかを検討した。

## C. 研究結果

(1) DIGにおけるAPP局在の検討(柳澤)  
検討した全ての対象においてDIGにはAPPは検出されず、少なくともDIGが細胞内における主要なAPPの存在部位である可能性は否定的であると考えられた。一方、興味深いことに神経系においてはDIGとは異なるコレステロール高含有画分に、高分子量の成熟型と考えられるAPPが回収されることが明らかとなった。この画分中のコレステロール濃度はDIGにおける濃度よりも低く、細胞膜(bulk plasma membrane)における濃度よりも高い傾向を示し、またこの画分中にはDIGのマーカであるGM1ガングリオシドは検出されなかった。以上より、コレステロール高含有膜ドメインは少なくとも神経系においては多様であることが示唆された。

### (2) 細胞内A $\beta$ 産生部位の検討(駒野)

細胞内蛋白輸送阻害剤の使用ならびにA $\beta$ 前駆体に種々のシグナルを遺伝子工学的に付加することで、A $\beta$ の細胞内産生部位の特定を試みた。全長APPからのA $\beta$ 産生は、monensinとbrefeldin Aの両者によって抑制された。一方、C100からのA $\beta$ 産生はbrefeldin Aで抑制され、monensinでは抑制されなかった。またC100、全長APPの両者においてER retentionを付加することでA $\beta$ の産生は抑制された。一方、TGN sorting signalの付加は、この両者からのA $\beta$ 産生を促進

した。以上の結果を総合すると、APP からの A $\beta$  産生における  $\beta$ -cleavage は主に TGN 内で生じている一方、 $\gamma$ -cleavage はゴルジ装置から TGN までの広い範囲で生じていることが考えられた。

### (3) ApoE による神経細胞コレステロール代謝制御の検討 (道川)

神経細胞のコレステロール代謝 (コレステロール・ホメオスターシス) に対してアストログリアは ApoE を介して役割を演じていることは以前より想定されていたが、本研究により神経細胞表面からのコレステロール引き抜き (efflux) の効率に ApoE アイソフォーム別の違いがあり、ApoE2>ApoE3>ApoE4 の順であることが明らかとなった。また、神経細胞の生存および分化、機能維持におけるコレステロールの役割を検討した結果、コレステロール合成阻害剤の投与のよって、神経細胞からの樹状突起の発現が著しく抑制され、軸索の径も細くなり、免疫細胞化学的には抗チュブリン抗体の反応性が低下することが確認された。

### (4) ApoE 含有リポ蛋白産生、分泌の分子機構の検討 (横山)

アストログリアにより産生される ApoE は細胞内のリン脂質を結合させ、コレステロールをも含有する HDL 様のリポ蛋白を形成し細胞外に分泌されることが確認された。それに対して、細胞外に加えられた ApoE や ApoAI はコレステロールを含有しないリン脂質のみからなるリポ蛋白を形成した。スフィンゴミエリナーゼで細胞を処理すると後者のリポ蛋白にコレステロールが含有されるようになり、細胞膜内のコレステロール易移動性が ApoE によるコレステロール引き抜き (efflux) に大きく影響することが示唆された。

## D. 考察

APP の細胞内局在をコレステロール高含有ドメインとの関連で検討した結果、従来 DIG としてまとめられている一群の膜ドメインは均一ではなく多様であることが示唆された。最近、DIG には A $\beta$  が生理的に存在することが報告され、さらに DIG には A $\beta$  産生に関わる酵素活性が存在する可能性も指摘されていることから、APP は DIG に輸送された直後に切断を受け、A $\beta$  を産出する可能性が考えられた。一方、DIG には A $\beta$  が存在するにもかかわらず、seeding A $\beta$  は生理的に産生されないことから、A $\beta$  が DIG を構成する脂質分子と作用しあい特異な構造を獲得する為には、DIG の脂質組成の変化などが潜在している可能性が推察された。このことは AD 発症の最強の危険因子である ApoE の生理的機能がコレステロール輸送にあり、後述するように、神経細胞のコレステロール代謝への影響は ApoE のアイソフォームにより異なることを考えあわせると興味深いと考えられた。また、最近 A $\beta$  が GM1 ガングリオシドに結合し構造変化を獲得する過程は、GM1 ガングリオシドが存在する膜ドメイン内のコレステロールやスフィンゴミエリン等による脂質組成によって大きく影響されることが報告されており、本研究における知見と総合すると AD 脳における細胞膜脂質組成の検討は今後重要な課題であると考えられた。

APP からの A $\beta$  の産生 (切り出し) には 2 種のプロテアーゼの関与が想定されている。本研究によって、これらのプロテアーゼによる APP 切断の細胞内部位は絞りこまれたが、A $\beta$  の C 末側を切断するプロテアーゼは未同定である。今後、このプロテアーゼを特定すると同時に、presenilin 遺伝子異常がこれらのプロテアーゼ活性に与える効果を分子レベルで明らかにすることが重要であると考えられた。さらに、細胞内で異常に増

加した A $\beta$ がどのようなプロセスを経て、細胞外アミロイドの形成、ひいては細胞死を誘導するのかを解明することが最終的な課題であると考えられる。

AD 発症において ApoE2 は抑制的に働くのに対して、ApoE4 は促進的に働くことから、ApoE のコレステロール引き抜き作用の視点で、AD 発症における ApoE の役割を議論することも重要であると考えられた。また、神経細胞内のコレステロールを減少させることで、神経突起の伸長は大きく抑制されると同時に、微小管の脱重合をともなった tau の異常なリン酸化が確認され、AD 脳で認められる神経原線維変化の形成には神経細胞のコレステロール・ホメオスタシスの破綻が関わっている可能性が示唆された。

#### E. 結論

AD 脳内における A $\beta$ の異常凝集の分子機構を解明することを目的に、AD 発症危険因子を導入した病態細胞モデルを実験対象に研究を進めた結果、以下のことが結論づけられた。すなわち、A $\beta$ の一部は細胞内で産生された後に、コレステロールやガングリオシドに富む特異な膜ドメインである DIG に運ばれ、生理的には異常凝集することなく A $\beta$ は細胞外に排出されるのに対して、細胞内 A $\beta$ の異常増加ないしは細胞膜の脂質組成の変化等が存在する場合において A $\beta$ の一部はこれらの脂質分子の作用により構造変化を獲得し、その結果 seeding A $\beta$ が形成される可能性が考えられた。AD 発症危険因子である presenilin および ApoE は、それぞれ細胞内 A $\beta$ の異常増加および細胞内の膜脂質組成の変化をもたらす A $\beta$ の異常凝集を誘導しているものと考えられた。

#### 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.

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* 107:281-298,1999.

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.* 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  $\beta$ -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/ $\delta$ -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.

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.

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.

Leiter L.A., Hanna K and the Canadian Cerivastatin Study Group.

Efficacy and safety of cerivastatin in primary hypercholesterolemia: A long term comparative titration study with simvastatin.

Canadian Journal of Cardiology 15: 545-555,1999.

Saito K, Kobori K, Hashimoto H, Ito S, Manabe M and Yokoyama S. The epitope mapping for the anti-rabbit cholesteryl ester transfer protein monoclonal antibody that selectively inhibits triglyceride transfer. J. Lipid Res. 40: 2013-2021,1999.

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.

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of  $\gamma$ -secretase cleavage for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. Eur. J. Biochem. (in press)

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid  $\beta$ -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 subject, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. Eur. Neurol. (in press)

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

## 2. 学会発表

柳澤勝彦

Molecular mechanism underlying initiation of amyloid fibril formation.

International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics  
1999年9月11日 神戸

柳澤勝彦

Cholesterol-dependent generation of seeding

amyloid  $\beta$ -protein in cell culture.

第42回日本神経化学会 合同公開シンポジウム  
アルツハイマー病をどう治すか  
ー神経化学からのアプローチ  
1999年9月15日 広島

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  
本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠  
合成 amyloid  $\beta$ -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/ $\delta$ -catenin  
アイソフォームの発現解析 第42回日本神経化  
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回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広  
島

柳澤勝彦  
Seeding amyloid  $\beta$ -protein :そのコレステロール依  
存性と病的意義について  
第18回日本痴呆学会 シンポジウム アルツハイ  
マー病の分子機構 1999年10月6-8日 熊本

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/ $\delta$ -catenin mRNA の発現 第72回 日本  
生化学会 1999年10月8日 横浜

華 剛、須藤慎治、川村勇樹、柳澤勝彦、  
駒野宏人 プレセニリン1 ミスセンス変異によ  
って促進される $\gamma$ -セクレターゼ活性の細胞内存  
在部位について 第72回 日本生化学会 1999  
年10月9日 横浜

柳澤勝彦  
アルツハイマー病の病態  
ーアミロイド $\beta$ 蛋白を中心にー  
第115回日本医学会シンポジウム  
1999年12月2日 東京

道川 誠

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 1999 年 5 月 15-17 日 東京

鈴木章古、富本茂裕、山田義明、後藤章友、堀尾亨、伊藤重範、伊藤誠、堂前純子、横山信治  
マウス単球白血病由来株 RAW264 におけるアポリポ蛋白 A-I 依存性コレステロール搬出機構 - A キナーゼ活性化と W5、W7 による反応性の増強 - 第 63 回日本循環器学会学術集会 1999 年 3 月 27 日 東京

横山信治 高脂血症と冠状動脈疾患 (プレナリセクション II、代謝疾患と冠状動脈疾患 - なにをどこまでコントロールするか? -) 第 63 回日本循環器学会学術集会 1999 年 3 月 28 日 東京

小島和寿、堂前純子、鈴木佳克、村上勇、鈴木薫、横山信治 末梢細胞に於ける高密度リポ蛋白 (HDL) の産生機構に対するエストロゲン及びプロゲステロンの影響 第 51 回日本産婦人科学会学術講演会 1999 年 4 月 12 日 東京

荒川礼二郎、堂前純子、横山信治  
THP-1 細胞に於ける apoA-I 依存性 HDL 新生反応に対応した細胞内コレステロール輸送系の分化誘導 第 41 回日本脂質生化学研究会・研究集会 1999 年 6 月 4 日 鎌倉

荒川礼二郎、堂前純子、横山信治  
THP-1 細胞に於ける apoA-I 依存性 HDL 新生反応に対応した細胞内コレステロール輸送系の分化誘導 第 31 回日本動脈硬化学会総会 1999 年 6 月 24 日 宮崎

横山信治、小堀樹一郎、斉藤和典、真鍋満久  
トリグリセリド転送を選択的に阻害する抗 CETP 単クローン抗体 14-8F の conformational epitope の決定 第 31 回日本動脈硬化学会総会 1999 年 6 月 25 日 宮崎

伊藤仁一、長安裕子、横山信治  
スフィンゴミエリン分解によるラットアストロサイトのアポリポ蛋白 A-I 依存性コレステロール放出の増加 第 42 回日本神経化学学会大会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

上野幸子、伊藤仁一、長安裕子、横山信治  
中枢神経系細胞によるアストロサイトのコレステロール代謝の制御 第 42 回日本神経化学学会大会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

富本茂裕、臼井真一、野路久仁子、岡崎三代、横山信治  
血漿 HDL 産生メカニズムに関する研究: アポリポ蛋白による細胞内コレステロール搬出機構の生理的役割 第 72 回日本生化学会大会 1999 年 10 月 8 日 横浜

富本茂裕、辻田麻紀、多田豊曠、臼井真一、岡崎三代、伊藤誠、横山信治  
細胞内コレステロール搬出機構の臓器脂質への影響: probucol 投与 LCAT ノックアウトマウスを用いて 第 72 回日本生化学会大会 1999 年 10 月 8 日 横浜

荒川礼二郎、浅井三千代、堂前純子、横山信治  
THP-1 細胞に於ける apoA-I 依存性 HDL 新生反応に対応した細胞内コレステロール輸送系に於ける caveolin の役割 第 72 回日本生化学会大会 1999 年 10 月 8 日 横浜

張力勇、伊藤仁一、長安裕子、横山信治  
ラットアストロサイト-マ GA-1 のアポリポ蛋白 A-I 反応性とコレステロール放出 第 72 回日本生化学会大会 1999 年 10 月 8 日 横浜

伊藤仁一、長安裕子、横山信治  
ラットアストロサイトのコレステロール放出に於けるスフィンゴミエリンの役割 第 72 回日本生化学会大会 1999 年 10 月 8 日 横浜

上野幸子、伊藤仁一、長安裕子、横山信治  
アストロサイト分化とステロール代謝平衡 第 72 回日本生化学会大会 1999 年 10 月 9 日 横浜

横山信治  
HDL 新生反応の細胞生物学的機序と血漿 HDL 濃度の制御 (シンポジウム 9、HDL 代謝一過去・現在・未来一) 平成 11 年度日本動脈硬化学会冬季大会 1999 年 11 月 26 日 大阪

辻田麻紀、富本茂裕、臼井真一、野路久仁子、岡崎三代、横山信治  
血漿 HDL 産生メカニズムに関する研究: アポリポ蛋白による細胞内 cholesterol 搬出機構の役割 平成 11 年度日本動脈硬化学会冬季大会 1999 年 11 月 26 日 大阪

堂前純子、鈴木章古、伊藤誠、横山信治  
アポリポタンパク質 A-I による細胞コレステロール搬出機構の解析 平成 11 年度日本動脈硬化学会冬季大会 1999 年 11 月 26 日 大阪

本茂裕、辻田麻紀、多田豊曠、白井真一、  
岡崎三代、伊藤誠、横山信治  
細胞内コレステロール搬出機構の臓器脂質への  
影響: probucol 投与 LCAT ノックアウトマウスを  
用いて 平成 11 年度日本動脈硬化学会冬季大会  
1999 年 11 月 26 日 大阪

荒川礼二郎、浅井三千代、堂前純子、横山信治  
ApoA-I により新生する HDL へのコレステロール  
組み込みは caveolin に依存する 平成 11 年度日  
本動脈硬化学会冬季大会 1999 年 11 月 26 日 大  
阪

Hua G, Sudoh S, Kawamura Y, Yanagisawa K and  
Komano H.  
Intracellular site of A $\beta$ 42- $\gamma$ -secretase cleavage  
enhanced by presenilin1 mutation.  
29th Society for Neuroscience Annual  
Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Kawamura Y, Fan Q-W, Hayashi H, Michikawa M,  
Yanagisawa K and Komano H. Expression of the  
gene for  $\delta$ -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  $\beta$ -  
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 glycoprotein-rich  
microdomains. 29th Society for Neuroscience Annual  
Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, Ota A and Yokoyama S.

Change in cholesterol metabolism in rat astrocytes by  
differentiation.  
29th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
October 25, 1999, Miami Beach, USA.

Ito J, Nagayasu Y, Ota A and Yokoyama S.  
A role of sphingomyelin in regulation of cholesterol  
release by apolipoprotein from rat astrocytes.  
29th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
October 26, 1999, Miami Beach, USA.



分担研究報告書

アミロイドβ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 痴呆疾患研究部部長

研究要旨 Aβ産生と細胞内コレステロールとの関連を検討する為、Aβの前駆体である APP の細胞内局在を細胞亜分画により詳細に検討した。その結果、細胞内にあってコレステロールを多く含む膜ドメインである DIG には APP が検出されず、DIG が APP の主要な存在部位である可能性は否定的であると考えられた。一方、神経系においては DIG とは異なるコレステロール高含有ドメインに成熟型 APP が選択的に存在することが確認され、APP の生理機能ならびに代謝に細胞内コレステロールが影響している可能性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度までの研究において、細胞内のコレステロールに依存して可溶性 Aβの凝集を促進する作用をもつ特異な Aβ (seeding Aβ) が産生されることを明らかにした。我々の研究以外にも APP の代謝ならびに Aβ輸送に細胞内コレステロールの変動が影響することが最近報告されている。本研究は、上記 seeding Aβの産生におけるコレステロールの役割を、前駆体の細胞内局在から明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 細胞培養：ヒト APP 遺伝子を導入した、イヌ腎尿細管由来の上皮細胞 (MDCK 細胞、Dr. Haass 恵与) およびマウス奇形芽細胞腫 (P19 細胞、Dr. Fukuchi 恵与) を 10%牛胎児血清含有の DMEM 培地で培養した。またヒトの神経芽細胞腫である SH-SY5Y 細胞を 10%牛胎児血清含

有の DMEM/Ham's F-12 培地で培養した。P19 細胞はレチノイン酸を投与し神経細胞へ分化させ、acetylcholinesterase 活性測定ならびに神経細胞抗体を用いた免疫細胞化学により神経細胞への分化を確認した。

(2) 細胞亜分画：細胞を PBS buffer で洗浄後、1%Triton X-100、Dnase、蛋白分解酵素阻害剤含有の MES buffer/ 生食中で Teflon-glass homogenizer を用いてホモジナイズした。得られたホモジネートをショ糖密度勾配遠心分離 (100,000xg、18-20 時間) に供した。遠心後、チューブの上端より 1ml ずつ分画し生化学的解析に供した。

(3) ウェスタンブロット

細胞亜分画により得られた各画分について、ウェスタンブロットのより蛋白解析を行った。ウェスタンブロットには、抗 APP 抗体、抗カベオリン抗体、抗インテグリン抗体を用い、また GM1 ガ

ングリオシドの検出には HRP 標識のコレラ毒素を用いた。

#### (4) コレステロール測定

得られた画分中に含まれるコレステロールは、試料を hexan/ isopropanol 混液に浸透し脂質を抽出した。抽出液を乾燥後、再度 isopropanol 液に溶解させこコレステロール測定キット (Kyowa, Tokyo) を用いて、コレステロール量を測った。

### C. 研究結果

はじめに MDCK 細胞を対象に、APP の細胞内局在について Triton X-100 可溶性画分と同不溶性画分中の APP 含量を検討した結果、APP は Triton X-100 可溶性画分に回収された。また、MDCK を対象に行ったシヨ糖密度勾配遠心分離によって得られた画分において APP は高密度の画分のみで回収された。以上を総合すると、APP は通常の細胞膜 (bulk plasma membrane) に存在し、DIG には存在しないことが示唆された。MDCK 細胞以外にも P19 細胞、ラット大脳皮質を用いて同様の検討を行ったが、APP の主な局在部位はやはり細胞膜であることを示唆する結果が得られた。興味深いことに、P19 細胞 (神経細胞への分化の前および後)、SH-SY5Y 細胞、およびラット大脳皮質においては、成熟型と考えられる高分子量の APP がシヨ糖密度勾配遠心分離により得られた分画において細胞膜よりは低密度の画分に回収された。この成熟型 APP が回収される画分中のコレステロールおよび GM1 ガングリオシドを測定したところ、両者とも DIG よりも低く、細胞膜よりも高い傾向を示した。この結果は、コレステロール高含有膜ドメインは DIG のみでなく多様であることを示唆していると同時に、成熟型 APP のみがこの特異な膜ドメ

インに回収されたことから、APP の機能の発現には細胞内コレステロールが関与している可能性が考えられた。

### D. 考察

APP 代謝や A $\beta$ 輸送が細胞内コレステロールに影響されることを示す実験事実が最近集積されている。DIG は細胞内にあってコレステロールを多く含有し、多数のシグナル伝達分子が存在すること、また A $\beta$ やプリオン蛋白の構造変化を誘導するアンチシャペロン分子が DIG に局在すること等から、APP や A $\beta$ の代謝との関連で研究が盛んに進められている。APP の DIG における局在に関しては、これまでの研究報告の結果は一致していない。この原因としては、実験に用いた細胞の種類が同一ではないこと、また DIG の調整方法ならびにその評価法が研究者によって多様であることが考えられる。本研究においては、そのような実験手技による混乱を回避する為に、複数の細胞種ならびにラット大脳皮質を対象とし、DIG の評価は単にマーカー蛋白のウエスタンブロットに頼るのではなく、脂質組成を直接的に解析した。本研究により少なくとも DIG が APP の主要な局在部位ではないことが明らかとなった。今回の結果と、DIG には A $\beta$ の産生に関わる酵素活性が存在すること、さらに生理的に DIG に A $\beta$ が存在することを総合的に考えると、APP は DIG に運ばれた直後に切断をうけ A $\beta$ が産生される可能性がある。上述したように A $\beta$ は DIG 内で GM1 ガングリオシドと結合し構造変化を獲得する可能性を先に我々は報告した。生理的に A $\beta$ が DIG に A $\beta$ が存在するにもかかわらず、GM1 結合型 A $\beta$ は生理的には存在していないことから、AD 脳にはこれらの両分子の結合を促進する何等かの

膜脂質組成上の変化が存在するものと考えられる。

#### E. 結論

培養細胞ならびにラット大脳皮質を対象に検討した結果、APP は DIG には検出されず、DIG とは異なるコレステロール高含有の特異な膜ドメインに成熟型 APP が選択的に存在することが確認された。A $\beta$ の産生を含めた APP の代謝および機能発現には細胞内コレステロールが深く関わっていることが推察された。

#### 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.

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* 107:281-298,1999.

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.* 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  $\beta$ -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/ $\delta$ -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 culuter. *J. Neurochem.*74:1008-1016, 2000.

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of  $\gamma$ -secretase cleavage for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur. J. Biochem.* (in press)

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.  
A possible model of senile plaques using synthetic amyloid  $\beta$ -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 subject, and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Eur. Neurol.* (in press)

##### 2. 学会発表

柳澤勝彦  
Molecular mechanism underlying initiation of amyloid fibril formation.  
International Symposium on Dementia from Molecular Biology to Therapeutics  
1999年9月11日 神戸

柳澤勝彦  
Cholesterol-dependent generation of seeding amyloid  $\beta$ -protein in cell culture.  
第42回日本神経化学会 合同公開シンポジウム  
アルツハイマー病をどう治すか -神経化学からのアプローチ- 1999年9月15日 広島

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回日本神経化学会 1999年9月15-17日 広島

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠  
合成 amyloid  $\beta$ -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/ $\delta$ -catenin アイソフォームの発現解析  
第 42 回日本神経化学会 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 回日本神経化学会 1999 年 9 月 15-17 日 広島

柳澤勝彦 (Seeding amyloid  $\beta$ -protein : そのコレステロール依存性と病的意義について)  
第 18 回日本痴呆学会 シンポジウム アルツハイマー病の分子機構 1999 年 10 月 6-8 日 熊本

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/ $\delta$ -catenin mRNA の発現 第 72 回日本生化学会 1999 年 10 月 8 日 横浜

華 剛、須藤慎治、川村勇樹、柳澤勝彦、駒野宏人  
プレセニリン 1 ミスセンス変異によって促進される  $\gamma$ -セクレターゼ活性の細胞内存在部位について 第 72 回日本生化学会 1999 年 10 月 9 日 横浜

柳澤勝彦 アルツハイマー病の病態 -アミロイド  $\beta$  蛋白を中心に-  
第 115 回日本医学会シンポジウム 1999 年 12 月 2 日 東京

Hua G, Sudoh S, Kawamura Y, Yanagisawa K and Komano H. Intracellular site of A $\beta$ 42- $\gamma$ -secretase cleavage enhanced by presenilin1 mutation. 29th Society for Neuroscience Annual Meeting, October 23-28, 1999, Miami Beach, USA.

Kawamura Y, Fan Q.-W, Hayashi H, Michikawa M, Yanagisawa K and Komano H. Expression of the gene for  $\delta$ -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  $\beta$ -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

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-セクレターゼによる切断が高まることが明かとなってきている。しかしながら、γ-セクレターゼについてはその実体および細胞内局在は依然不明である。本年度は、昨年度に引き続き、*PS1* ミスセンス変異による Aβ42 産生増加機構を解析することを目的に、γ-セクレターゼの細胞内存在部位をさらに詳細に解析した。その結果、Aβ1-40 および Aβ1-42 の産生に必要なγ-セクレターゼ活性はどちらもゴルジ体およびトランスゴルジ網に存在することが示唆された。

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きた。

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、β-セクレターゼ、γ-セクレ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。β-セクレターゼについては、最近、同定され、その局在も明らかにされたが、γ-セクレターゼについてはその実体および細胞内局在は依然不明である。我々のこれまでの研究により、変異 *PS1* は Aβ42 産生に必要な 42 特異的セクレ

ターゼによる切断を高めることが明らかとなっている。

本研究では、*PS1* ミスセンス変異による Aβ42 産生増加機構を解析することを目的に、昨年度に引き続き、γ-セクレターゼの細胞内存在部位をさらに詳細に解析した。Aβの N 末端からはじまる APP の C-末端 100 アミノ酸 (C100)を細胞内に発現させるとγ-セクレターゼの切断だけで Aβが生成される。したがって、C100 から生成される Aβ 産生部位はγ-セクレターゼ活性の細胞内存在部位を反映することになる。我々は、このことを利用し、C100 からの Aβの細胞内産生部位を明らかにすることにより、γ-セクレターゼ活性の細胞内存在部位を解析した。

B. 研究方法

[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、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 Neuro 2a を樹立しこれを用いた。

[ A $\beta$ の検出 ]A $\beta$ 1-40、A $\beta$ 1-42 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。

[  $\gamma$ -セクレターゼ活性の検出 ]C100 を細胞内に発現させ、C100 からの A $\beta$ 細胞内産生部位を解析して検出した。A $\beta$ 産生部位については、細胞内分泌輸送を抑制する薬剤処理の影響、および、C100 に遺伝子工学的に細胞内オルガネラへの *sorting signal* を付加させ、その A $\beta$ 産生への影響を解析した。細胞内分泌輸送を抑制する薬剤として 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(TGN:*trans-Golgi network*)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。

プラスミド-C100 をコードする遺伝子を含むプラスミド pcDNA-C100 を構築した。ER(小胞体) retention signal を付加した APP および C100 として、その C 末端から 2 番目および 3 番目のアミノ酸をリジンに変えたものをコードするプラスミド pcDNA-APP\*KK および pcDNA-C100P\*KK を作製した。また、TGN *sorting signal* として、TGN マーカー蛋白である TGN38 の TGN *sorting signal*、SDYQRL を付加した pcDNA-APP\*SDYQRL および pcDNA-C100P\*SDYQRL を作製した。

## C. 研究結果

1)ミスセンス変異 *PS1* の誘導により C100 からの A $\beta$ 1-42 産生が増加したが、A $\beta$ 1-40 の産生は変化がなかった。この結果は、全長 APP からの A $\beta$ 産生におよぼすミスセンス変異 *PS1* の効果と同じであった。

2)C100 からの A $\beta$ 産生について蛋白輸送阻害剤の効果調べ $\gamma$ -セクレターゼ活性の細胞内存在部位を推定した。C100 からの A $\beta$ 1-42 および A $\beta$ 1-40 の産生は、brefeldin A(BFA)処理で抑制され、monensin 処理では抑制されなかった。一方、全長 APP からの A $\beta$ 1-42/40 の産生は、BFA、monensin、どちらの処理でも抑制された。全長 APP からの A $\beta$ 産生は、 $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼの二つのプロテアーゼによる切断が必要である。したがって、monensin 処理の効果が、C100 と APP とで異なった理由が、 $\beta$ -セクレターゼ活性が monensin によって阻害されるためである可能性があったので、それを実験的に調べた。方法は、APP から細胞内で産生される C100 について、monensin の効果を調べた。その結果、 $\beta$ -セクレターゼ活性が monensin によって阻害されることがわかった。

3) 次に、薬剤の二次的な効果を除外するため、上記の蛋白輸送阻害剤を用いた実験に加え、遺伝子工学的に C100 に細胞内オルガネラへの *sorting signal* を付加させ解析した。まず、BFA の結果を確認するため、C100 に ER retention signal を付加させた。その結果、ER retention signal を付加させると、A $\beta$ 1-42/40 どちらの産生も劇的に減少した。また、APP に ER retention signal を付加させた場合も同様な結果が得られた。この結果は、BFA の結果をよく支持するものであった。

次に、ゴルジ体への sorting signal は現在不明なので、ゴルジ体以降のオルガネラとして、TGN への sorting signal 付加させ、その影響を調べた。その結果、TGN sorting signal を付加した C-100 からの A $\beta$ 1-42/40 産生は上昇することがわかった。APP に同様の sorting signal を付加させても、A $\beta$ 1-42/40 の産生が上昇した。この結果は、 $\gamma$ -セクレターゼ活性がトランスゴルジ網にも存在することを強く示唆するものである。

#### D. 考察

まず、C100 からの A $\beta$ 産生に必要な $\gamma$ -セクレターゼ活性も全長 APP の場合と同様に変異 *PS1* の影響を受けることを確認した。次に、C100 からの A $\beta$ 産生について、蛋白輸送阻害剤 BFA の影響および ER retention signal を用いた解析から、 $\gamma$ -セクレターゼ活性は小胞体にはないことが明らかとなった。また、蛋白輸送阻害剤 monensin の実験から、 $\gamma$ -セクレターゼはゴルジ体中存在することが示唆され、さらに、TGN sorting signal を用いた解析から、トランスゴルジ網にもその活性が存在することが示唆された。

#### E. 結論

本研究により、A $\beta$ 1-40 および A $\beta$ 1-42 の産生に必要な $\gamma$ -セクレターゼ活性はどちらもゴルジ体およびトランスゴルジ網に存在することが示唆された。 $\beta$ -セクレターゼは、最近、同定され、ゴルジ体およびエンドソームに局在する事が明らかにされた。本研究の結果とを考えあわせると、A $\beta$ の細胞内産生部位は複数あると考えられる。すなわち、ゴルジ体は、APP が $\beta$ -及び $\gamma$ -セクレターゼのどちらの切断も受ける部位であり A $\beta$ の産生部位の一つである。また、それ以外の A $\beta$ 産生経

路として、APP が何らかの機構でトランスゴルジ網およびエンドソームへと輸送され A $\beta$ が産生されると考えられる。今後は、変異 *PS1* は、どの A $\beta$ 産生経路に存在する 42 特異的 $\gamma$ -セクレターゼ活性を促進するかということ明らかにするとともに、 $\gamma$ -セクレターゼ活性の実体を明らかにし、変異 *PS1* による A $\beta$ 42 産生増加機構を分子レベルで詳細に解析する必要があると思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Komano H, Sudoh S, Kawamura Y, Wang R and Yanagisawa K. Implication of *presenilin 1* mutations in Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 107, 281-298,1999.

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. *Biochimica et Biophysica Acta* 1426, 468-474,1999.

Komano H, Rockwell N, Wang G.T., Krafft G. A. and Fuller R. S. Purification and characterization of a yeast glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl protease, Mkc7p. *J. Biol. Chem.* 274, 24431- 24437,1999.

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 armrepeat protein/ $\delta$ -catenin in rodent neurons and glial cells. *Neuroscience Letters* 277, 185-188,1999.

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of  $\gamma$ -secretase cleavage for A $\beta$ 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur. J. Biochem.* (in press)

##### 2. 学会発表

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/ $\delta$ -catenin  
アイソフォームの発現解析 第42回 日本神経化  
学会 1999年9月15-17日 広島

華 剛、須藤慎治、川村勇樹、柳澤勝彦、  
駒野宏人 プレセニリン1ミスセンス変異によ  
って促進される $\gamma$ -セクレターゼ活性の細胞内存  
在部位について 第72回 日本生化学会 1999  
年10月9日 横浜

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/ $\delta$ -  
catenin mRNAの発現 第72回 日本生化学会  
1999年10月8日 横浜

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

Hua G, Sudoh S, Kawamura Y, Yanagisawa K and  
Komano H.  
Intracellular site of A $\beta$ 42- $\gamma$ -secretase cleavage  
enhanced presenilin 1 mutation.  
29th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
October 23-28, 1999, Miami Beach, Florida USA.



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 神経系細胞の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搬出し、HDL 様の粒子を形成するが、このようにして形成された粒子の受容体に対する affinity は apoE2 < apoE3 < apoE4 であった。昨年度の結果と併せると、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。一昨年度、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。昨年度はさらに 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ことを明らかにした。今年度は、昨年度明らかにした 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 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。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 [<sup>14</sup>C]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 量をウエスタンプ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ン：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 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。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。本年度はさらに、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。昨年度の結果とあわせ、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 を形成するが、この HDL は神経細胞の受容体に対して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  $\beta$ -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  $\beta$ -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/ $\delta$ -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  $\beta$ -protein and rat glial culture. Exp. Neurol. (in press)

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

### 2. 学会発表

磯部 一郎、柳澤勝彦、道川 誠  
合成 amyloid  $\beta$ -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 回日本神経化学会 1999 年 9 月 15-17 日  
広島

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 回日本神経化学会 1999 年 9 月 15-17 日  
広島

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 1999 年 5 月 15-17 日 東京

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.