

分担研究報告書

アポリポ蛋白質Eの構造・機能と中枢神経系に於けるコレステロール代謝の研究

主任研究者 横山信治 名古屋市立大学医学部生化学第一講座教授

研究要旨 $A\beta$ 産生と細胞内コレステロールとの関連を検討する為、 $A\beta$ 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

血漿リポ蛋白質によるコレステロールの細胞外輸送系から血液脳関門によって隔てられた中枢神経系に於ける細胞外コレステロール輸送には、多くの特殊な側面があると考えられる。近年、脳実質細胞によるアポリポ蛋白質Eの生合成やアポEに親和性を持つリポ蛋白質受容体様膜蛋白質の存在などが明らかにされ、またアルツハイマー病や脳外傷後遺症などの痴呆性疾患に於けるアポEの自然変異体 E4 の発症の危険因子としての役割が臨床疫学的に注目されるに至って、脳に於けるこの蛋白質の機能が注目を集めるようになった。この研究プロジェクトでは、中枢神経系に於ける細胞外脂質・コレステロール輸送に於けるアポEの役割の解明とそれに基づくアポEの痴呆性疾患発現機序に於ける関わりについて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

ラット胎児脳より分離培養したアストロサイトをを用いた。細胞から培地中へのコレステロール・磷脂質の分泌はアポリポ蛋白質存在下などで放射標識脂質や酵素法による微量定量により測定した。また培養液の密度勾配超遠心による分析により HDL の新生とその組成を解析した。細胞内や培養液中のアポEはイムノブロット法で、その mRNA は RT-PCR により分析した。

C. 研究結果

アストロサイトはアポEを分泌し、培地中では細胞磷脂質と結合してコレステロールを含む HDL となっているのに対し、アポA IやアポEを外部から加えるとコレステロールを含まない磷脂質による HDL が新生する。細胞をスフィンゴミエリナーゼで処理をすると後者の HDL にコレステロールが含まれるようになり、これは

形質膜のコレステロールの易移動性が増加するためであることが示された。

一方、単独で一ヶ月培養したアストロサイトと神経細胞存在下で同じ期間培養したものを比べると、後者ではアポEの合成・分泌が10倍近くに増加してHDL分泌量も増加し、他のコレステロール代謝パラメータも変化した。この変化は共培養の培養液をアストロサイトに加えるだけで認められ、抗酸性FGFによって抑制された。

D. 考察

アストロサイトによるHDL分泌は脳組織内部での細胞内外のコレステロール輸送と代謝回転に重要な意味を持つことがさらに明らかになってきた。また、その機序につ

いての理解も前進した。さらに神経細胞がアストロサイトのコレステロール代謝に大きく影響を与えることが次第に明らかになっており、神経細胞がその生存・成長をアストロサイトに依存していることを示している。これは中枢神経系形成あるいは障害修復機転における細胞間応答のシステムとして重要な役割を果たしていると考えられる。これらの点から、中枢神経系に於ける細胞間ステロール輸送システムの生理的・病態生理的機能についてさらに研究を深める方針である。

E. 結論

ラット胎児アストロサイトは内因性アポE-コレステロール含有HDLと外因アポA I/E-コレステロール非含有HDLを新生し、脳組織の細胞内外のコレステロール輸送にそれぞれ特有の役割を持つものと推定される。後者のコレステロール含有量は形質細胞のスフィンゴミエリン-コレステロールに富んだドメインの機能に依

存する。アストロサイトは神経細胞にตอบสนองしてアポE合成を始めとするコレステロール代謝関連遺伝子を発現し、神経細胞の要求に応じてコレステロールを供給するシステムを立ち上げている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

LA Leiter, K Hanna 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.

Ito J and Yokoyama S.

Sialosylcholesterol induces reorganization of astrocyte filament network.

Biochim. Biophys. Acta (in press)

2. 学会発表

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質 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(プレナリセッション 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、
鈴森薫、横山信治
末梢細胞に於ける高密度リポ蛋白質 (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、齊藤和典、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
サイトのアポリポプロテイン 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:アポリポ蛋白質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
質 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
ポ蛋白質による細胞内 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、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 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

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.