

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

中枢神経細胞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

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成 13 (2001) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- 中枢神経細胞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 —— 1
道川 誠

II. 分担研究報告書

1. 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 —— 6
道川 誠
2. 神経系細胞におけるコレステロール *efflux* 機構の解明 —— 10
伊藤仁一
3. 遺伝性脳腱黄色腫症と進行性外眼筋麻痺の遺伝子異常の検討およびミトコンドリア DNA 欠失株細胞の作製とその脂質代謝異常・酸化ストレス高感受性について —— 14
福山隆一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 —— 18

IV. 研究成果の刊行物・別刷 —— 19

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

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神経細胞の機能と構造におけるコレステロールの果たす役割の解明と、神経細胞内コレステロール代謝に対するアミロイドβ蛋白の影響の検討、②コレステロール搬出機構の細胞内メカニズムの検討③疾患検体におけるコレステロールおよび関連蛋白の解析を行った。その結果、コレステロール量の低下によりタウのリン酸化が亢進すること、アミロイドβ蛋白が神経細胞内コレステロール代謝を乱しその量を低下させることが明らかになった。また神経細胞へのコレステロール供給源としてのアストロサイトにおける HDL 形成は、cyclophilin A と caveolin 1 との機能的協調作用によるコレステロールの小胞体 から細胞質への translocation により制御されることが明らかになった。更にミトコンドリアにおけるエネルギー代謝異常が神経系の脂質代謝障害および細胞死をもたらすことを確認した。

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 助教授
伊藤仁一	名古屋市立大学 医学部第一生化学 講師

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。

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

B. 研究方法

神経系細胞（アストロサイトおよび神経細胞細胞）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 Aβの効果を搬出作用の側面から検討する系の確立および解析、（2）コレステロール量を減少させた神経細胞培養系における形態変化と関

連分子の解析、(3) 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、(4) ミトコンドリア機能異常細胞における脂質および関連蛋白の変化を解析のための細胞株の確立およびそれらの脂質解析をおこなった。

C. 研究結果

A β が細胞内コレステロール量の低下を誘導し、細胞内コレステロール量の低下がタウのリン酸化を招く 先に我々は、神経細胞においては非神経細胞と異なりコレステロール量が生存に重要な働きをすることを見いだした。今回はコレステロール量の低下が生存に影響を与えない範囲に押さえた系で神経細胞の形態および関連分子の解析を行った。その結果、コレステロール量が約半分に減少すると細胞の生存には影響を与えないものの、アルツハイマー病病理に特徴的は変化の一つであるタウのリン酸化を誘導することを見いだした。この変化には軸索における微小管の脱重合を伴っていた。次に、アミロイドカスケードの上にこの現象を位置づけられないかと考え、合成 A β の神経細胞内コレステロール代謝に対する影響を検討した。その結果、A β の重合体が神経細胞に働き、コレステロールおよびリン脂質を引き抜き HDL を形成すること、そのサイズは通常の HDL の 2 倍の大きさを持ち、しかも細胞への再取り込みされないことが明らかになった。また A β は最終的に細胞内コレステロール量を減少させることを見いだした。これらの結果は、凝集 A β が神経細胞内コレステロール代謝を混乱させ、結果としてコレステロール量を減少を招くこと、さらにそのコレステロール減少がタウのリン酸化を誘導する可能性が示された。今まで、どのようなメカニズムでアミロイド β 蛋白がタウ蛋白をリン酸化するかが不明であったが、我々の結果は、コレステロールが重要な役割を果たすことを示しており、

重要な結果である。(道川)

神経系細胞におけるコレステロール efflux 機構の解明 ApoAI で刺激されたアストロサイトは作用後 60 - 90 分に一過性に細胞質での caveolin 1 レベルが上昇し、2 - 3 時間で元のレベルにまで減少した。また、apoAI は ER/Golgi で合成されたコレステロールやリン脂質 (特に phosphatidylcholine) の細胞質への translocation も促進した。細胞質に移行したコレステロールやリン脂質は密度 1.15 - 1.10 g/ml に分布する リポ蛋白様粒子 (ILP) として存在した。この画分には caveolin 1 や cyclophilin A (Cp-A) などのタンパク質も co-localize していた。Cp-A と特異的に結合する cyclosporin A (Cs-A) はこれらの apoA-I の作用を抑制し、また apoAI で誘導されるコレステロール搬出も抑制した。これらの知見から、apoAI は caveolin 1 の細胞質内レベルを上昇させ、Cp-A との協調作用を介して ER/Golgi で合成されたコレステロールやリン脂質の細胞質への translocation を促進するものと考えられた。しかしながら、抗 caveolin 1 抗体によって ILP の Cp-A は共沈せず、また cross-linker によって caveolin 1 と Cp-A の共有結合体は観察されなかった。

一方、apoA-I 作用後 60 - 90 分にコレステロール合成に関わる酵素 (HMG-CoA reductase など) の転写を制御する成熟型 SREBP2 の核内分布が増加し、2 - 3 時間後にはコレステロールの de novo 合成も促進された。また、Cs-A は apoAI で誘導されるコレステロール合成も抑制した。(伊藤)

D. ミトコンドリア DNA 欠失株細胞の作製とその脂質代謝の解析 PCR-SSCP の結果、患者は CYP27 のエクソン 7 と 8 とに変異の存在が推定された。シーケンスの結果それぞれ Arg372Gln

と Arg441Trp の変異が見いだされた。また、PCR-SSCP の結果、父親はエクソン 7 の、母親はエクソン 8 の、遺伝子診断依頼のあった姉はエクソン 7 の変異であることが確定できた(論文投稿準備中)。本患者は 2 つの遺伝子変異を保有していた。それぞれの変異のホモ接合体の CTX 患者も見いだされていることから、これらが複合して CTX 症状を発現したと考えられる珍しいケースではあるが、compound heterozygosity と考えられる CTX 例は国内外でも数例報告されている。今後、表現型と遺伝子型の連関を詳細に検討すべきであると考えられる。

正常者 CSF の GFAP 濃度は約 3 ないし 4 ng/ml であり、加齢による変化はなかったが、AD 患者の CSF では約 9 ng/ml で、有意に上昇していた。ROC 解析により、特異度 93.3 %、感度 66.7 % となり、診断上有効であることが示された (Fukuyama et al., *Europ. Neurol.*, 2001, in press、学会発表参照)。

次にミトコンドリア関連では、患者は PEO と診断された 54 歳の女性で、主訴は外眼筋麻痺と四肢の脱力であった。11.2 kb 断片の増幅の際に正常コントロールにはみられなかった 5.3 kb 断片も増幅され、約 6 kb の欠失が推測された。画像解析の結果、バンド B、C、D、H (Goto et al., 1996 参照) が欠失し、新たにバンド H に位置する異常断片が見いだされたので、これをサブクローニングしてシーケンスしたところ、欠失断片の 5' 端はこれまで知られていない 17 bp のパリンドローム、3' 端はすでに報告のある 5 bp のタンデムリピートであることがわかった (Saiwaki et al., *Mol. Pathol.* 2000)。今後、欠失のメカニズムと mtDNA の欠失が細胞に及ぼす効果について検討する必要があると考えられる。

AD や PEO および脂質代謝異常に関連した大脳疾患の細胞モデル作製を目指して、神経系由来の株細胞より ρ -0 細胞を分離した。用いた細胞はヒト神経芽細胞腫由来 SILA、ラットアストロ

サイト由来 RNB およびマウスシュワン細胞由来 IMS32 細胞で、これらより、それぞれ ρ -0 細胞、Rr-0 細胞、Ip-0 細胞を数クローンずつ樹立できた。解糖系の活性化程度はそれぞれに異なっており、エネルギー代謝のホメオスタシスは神経細胞とグリア細胞では異なる様式を取るものと考えられる。コレステロール量、mtTFA 発現量には減少するものとしないうサブラインとがあった。電顕観察の結果、呼吸傷害を示すミトコンドリアの顕著な異常と、ガングリオシド代謝異常を示す membranous cytoplasmic body (MCB) 様封入体がどの細胞にも発見されたので、 ρ -0 細胞の脂質代謝異常には共通点があると考えられる。これらの細胞は酸化ストレスに高感受性で、親細胞がアポトーシスによる細胞死を示したのに対し、細胞ごとにネクローシスあるいはアポトーシスで死滅しており、細胞死のパターンは ρ -0 細胞の由来によって異なると考えられた。酸化ストレスによる細胞死に鉄の関与が考えられるので、鉄キレート剤である deferoxamine を添加してみると親細胞の細胞死は完全に抑制された。一方、 ρ -0 細胞死はほとんど抑制されなかったので、r-0 細胞の酸化ストレスに対する高感受性は鉄が触媒するフェントン反応によるのであり、 ρ -0 細胞には鉄が過剰に蓄積しているものと考えられた。今後、鉄量の測定、ガングリオシドの測定、アポトーシスおよび AD 関連蛋白の検討を進めるべきであると考えられた。(福山)

E. 結論

(1) アミロイド β 蛋白が神経細胞内コレステロール代謝を乱しその量を低下させること、コレステロール量の低下によりタウのリン酸化が亢進することが明らかになり、アミロイドカスケードにおけるコレステロールの重要な役割を明らかにした。(2) 神経細胞へのコレステロール供給源としてのアストロサイトにおける HDL 形

成は、cyclophilin A と caveolin 1 との機能的協調作用によるコレステロールの ER から細胞質への translocation により制御されることが明らかになった。(3) ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝異常が神経系の脂質代謝障害および細胞死をもたらすことを確認した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sawamura N, Gong J.S., Garver W.S., Heidenreich R.A., Ninomiya H, Ohno k, Yanagisawa K and Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J. Biol. Chem.* (in press).

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. 3-(45-dimethylthiazol-2-yl)-25 diphenyltetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* (in press).

Fan Q.W., Yu W, Senda ., Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J. Neurochem.* 76: 391-400, 2001.

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.

Fan Q.W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M. Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture. A review. *AGE J.* 24: 1-10, 2001.

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial culture. *Exp. Neurol.* 162: 51-60, 2000.

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.

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S. Cholesterol-sphingomyelin interaction in membrane and apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 41:894-904, 2000.

Ito J and Yokoyama S. Sialosylcholesterol induces reorganization of astrocyte filament network. *Biochim. Biophys. Acta.* 1495:195-202, 2000.

Zhang L.Y, Ito J, Kato T and Yokoyama S. Cholesterol homeostasis in rat astrocytoma cells GA-1. *J. Biochem.* 128: 837-845, 2000

Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito J and Yokoyama S. Involvement of caveolin 1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J. Lipid Res.* 41: 1952-1962, 2000.

Saiwaki K, Shiga R, Fukuyama Y, Tsutsumi Y and Fushiki S.

A unique junctional palindromic sequence in mitochondrial DNA of a progressive external ophthalmoplegia patient. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 53:333-335, 2000.

Fukuyama R, Izumoto T and Fushiki S. CSF level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eurp. Neurol.* (in press)

道川 誠 アポリポ蛋白 E の役割 脳の科学 22 巻増刊号:133-138,2000

道川 誠 アポリポ蛋白 E アイソフォーム特異的コレステロール代謝調節の解明 -Alzheimer 病発症機構との関連- 最新医学 55:1656-1663, 2000.

道川 誠 In vitro senile plaque model の形成 Dementia Japan 14:240-243,2000.

3. 学会発表

磯部 一郎、柳澤勝彦、道川 誠 合成 amyloid β 蛋白及び培養グリア細胞を用いた老人斑モデルの作成 第41回 日本神経学会総会 2000年 5月24-26日 松本

道川 誠、キョウ建生、范 企文、柳澤勝彦
Amyloid β -protein のコレステロール代謝に対する影響 amyloid cascade に関するコレステロールの役割との関連- 日本痴呆学会 2000年9月28-29日 木更津

道川 誠 Alzheimer 病発症機構におけるコレステロールの役割の検討 神経組織培養研究会 2000年9月30日 東京

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)によるラットアストロサイトにおける Akt リン酸化の亢進とエンドゾームの形態変化 第73回日本生化学大会 2000年10月11-14日 横浜

キョウ建生、澤村直哉、范 企文、柳澤勝彦、道川 誠 凝集した Amyloid β -protein は神経細胞におけるコレステロール代謝に大きな影響を及ぼす 第43回日本神経化学学会 2000年10月18-20日 金沢

道川 誠、Qi-Wen Fan、澤村直哉、Wei Yu、千田隆夫、柳澤勝彦 細胞内コレステロール量依存的タウ蛋白リン酸化調節の検討 第43回日本神経化学学会 2000年10月18-20日 金沢

澤村直哉、キョウ建生、W. Garver, R. Heidenreich、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠 ニーマンピック病 C型マウスにおけるタウ蛋白のリン酸化の検討 第43回 日本神経化学学会 2000年10月18-20日 金沢

Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and microtubule stabilization in cultured neurons. Annual Meeting of Society for Neurosci., New Orleans, Nov., 4-9, 2000.

伊藤仁一、長安祐子、加藤宏一、横山信治
Apolipoprotein A-I によるアストロサイトからの

コレステロール搬出に連動した細胞内ステロール輸送系の研究 第73回日本生化学会 10月11-14日 横浜

張 力勇、伊藤仁一、横山信治
ラットアストロサイトマ GA-1 のコレステロール放出に対する acidicFGF の効果 第73回日本生化学会 10月11-14日 横浜

中瀬泰然、福山隆一、鳥羽裕恵、才脇卓也、伏木信次
ミトコンドリア DNA を欠失した神経系の rho-0 細胞は細胞の起源により異なる代謝的適応を示し、酸化ストレスに脆弱であり、アポトーシスあるいはネクローシスによる細胞死を示す 第43回神経化学 2000年10月18-20日 金沢

福山隆一、水野敏樹、水野哲也、柳澤勝彦、伊豆本種野、畑中弘樹、中島健二、伏木信次
アルツハイマー病患者脳脊髄液中の Abeta40、Abeta42、apoE および GFAP の測定と APOE の2つの遺伝子型 (e2/e3/e4 および-491A/T) について 第43回神経化学 2000年10月18-20日 金沢

Nakase T, Fukuyama R, Saiwaki T, Fushiki S. An establishment of novel rho-0 cell lines, a cellular model for mitochondrial and other related diseases, and their susceptibility to free radical stress. Annual Meeting of Society for Neurosci., New Orleans, Nov., 4-9, 2000.

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Yanagisawa K, Izumoto T, Nakajima K, Fushiki S. Age-dependent changes in the level of CSF proteins and their alteration in CSF from Alzheimer and other neurological diseases. Annual Meeting of Society for Neurosci., New Orleans, Nov., 4-9, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

分担研究報告書

アルツハイマー病におけるアポリipoprotein E の分子機構の解明

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 凝集 Amyloid β -蛋白(A β)の中樞神経細胞における脂質代謝に対する作用を検討した。凝集 A β は神経細胞からコレステロール、リン脂質などを搬出し HDL を形成させる能力があることが明になった。その HDL の大きさは通常の HDL に比べて約 2 倍の直径を有し、細胞への取り込みは認めなかった。またこの他に、凝集 A β は、細胞内コレステロール合成抑制作用を持ち、結果的に細胞内コレステロール量の低下を誘導した。これらの結果に加えて、神経細胞内コレステロール量の低下がタウのリン酸化を誘導することを明らかにした。こうした事実を考えあわせると、凝集 A β がタウのリン酸化を誘導するメカニズムにコレステロールが重要な役割を果たすという全く新しい分子機構の存在が示されたことになる

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。apoE4 が如何にアルツハイマー病発症機構に関わるかを明らかにするために、申請者らは apoE のコレステロール代謝調節作用に着目し研究を続けてきた。その結果、(1) 神経細胞は他の細胞と異なり、その生存が細胞内コレステロール量に依存すること、お

よび (2) apoE は神経細胞およびアストロサイトからアイソフォーム特異的なコレステロール搬出作用を持つことを明らかにした。これは神経細胞生存を左右するコレステロール代謝が apoE によりアイソフォーム依存的に制御されることを示している。そこで申請者らは、直接コレステロール量を変化させ、(3) 細胞内コレステロールの減少がアルツハイマー病病理に特徴的なタウ蛋白のリン酸化を誘導する可能性を昨年度見いだした。本年度はコレステロール代謝とタウリン酸化の関係をさらに詳細に検討すること、さらにこうしたタウの変化がアミロイドカスケードの上におけるコレステロールの変化から説明が可能かどうかを明らかにするために、神経細胞コレステロール代謝に対する凝集アミロイド β 蛋白の影響を検討した。

B. 研究方法

凝集させた $A\beta$ は一度 0.45 ミクロメートルのポアサイズのフィルターを通して線維成分を除去した後、再度蛋白定量したものを添加した。培養神経細胞および培養アストログリア細胞から搬出されるコレステロール、リン脂質はキットにより定量した。また搬出した脂質を含む培地を超遠心し、比重勾配法により得た画分中の脂質の定量、電顕撮影により HDL であることを確認した。また抗 $A\beta$ 抗体を用いた免疫電顕により $A\beta$ との複合体を形成していることを確認した。さらに、この凝集 $A\beta$ がコレステロール合成および、細胞内コレステロール量に与える影響を検討した。また、神経細胞にコレステロール合成抑制剤を加えて細胞内コレステロール量を減少させ、神経突起の変化、タウのリン酸化および神経軸索における微小管の脱重合安定化等に対する影響を生化学的、形態学的に検討した。

C. 研究結果

神経細胞内コレステロール量をコレステロール合成阻害剤により減少させたところタウ蛋白のリン酸化が multiple site で亢進した。これにともない軸索の微小管の脱重合が認められた。また、コレステロール代謝に対する $A\beta$ の影響については凝集させた $A\beta$ を用いた。凝集させた $A\beta$ は一度 0.45 ミクロメートルのポアサイズのフィルターを通して線維成分を除去した後、再度蛋白定量したものを添加した。培養神経細胞および培養アストログリア細胞からコレステロール、リン脂質等を搬出し、HDL を形成した。電子顕微鏡による解析で、これらの HDL 粒子の直径は通常の培地中で確認できる HDL のサイズに比べて約 2 倍の大きさを持ち、抗 $A\beta$ 抗体を用いた免疫電

顕により $A\beta$ との複合体を形成していることが確認された。またこの HDL は神経細胞に取り込まれなかった。さらに、この凝集 $A\beta$ はコレステロール合成を抑制し、最終的に細胞内コレステロール量を減少させた。

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搬出および取り込みに着目することになる。一昨年度までに我々は、apoE が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した。また、我々は、神経細胞生存維持にとってコレステロールは神経特異的に重要であることも報告した。こうした事実は、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や生存維持に重要な細胞膜のコレステロール代謝を apoE がアイソフォーム特異的に制御していることを意味する。我々は本年度に神経細胞内コレステロール量の低下がタウのリン酸化を促進すること、神経細胞の生存や形態および機能維持にとって重要なコレステロール代謝の恒常性が凝集 $A\beta$ のような病的 $A\beta$ により乱され、結果として細胞内コレステロール量を減少させることを明

らかにした。以上の事実を考えあわせると以下のような仮説を考えることができる。すなわち、アルツハイマー病発症機構においてはアミロイドβ蛋白の凝集、蓄積がやがてタウ蛋白のリン酸化を伴う神経原繊維変化、シナプス数の減少、神経細胞死を招来すると考えられている(アミロイドカスケード)が、我々の結果から、アルツハイマー病患者の脳内(細胞外)で増加する凝集 Aβがコレステロール代謝低下を誘導し、神経細胞内コレステロール量低下がタウ蛋白のリン酸化を招くことでアミロイドカスケードを説明できるのではないかということである。このとき、apoE は凝集 Aβによるコレステロール代謝の混乱を補正し、その恒常性維持に働くと思われるが、その作用にアイソフォーム依存的な違いがあるために疾患発症に関与すると考えられる。

E. 結論

本研究により、病的な凝集 Aβ (oligomer) が、培養神経細胞および培養アストログリア細胞からコレステロール、リン脂質等を搬出し、病的な HDL を形成し、それが最終的に神経細胞内コレステロール量の減少を誘導することを明らかにした。また、細胞内コレステロール量の減少はタウのリン酸化を促進する事を見いだした。こうした oligomerized Aβは線維化の前段階でも存在し、あるいは老人斑の周囲でかなり高濃度になっている可能性があり、それが神経細胞内コレステロール代謝を変動させタウのリン酸化を招来する可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Sawamura N, Gong J.S., Garver W.S., Heidenreich R.A., Ninomiya H, Ohno k, Yanagisawa K and Michikawa M. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. J. Biol. Chem. (in press).

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. 3-(45-dimethylthiazol-2-yl)-25 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. J. Neurochem. (in press).

Fan Q.W., Yu W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. J. Neurochem. 76: 391-400, 2001.

Fan Q.W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M. Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture. A review. AGEJ. 24: 1-10, 2001.

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. 162: 51-60, 2000.

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.

道川 誠 アポリポ蛋白 E の役割 脳の科学 22 巻増刊号:133-138,2000

道川 誠 アポリポ蛋白 E アイソフォーム特異的

コレステロール代謝調節の解明 -Alzheimer 病発症機構との関連- 最新医学 55:1656-1663, 2000.

道川 誠 In vitro senile plaque model の形成
Dementia Japan 14:240-243,2000.

2. 学会発表

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠 合成 amyloid β 蛋白及び培養グリア細胞を用いた老人斑モデルの作成 第41回 日本神経学会総会 2000年 5月 24-26日 松本

道川 誠、キョウ建生、范 企文、柳澤勝彦
Amyloid β -protein のコレステロール代謝に対する影響 amyloid cascade に関与するコレステロールの役割との関連- 日本痴呆学会 2000年 9月 28-29日 木更津

道川 誠 Alzheimer 病発症機構におけるコレステロールの役割の検討 神経組織培養研究会 2000年 9月 30日 東京

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)によるラットアストロサイトにおける Akt リン酸化の亢進とエンドゾームの形態変化 第73回日本生化学大会 2000年 10月 11-14日 横浜

キョウ建生、澤村直哉、范 企文、柳澤勝彦、道川 誠 凝集した Amyloid β -protein は神経細胞におけるコレステロール代謝に大きな影響を及ぼす 第43回日本神経化学会 2000年 10月 18-20日 金沢

道川 誠、Qi-Wen Fan、澤村直哉、Wei Yu、千田隆夫、柳澤勝彦 細胞内コレステロール量依存的タウ蛋白リン酸化調節の検討 第43回日本神経化学会 2000年 10月 18-20日 金沢

澤村直哉、キョウ建生、W. Garver, R. Heidenreich、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠 ニーマンピック病 C型マウスにおけるタウ蛋白のリン酸化の検討 第43回 日本神経化学会 2000年 10月 18-20日 金沢

Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and microtubule stabilization in cultured neurons. Annual Meeting of Society for Neurosci., New Orleans, Nov., 4-9, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

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 アストロサイトのアポリポrotein A-I (apoAI) で促進される細胞内コレステロール輸送を、ER で合成されたコレステロールの細胞質への移行と細胞膜から細胞外への搬出の過程と関連づけて検討した。apoAI で刺激されたラットアストロサイトは 60-90 分で細胞質の caveolin1 レベルが上昇した。これに対応して apoAI 作用後 90 分に一過性に ER/Golgi で合成されたコレステロールやリン脂質が細胞質に translocate され、細胞質内でリポprotein様粒子 (intracellular lipoprotein particles, ILP) を形成することがわかった。また、apoAI 作用後 2 時間以降には ER でのコレステロール合成が促進された。

一方 apoAI で誘導される caveolin 1 の細胞質における増加や、コレステロールの細胞質への translocation、コレステロール合成、さらにコレステロール搬出のすべての反応が cydophilin A (Cp-A) に特異的に結合する cyclosporin A (Cs-A) によって強く抑制された。これらのことから、apoAI で刺激されたアストロサイトは Cp-A と caveolin 1 との機能的協調作用によって、コレステロールの ER から細胞質への translocation とコレステロール搬出を制御することが示唆された。

A. 研究目的

中枢神経組織は血液脳関門の存在によって血中リポproteinとの相互作用を介したコレステロールの授受が阻害されている。したがって、脳内には固有のコレステロールホメオスタシスあるいは神経系細胞間コレステロール運搬機構が備わっていることが考えられる。アストロサイトは apoE を産生分泌し、コレステロール合成も活発で積極的に細胞外にコレステロールを分泌して HDL を形成していることから、脳内コレステロール代謝に中心的な役割をもつことが考えられる。中枢神経組織は体全体のコレステロー

ルの約 20~30%を占めることから、コレステロールは脳内において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。

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 14C-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。

(4) 細胞内 lipoprotein particle (ILP) の分析 ラットアストロサイトに 40 uCi/ml の 3H-acetate を 2 時間取り込ませてコレステロールを代謝的に 3H 標識した。細胞を洗浄して、5 ug/ml の apoAI を 90 分作用させ、低張液で細胞を処理し、300,000 x g, 30 min の超遠心で細胞質を得た。これを 1.19 g/ml, 1.07 g/ml のショ糖水溶液に上層して、150,000 x g, 24 時間超遠心して、12 の画分に分画した。各分各の密度、脂質組成、蛋白組成を分析した。

C. 研究結果

ApoAI で刺激されたアストロサイトは作用後 60 - 90 分の一過性に細胞質での caveolin1 レベルが上昇し、2-3 時間で元のレベルにまで減少した。また、apoAI は ER/Golgi で合成されたコレステロールやリン脂質 (特に phosphatidylcholine) の細胞質への translocation も促進した。細胞質に移行したコレステロールやリン脂質は密度 1.15 - 1.10 g/ml に分布する リポプロテイン様粒子 (ILP) として存在した。この画分には caveolin 1 や cyclophilin A (Cp-A) などのタンパク質も co-localize していた。Cp-A と特異的に結合する cyclosporin A (Cs-A) はこれらの apoA-I の作用を抑制し、また apoAI で誘導されるコレステロール搬出も抑制した。これらの知見から、apoAI は caveolin 1 の細胞質内レベルを上昇させ、Cp-A との協調作用を介して ER/Golgi で合成されたコレステロールやリン脂質の細胞質への translocation を促進するものと考えられた。しかしながら、抗 caveolin 1 抗体によって ILP の Cp-A は共沈せず、また cross-linker によって caveolin 1 と Cp-A の共有結合体は観察されなかった。

一方、apoA-I 作用後 60 - 90 分にコレステロール合成に関わる酵素 (HMG-CoA reductase など) の転写を制御する成熟型 SREBP2 の核内分布が増加し、2-3 時間後にはコレステロールの de novo 合成も促進された。また、Cs-A は apoAI で誘導されるコレステロール合成も抑制した。

D. 考察

アポリipoprotein A-I (apoAI) 作用後のアストロサイト細胞内でのコレステロール輸送とコレステロール搬出との相関を理解する目的で、apoAI 作用後に細胞質に translocate されたコレステロールを分析した。本実験結果より apoAI は細胞質における caveolin 1 レベルを上昇させ、コレステロールやリン脂質の細胞質への translocation も促進することがわかった。また、細胞質に移行した脂質と共に caveolin 1 も cyclophilin A も lipoprotein (ILP) 画分から回収された。これら apoAI で誘導される一連の反応はいずれも cyclophilin A と特異的に結合する Cs-A によって阻害されることから、caveolin 1 と cyclophilin A との協調作用が示唆された。しかしながら、① cross-linker によって caveolin 1 と cyclophilin A とが共有結合をしない、②抗 caveolin 1 抗体によって cyclophilin A が共沈しない、さらには③ caveolin 1 と cyclophilin A は共に ILP 画分から回収されるがその分布密度がわずかに cyclophilin A の方が高く、完全に一致した分布を示さないなどの理由から、1つの ILP に caveolin 1 と cyclophilin A とが co-localize することは考えにくいと思われた。

一方、apoAI 作用後の細胞質への translocation によって ER 膜上のコレステロールの減少は SREBP の processing を促進し、成熟型 SREBP2 を産生して、核内で HMG-CoA reductase などの酵素の転写を促進し、コレステロール合成を促進するものと考えられる。

今後は、細胞質での caveolin 1 レベルを上昇させる apoAI 誘導性シグナルの検討を protein phosphatase 2B 活性化と関連づけて行う予定である。

E. 結論

apoAI はアストロサイト細胞内 caveolin レベルとコレステロールの細胞質への translocation を促進した。(2) apoAI は SREBP の processing とコレステロール合成を促進した。(3) cyclosporin A は apoAI で誘導される細胞質 caveolin 1 レベル上昇、コレステロールの細胞質への translocation、コレステロール合成、コレステロール搬出のすべての反応を抑制した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S. Cholesterol-sphingomyelin interaction in membrane and apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Lipid Res.* 41:894-904, 2000.

Ito J and Yokoyama S. Sialosylcholesterol induces reorganization of astrocyte filament network. *Biochim. Biophys. Acta.* 1495:195-202, 2000.

Zhang L.Y, Ito J, Kato T and Yokoyama S. Cholesterol homeostasis in rat astrocytoma cells GA-1. *J. Biochem.*, 128: 837-845, 2000.

Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito J and Yokoyama S. Involvement of caveolin 1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells. *J. Lipid Res.* 41: 1952-1962, 2000.

2. 学会発表

伊藤仁一、長安祐子、加藤宏一、横山信治
Apolipoprotein A-I によるアストロサイトからのコレステロール搬出に連動した細胞内ステロール輸送系の研究 第73回日本生化学会 10月

11-14日 横浜

張 力勇、伊藤仁一、横山信治
ラットアストロサイトーマ GA-1 のコレステロ
ール放出に対する acidicFGF の効果 第 73 回
日本生化学会 10月 11-14日 横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

分担研究報告書

遺伝性脳髄黄色腫症と進行性外眼筋麻痺の遺伝子異常の検討およびミトコンドリア DNA 欠失細胞の作製とその脂質代謝異常・酸化ストレス高感受性について

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 脂質およびエネルギー代謝異常が脳やその他の組織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劣性遺伝性疾患脳髄黄色腫症(CTX)と、ミトコンドリア DNA(mtDNA)異常によって起こる進行性外眼筋麻痺(PEO)の遺伝子異常を検討し、原因である遺伝子変異を確定した。ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝異常が神経系の脂質代謝やアルツハイマー病関連分子の発現に及ぼす影響を及ぼすかを調べる目的で、mtDNA を欠失した細胞株を3種類樹立した。これらの変異細胞をさまざま検討した結果、エネルギー代謝異常に対する細胞の適応の仕方は細胞の由来により異なること、ミトコンドリア転写因子(mtTFA)が mtDNA のコピー数の調節にも関与すること、脂質代謝異常を示唆する電子顕微鏡的形態が存在すること、などを見いだした。また、これらの細胞が酸化ストレスにきわめて脆弱であり、細胞種によりアポトーシスあるいはネクローシスによる細胞死を示すこと、この細胞死の機構に遷移金属が関与することを明かにした。

A. 研究目的

脳の変性疾患、とりわけアルツハイマー病(AD)の治療法・予防法の開発は高齢化の進む我が国において急務である。AD の発症機構と細胞死のメカニズムを明らかにすると同時に、早期診断法を開発していく必要がある。この目的でわれわれはこれまで、AD 患者脳脊髄液中(CSF)の様々な物質の濃度を測定し、AD 関連遺伝子の多型を検討してきた(Fukuyama et al., *Europ. Neurol.*, 2000a, b)。また、疾患モデルとなる可能性のある遺伝性疾患 CTX の原因遺伝

子変異を同定した(Shiga et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999)。今年度の目的は前年に引き続き、1)AD 患者脳脊髄液中のグリア線維性酸性蛋白(GFAP)の濃度測定、2)遺伝子診断を依頼された新しい CTX 患者と家族の CYP27 遺伝子解析を行った。また、今年度の新規目的として、3) 進行性外眼筋麻痺患者のミトコンドリア DNA(mtDNA)異常の検討、および 4) mtDNA 欠失細胞株の作製とその解析とを行った。

B. 研究方法

昨年度報告した研究(業績は Fukuyama et al. 2000a, b)において用いた CSF サンプルを使用し、正常者の加齢における GFA 濃度の変化、AD 患者 CSF における濃度と痴呆度との連関を調べる。GFAP の定量にはサンドイッチ ELISA 法を、痴呆度測定にはミニメンタルイグザミネーション(MMSE)を用いた。カットオフ値の検討に ROC 解析を行った。CTX の解析には昨年度報告した研究(業績は Siga et al. 1999)において用いたプライマーのセットを使用し、PCR-SSCP 法、direct sequencing にて患者 CYP27 遺伝子変異を同定した。変異は HapII サイトについて RFLP を生ずるものであったので、PCR-RFLP を行って本人および患者家族の変異を同定した。MtDNA 変異解析は Goto et al. (BBRC, 1996) にもとづいて行った。mtDNA 全長を2つの部分に分けて増幅し、それぞれの断片を3つの制限酵素(*Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I)にて切断、断片の電気泳動パターンを画像解析し、欠失部分を推定した。欠失の両端を含む断片はプラスミドに組み込みシーケンスした。MtDNA 欠失細胞作製において、ヒト神経芽株細胞腫由来(SILA)、ラットアストロサイト由来(RNB)、およびマウスシュワン細胞由来(IMS32)株細胞を用い、エチジウムブロミド処理法によって mtDNA を除去(ρ -0 化)、クローニングした。R-0 化の検定としてクラーク型電極を用いる呼吸活性測定と PCR 法による mtDNA の定量を行った。樹立した細胞の LDH 活性、乳酸産生率、コレステロール量、GSH 量、ATP 量を測定し、形態を電顕にて観察した。酸化による細胞死を検討する

ため、 H_2O_2 で細胞を処理し、メディアウム中の LDH 活性、DNA の電気泳動パターンを観察した。さらに、遷移金属の関与を調べるため、deferoxamine の効果を検討した。

(倫理面への配慮)

健常者および患者の CSF および DNA に関しては昨年度報告の通り。また、CTX、PEO 患者と家族については、本来、遺伝子診断についての要望を受けたものであり、インフォームドコンセントの後使用しており、本研究遂行上問題はないと判断した。

C・D. 研究結果と考察

PCR-SSCP の結果、患者は CYP27 のエクソン 7 と 8 とに変異の存在が推定された。シーケンスの結果それぞれ Arg372Gln と Arg441Trp の変異が見いだされた。また、PCR-SSCP の結果、父親はエクソン 7 の、母親はエクソン 8 の、遺伝子診断依頼のあった姉はエクソン 7 の変異であることが確定できた(論文投稿準備中)。本患者は2つの遺伝子変異を保有していた。それぞれの変異のホモ接合体の CTX 患者も見いだされていることから、これらが複合して CTX 症状を発現したと考えられる珍しいケースではあるが、compound heterozygosity と考えられる CTX 例は国内外でも数例報告されている。今後、表現型と遺伝子型の連関を詳細に検討すべきであると考えられる。

正常者 CSF の GFAP 濃度は約 3 ないし 4ng/ml であって、加齢による顕著な変化はなかった。AD 患者の CSF では約 9ng/ml で、有意に上昇していた。ROC 解析により、カットオ

フ値を 4 – 5 ng/ml とすれば特異度 93.3 %、感度 66.7 % となり、診断上有効であることが示された(Fukuyama et al., *Europ. Neurol.*, 2001, *in press*、学会発表参照)。

次にミトコンドリア関連であるが、患者は PEO と診断された 54 才の女性で、主訴は外眼筋麻痺と四肢の脱力である。11.2 kb 断片の増幅の際に正常コントロールにはみられなかった 5.3 kb 断片も増幅され、約 6 kb の欠失が推測された。もうひとつの 5.3 kb 断片には欠失を疑わせる過剰なバンドは見られなかった。画像解析の結果、バンド B、C、D、H(Goto et al., 1996 参照)が欠失し、新たにバンド H に位置する異常断片が見いだされたので、これをサブクローニングしてシーケンスしたところ、欠失断片の 5'端はこれまで知られていない 17 bp のパリンδροーム、3'端はすでに報告のある 5 bp のタンデムリピートであることがわかった(Saiwaki et al., *Mol. Pathol.* 2000)。今後、欠失のメカニズムと mtDNA の欠失が細胞に及ぼす効果について検討する必要があると考えられる(以下も参照)。

AD や PEO および脂質代謝異常に関連した大脳疾患の細胞モデル作製を目指して、神経系由来の株細胞より ρ -0 細胞を分離した。用いた細胞はヒト神経芽細胞腫由来 SILA、ラットアストロサイト由来 RNB およびマウスシュワン細胞由来 IMS32 細胞で、これらより、それぞれ S ρ -0 細胞、R ρ -0 細胞、I ρ -0 細胞を数クローンずつ樹立できた。解糖系の活性化程度はそれぞれに異なっており、エネルギー代謝のホメオスタシスは神経細胞とグリア細胞では異なる様式を

取るものと考えられる。コレステロール量、mtTFA 発現量には減少するものとしないうサブラインとがあった。電顕観察の結果、呼吸傷害を示すミトコンドリアの顕著な異常と、ガングリオシド代謝異常を示す membranous cytoplasmic body (MCB) 様封入体がどの細胞にも発見されたので、 ρ -0 細胞の脂質代謝異常には共通点があると考えられる。これらの細胞は酸化ストレスに高感受性で、親細胞がアポトーシスによる細胞死を示したのに対し、細胞ごとにネクロシスあるいはアポトーシスで死滅しており、細胞死のパターンは ρ -0 細胞の由来によって異なると考えられた。酸化ストレスによる細胞死に鉄の関与が考えられるので、鉄キレート剤である deferoxamine を添加してみると親細胞の細胞死は完全に抑制された。一方、 ρ -0 細胞死はほとんど抑制されなかったので、 ρ -0 細胞の酸化ストレスに対する高感受性は鉄が触媒するフェントン反応によるのであり、 ρ -0 細胞には鉄が過剰に蓄積しているものと考えられた。今後、鉄量の測定、ガングリオシドの測定、アポトーシスおよび AD 関連蛋白の検討を進めるべきであると考えられる。

E. 結論

- 1) 複合ヘテロ接合体の CTX 患者を発見し、患者家族の遺伝子診断をした。
- 2) AD 患者脳脊髄液中の GFAP を定量し、AD において上昇していること、痴呆度の増悪とともに上昇すること、カットオフ値として 4 – 5 ng/ml が有効であること、を見いだした。
- 3) PEO 患者 1 例の mtDNA の欠失を明らかにし、

切断両端がユニークな塩基配列であることを明らかにした。

4)3 種類の ρ -0 細胞を樹立し、脂質代謝異常とエネルギー代謝異常がカップルしている様々な証拠を見いだした。エネルギー代謝障害に対する適応、コレステロール代謝適応、細胞死のパターンは細胞種ごとに異なることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Saiwaki K, Shiga R, Fukuyama R, Tsutsumi Y and Fushiki S.

A unique junctional palindromic sequence in mitochondrial DNA of a progressive external ophthalmoplegia patient.

J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol. 53:333-335, 2000.

Fukuyama R, Izumoto T and Fushiki S.

CSF level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eurp. Neurol.* (in press)

2. 学会発表

中瀬泰然、福山隆一、鳥羽裕恵、才脇卓也、伏木信次

ミトコンドリア DNA を欠失した神経系の ρ -0 細胞は細胞の起源により異なる代謝的適応を示し、酸化ストレスに脆弱であり、アポトーシスあるいはネクローシスによる細胞死を示す
第 43 回神経化学 2000 年 10 月 18-20 日 金沢

福山隆一、水野敏樹、水野哲也、柳澤勝彦、伊豆本種野、畑中弘樹、中島健二、伏木信次
アルツハイマー病患者脳脊髄液中の Abeta40、Abeta42、apoE および GFAP の測定と APOE の 2 つの遺伝子型 (e2/e3/e4 および-491A/T) について
第 43 回神経化学 2000 年 10 月 18-20 日 金沢

Nakase T, Fukuyama R, Saiwaki T, Fushiki S. An establishment of novel ρ -0 cell lines, a cellular model for mitochondrial and other related

diseases, and their susceptibility to free radical stress.

Annual Meeting of Society for Neurosci., New Orleans, Nov., 4-9, 2000.

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Yanagisawa K, Izumoto T, Nakajima K, Fushiki S.

Age-dependent changes in the level of CSF proteins and their alteration in CSF from Alzheimer and other neurological diseases. Annual Meeting of Society for Neurosci., New Orleans, Nov., 4-9, 2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
道川 誠	アポリポ蛋白 E の役割		脳の科学	星和書店	東京	2000	133-138
道川 誠	アポリポ蛋白 E アイソフォーム特異的コレステロール代謝調節の解明		最新医学	最新医学社	大阪	2000	1565-1663
道川 誠	In vitro senile plaque model の形成		Dementia Japan	日本痴呆学会	東京	2000	240-243

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.	3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes.	J Neurochem	(in press)		2001
Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, Yanagisawa K Michikawa M.	Site-specific phosphorylation of tau by mitogen activated protein kinase in brains of Niemann-Pick type C mice.	J Biol Chem	(in press)		2001
Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K, and Michikawa M.	Cholesterol-dependent microtubule stabilization by modulating tau phosphorylation.	J Neurochem	76	391-400	2001
Fan Q.W., Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M.	Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture.	AGE J	24	1-10	2001
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
Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.	A possible model of senile plaques using synthetic amyloid β -protein and rat glial culture.	Exp Neurol	162	51-60	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
Ito J, Nagayasu Y and Yokoyana S.	Cholesterol-sphingomyelin interaction in membrane and apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux.	J Lipid Res	41	894-904	2000
Ito J and Yokoyama S.	Sialosylcholesterol induces reorganization of astrocyte filament network.	Biochi Biophys Acta	1495	195-202	2000
Zhang L.Y, Ito J, Kato T and Yokoyama S.	Cholesterol homeostasis in rat astrocytoma cells GA-1.	J Biochem	128	837-845	2000
Arakawa R, Abe-Dohmae S, Asai M, Ito J and Yokoyana S.	Involvement of caveolin 1 in cholesterol enrichment of high density lipoprotein during its assembly by apolipoprotein and THP-1 cells.	J Lipid Res	41	1952-1962	2000
Fukuyama R, Izumoto T and Fushiki S.	CSF level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia..	Europ Neurol	(in press)		2001
Saiwaki T, Shiga K, Fukuyama R, Tsutsumi Y and Fushiki S.	An unique junctional palindromic sequence in mitochondrial DNA of a progressive external ophthalmoplegia patient.	J Clin Pathol Mol.Pathol	53	333-335	2000