

厚生科学研究研究費補助金

脳科学総合研究事業

アルツハイマー病の発症分子機構に関する研究

平成 12 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 柳澤勝彦

平成 13 (2001) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書	
アルツハイマー病の発症分子機構に関する研究	1
柳澤勝彦	
II. 分担研究報告書	
1. アミロイド β 蛋白蓄積開始機序の研究	9
柳澤勝彦	
2. A β 産生に関与する γ -セクレターゼの解析	13
駒野宏人	
3. 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	16
道川 誠	
4. 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	20
横山信治	
5. プレセニリン変異神経細胞における脂質代謝の ER および細胞死への影響	23
田中稔久	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	29

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

アルツハイマー病の発症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) の異常凝集ならびにそれによる神経毒性発現をアルツハイマー病成立過程の中核と捉え、その分子機構をアルツハイマー病発症の遺伝要因であるプレセニリンならびにアポリポ蛋白Eの病的役割を明らかにすることから検討した。本年度は、特に Aβ産生に深く関わる新規の遺伝子をクローニングすることに成功するとともに、Aβ毒性発現の過程にコレステロール代謝変動が関わることを示す研究成果が得られた。

分担研究者

駒野宏人	長寿医療研究センター 痴呆疾患研究部 室長
道川 誠	同上
横山信治	名古屋市立大学医学部 生化学第一講座 教授
田中稔久	大阪大学大学院医学研究科 神経機能講座 助手

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 発症病態の中核にはアミロイドβ蛋白 (Aβ) の異常凝集ならびにそれによる神経毒性発現の病的過程が存在するという所謂「アミロイド・カスケード仮説」が広く受け入れられている。しかしながら、この病的カスケードの個々のステップの分子機構については不明の点が多い。本研究は、Aβを中心に、AD 発症の遺伝要因であるプレセニリンならびにアポリポ蛋白 E の病的役割の検討を通して、AD 発症

の分子機構の全体を解明することを目的とする。

B. 研究方法

(柳澤)

liposome 作製

コレステロール (CH)、スフィンゴミエリン (SM)、フォスファチジルコリン (PC) を有機溶媒に溶解し、窒素ガス気流にて乾燥後、トリス生食緩衝液 (tris-buffered saline: TBS) 中で攪拌し、凍結・融解を反復の上、超音波破碎機にかけ、均一な liposome を形成させた。

Aβの liposome 結合実験

¹²⁵I 標識 Aβ1-40 (アマシャム) とアイソトープ非標識 Aβ1-40 とを TBS 中で liposome と 37 度 C、30 分間、インキュベートし、遠心にて非結合 Aβ を分離し、liposome を十分に洗浄後、結合 Aβ のアイソトープ活性を測定した。

Aβ凝集実験

A β 凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたり、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T (ThT) を用いた。同時に、インキュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に A β 線維の構造を観察した。

(駒野)

γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定には、次の様な独自に開発したスクリーニング系を用いた。まず、A β の N 末端から γ -セクレターゼ切断部位を含む APP 領域(C53)と Notch(Schroeter et al., Nature393:382-386 1998)の C 端側転写因子領域との fusion gene を安定に遺伝子導入した細胞株を得る。また、この細胞は、Notch の転写活性により、ピューロマイシン耐性遺伝子がオンとなるように作製する。すなわち、細胞内で C53-Notch キメラ蛋白が γ -セクレターゼによって切断を受け、Notch が遊離すると、細胞がピューロマイシン耐性になるという系を構築した。また、cDNA library をヒトの脳の mRNA より調製した。平成 12 年度は、この細胞株に cDNA library をトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセレクションし、この cDNA が A β 産生活性をもつかどうかを確認することにより、 γ -セクレターゼ活性を促進する cDNA を単離する。

(道川)

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サン：イソプロパノール (3 : 2) で抽出後 TLC 展開し、定量した。

(横山)

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・燐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。

(田中)

SY5Y 神経芽細胞腫は 5% FCS を含む DMEM/F-12 にて培養し、リボトキシックストレスを誘導する薬剤(10 μ M anisomycin, 10 μ M

T2 triol, 10 μ M T2 tetraol, 10 μ M HT2 toxin, 10 μ M vercarrol) およびそれに加えてタウ蛋白リン酸化キナーゼの阻害剤 (20 mM Lithium, 10 μ M MSB20358) を培地に添加し、15分から24時間後までの細胞を集めた。この細胞をバッファー (100 mM PIPES, pH 6.8, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin, 0.1% Triton-X100) にて溶解した lysates を 200K x G にて遠心し、その supernatant を得て、ウエスタンブロット解析をおこなった。タウ蛋白のリン酸化レベルの変化は、抗リン酸化タウ蛋白特異抗体 (PHF-1 (Ser396/404)(Dr. Davies P. より 供与)、M4 (Thr231/Ser235)(Dr. Ihara Y. より 供与)、12E8 (Ser262/356)(Dr. Shenk D. より 供与)、S422 (Ser422)(Dr. Iqbal K. より 供与)) によって検討し、リボトキシックストレスにより誘導される p38 MAP キナーゼ または SAPK のキナーゼ活性は、抗リン酸化 p38 抗体 (New England Lab より 購入) および抗リン酸化 SAPK 抗体 (New England Lab より 購入) により検討した。また、細胞死のレベルは Live and Dead kit (Molecular Probe より 購入) にて測定した。

次に、核酸の酸化、特にリボソーム RNA への酸化ストレスがリボトキシックストレスとして作用しないかと考えて、SY5Y 細胞の培地に色素 (2 μ g/ml rose bengal, 2 μ g/ml methylene blue) を添加し、さらに光 (100W, 10cm) を照射し、singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスを与えた。そして、細胞内のタウ蛋白のリン酸化レベルと p38 MAP キナーゼ および SAPK のキナーゼ活性について上記と同様に検討した。この系においては、singlet oxygen のスカベンジャーとなる 1mM azide や、抗酸化剤の 30 mM N-

acetyl-L-cystein を同時添加したもの、および脂質の影響を見るために細胞を 1 μ M compactin で 24 時間処理しある程度コレステロールを deplete したあとに singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスを与えたものも、上記と同様に検討した。

C. 研究結果

(柳澤)

Liposome への A β 結合は、GM1 ガングリオシドを含む liposome に特異的に認められた。この結合は GM1 ガングリオシドが存在する liposome の脂質組成に大きく影響され、PC/GM1 liposome よりも SM/CH/GM1 liposome における場合に高度に観察された。また、A β と GM1 ガングリオシド含有 liposome との結合はインキュベーション直後から認められ、両分子の結合は lag time なく進むことが確認された。Liposome とのインキュベーションによる可溶性 A β の凝集促進を、脂質組成の異なる SM/CH/GM1、SM/CH、PC の3種の liposome を用いて検討したところ、SM/CH/GM1 liposome においてのみ A β 溶液とのインキュベーションによって著しい ThT 活性の上昇を認めた。一方、GM1 ガングリオシドを含まない SM/CH liposome、PC liposome と A β とのインキュベーションによっては ThT の上昇は認められなかった。SM/CH/GM1 liposome と A β とのインキュベーション溶液を遠心し、得られた沈殿物を電子顕微鏡にて観察したところ、ヘリカル構造を示す、幅約 10nm の、典型的なアミロイド線維の形成を確認した。

(駒野)

上記の fusion gene を安定に遺伝子導入された細胞 4X10⁶ を cDNA library でトランスフェクトした結果、32 クローンがピューロマイシン耐性とな

った。さらに、これら細胞の培地中に産生する A β をイムノブロット法により検出した結果、約半分の 12 クローンが、A β の産生をあげていることが明らかとなった。次にベクターの部分の塩基配列をプライマーにして PCR 法により、細胞中にある cDNA を単離し、これを、Human kidney 293 cells (HK293 細胞)に再びトランスフェクトし、APP から産生される A β に及ぼす影響を確認した。その結果、現在、4 種類の cDNA について、APP から産生される A β を上昇することが明らかとなった。現在これら cDNA の塩基配列の解析中であるが、このうちのひとつは、全く新規の蛋白をコードしていることが明らかとなった。

(道川)

凝集させた A β 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 β 抗体を用いた免疫電顕により A β 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 β 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。

(横山)

アストロサイトはアポ E を分泌し細胞磷脂質とコレステロールを含む HDL となるが、アポ A I やアポ E を外部から加えるとコレステロールが乏しく主として磷脂質からなる HDL が新生する。細胞をスフィンゴミエリナーゼで処理すると後者の 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。また外因性のアポ A-I などの刺激により、細胞質内に caveolin-1 と cyclophilin A を含む磷脂質とコレステロールからなる粒子が形成されて、HDL 新生反応にこれらの脂質が供給されることが分かった。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 抗体によって抑制された。また、この反応は酸性 FGF 単独でも再現された。

(田中)

リボトキシックストレスを誘導する anisomycine, T2 triol を培地に添加すると、30 から 60 分をピークに p38 および SAPK は活性化し、タウ蛋白は p38 および SAPK がリン酸化することのできる Thr231/Ser235 部位、Ser396/404 部位、Ser422 部位ではリン酸化が亢進したが、MARK などがリン酸化する Ser262/356 部位では変化がなかった。比較的弱いリボトキシックストレスを誘導する T2 tetraol, HT2 toxin, vercarrol を添加すると、p38 および SAPK の活性化は弱く、またタウ蛋白のリン酸化も軽度であった。anisomycine, T2 triol を培地に添加した系にて SB202190 (p38 インヒビター) を同時に添加すると、SB202190 を添加しなかったものに比べてタウ蛋白のリン酸化は部分的に抑制されたが、SB202190 のみ添加されたものではタウ蛋白のリン酸化は変化なかった。また、lithium (グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 (GSK3) インヒビター) を添加すると、lithium のみの添加にてタウ蛋白は脱リン酸化されたが、さらに anisomycine,

T2 triol を添加すると、タウ蛋白のリン酸化は lithium のみを添加したものに比べて亢進した。よって、リボトキシックストレスによるタウ蛋白のリン酸化は GSK3 には非依存的で、p38 および SAPK の両方を介しているものと推定された。また、anisomycine, T2 triol などのリボトキシックストレス誘導剤は SY5Y 細胞ではアポトーシス非依存性の細胞死が認められた。

さらに rose bengal, methylene blue を添加し、光照射を行うと、SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化 (Ser396/404 部位) が亢進した。この変化は、azide によって強く阻害され、N-acetyl-cystein によってもある程度抑制され、この実験系におけるタウ蛋白リン酸化が酸化ストレスに依存することが示唆された。また、compactin 添加後に rose bengal を添加し光を照射したものは、compactin 添加なしで同様の処理をおこなったものに比べて、細胞死のレベルおよびタウ蛋白のリン酸化は増加した。コレステロールには singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスを減弱させる可能性が示唆された。

D. 考察

AD 脳内における A β 凝集機構は依然不明である。細胞外液中の A β は濃度は自然凝集に必要とされる濃度に遥かに及ばないこと、また AD 患者脳で A β 産生が増加ないしは A β 分解が減少していることを示す明確な事実は存在しないことから、AD 脳内における A β 凝集は、この蛋白濃度の上昇に依らない病的機構によって生じている可能性が考えられる。本主任研究者らは、過去において AD 初期脳に選択的に細胞膜糖脂質の一

つである GM1 ガングリオシドと結合した特異な A β 分子 (GM1-A β) が形成されることを見出し、この GM1-A β の特異な分子特性から、A β は GM1 ガングリオシドと結合することで構造変化を獲得し、可溶性 A β の凝集性を促進する“seed”となる可能性を指摘した。これまで国内外の研究者により *in vitro* の研究により我々の示した仮説は支持されているが、本研究によりより定量的且つ定性的な裏付けが与えられた。GM1 ガングリオシドと A β との結合は、GM1 ガングリオシドが存在する膜内のコレステロール濃度が高いほど生じやすいことが最近示され、今後は細胞内のコレステロール高含有膜ドメインでの A β 蓄積動態の解析が重要であると考えられた。

一方、A β の産生メカニズムについては、APP からの A β 切り出しに関わる酵素 (secretase) が同定され、その内、A β の C 末側を切断する γ -secretase はプレセニンである可能性が強く示唆されている。本研究によって、このプレセニンによる APP 切断の調節に関わる分子の候補が幾つかクローニングされた。今後、これらの分子の細胞内局在ならびに生理機能を検討し、A β 産生系の全体を解明し、家族性 AD 原因遺伝子発現等による A β の異常産生を抑制する細胞生物学的方法の開発に応用したい。

最後に、本研究班ではアポリポ蛋白 E の AD 発症における役割の解明を、アポリポ蛋白 E の生理機能であるコレステロール代謝調節の視点から進めている。これまでの研究により、アポリポ蛋白 E はアイソフォーム特異的に神経細胞のコレステロール動態に深く関わること、神経細胞のコレステロール・ホメオスタシスの破綻が神経原線維変化の分子基盤であるタウ蛋白の異常なリン酸化を誘導しうることを確認するとともに、神経細胞へのコレステロール輸送担体である HDL の

形成機構の詳細を検討した。近年、コレステロール代謝変動の AD 発症における役割が議論されているが、本研究の成果は AD 発症の危険因子であるアポリポ蛋白 E の役割まで遡り、且つ、AD の病理形態学的変化の誘導機構をも視野にいたした AD 発症病態の統合的理解に寄与するものと期待される。

E. 結論

AD 脳内における A β の異常凝集の分子機構を解明 A β の産生・凝集の分子機構に関して、産生調節に関わる新規の遺伝子のクローニングに成功するとともに、凝集開始に深く関わる seeding A β の *in vitro* 実験系を確立した。また、AD 発症の危険因子であるアポリポ蛋白 E の病的役割を解明すべく、HDL 形成機構を細胞生物学的に詳細に検討するとともに、アポリポ蛋白 E による神経細胞のコレステロール代謝調節、ならびに、コレステロール代謝障害のストレス応答、及び AD の病理学的変化誘導への影響を検討した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organellae in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* (in press)

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 by mitogenactivated protein kinase in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* (in press)

Fan Q-W, Yu-W, Senda T, Yanagisawa K, and Michikawa M. Cholesterol-dependent microtubule stabiliation by modulating tau phosphorylation.

J Neurochem 76:391-400,2001

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K.

Intracellular site of γ -secretase cleavage for A β 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur J Biochem* 267:2036-2045,2000

Fukuyama R, Mizuno T, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S and Yanagisawa K. Age-dependent change in the leve 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. *Eur Neurol* 43:155-160,2000

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* 43:161-169,2000

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C, 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* 162:51-60,2000

Tomimoto S, Tsujita M, Okazaki M, Usui S, Tada T, Ito S, Itoh M, Yokoyama S. Effect of probucol in lecithin-cholesterol acyltransferase deficient mice: Inhibition of two independent cellular cholesterol releasing pathways *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2001) in press.

Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okuyama-Noji K, Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: A study based on coronary angiography. *Atherosclerosis* (2001) in press.

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

Ito J, Nagayasu Y, Yokoyama S.

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

Tsujita M, Tomimoto S, Okumura-Noji K, Okazaki M, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol/phospholipid efflux and plasma high density lipoprotein level in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1485: 199-213,2000

Teo K K, Burton JR, Buller CE, Plante S, Catellier D, Tymchak W, Dzavik V, Taylor D, Yokoyama S, Terrence J. Montague on behalf of the SCAT investigators. Long term effects of cholesterol lowering and angiotensin-converting enzyme inhibition on coronary atherosclerosis: The Simvastatin/Enalapril Coronary Atherosclerosis Trial (SCAT). *Circulation* 102: 1748-1754,2000

Abe-Dohmae S, Suzuki S, Wada Y, Aburatani H, Vance DE, Yokoyama S. Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation induced by cAMP in a murine macrophage cell line. *Biochemistry* 39: 11092-11099, 2000

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

Suzuki S, Dohmae S, Fukutomi T, Ito S, Itoh M, Yokoyama S. Enhancement of the cAMP-induced apolipoprotein A-I-mediated cellular lipid release by calmodulin inhibitors W7 and W5 from RAW264 mouse macrophage cell line cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 36: 609-616, 2000

Yokoyama S. Release of cellular cholesterol: Molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta* 1529: 231-244, 2000

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

Tsujio I, Tanaka T, Kudo T, Nishikawa T, Shinozaki K, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Takeda M. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by protein kinase C delta: implication for regulation of tau phosphorylation. *FEBS Lett* 469:111-117,2000

Tanaka T, Tsujio I, Nishikawa T, Schinosaki K, Kudo T, Takeda M. Significance of Tau Phosphorylation and Protein Kinase Regulation in the Pathogenesis of Alzheimer Disease *Alzheimer Disease Associated Disorders* 14, Suppl. 1 S18-S24, 2000

Tanaka T, Tsujio I, Takeda M. Dephosphorylation of tau protein by neuropsychiatric drug. The 7th international conference on Alzheimer disease and related disorders. *Neurobiol. Aging (Abst.)* 21:S47, 2000.

Takeda M, Kudo T, Imaizumi K, Tanaka T, Nakamura Y, Tohyama M. Presenilin and ER stress in Alzheimer pathogenesis. The 7th international conference on Alzheimer disease and related disorders *Neurobiol. Aging (Abst.)* 21:S71,2000

2.学会発表

柳澤勝彦 分子レベルからみた危険因子
第41回 日本神経学会総会シンポジウム アルツハイマー病研究の進歩 2000年5月24-26日 松本

磯部一郎、柳澤勝彦、道川 誠
合成 amyloid b 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

柳澤勝彦 神経細胞のコレステロール代謝からみたアルツハイマー病成立機構
第23回 日本神経科学学会 2000年9月4-6日 横浜

柳澤勝彦 アルツハイマー病の基礎的観点からみた最新の論点
第19回 日本痴呆学会 サテライトシンポジウム 2000年9月28-29日 木更津

柳澤勝彦
Molecular antichaperone for A β aggregation
COE 国際シンポジウム「Alzheimer 病研究最新情報」 2000年9月30日 木更津

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- 第19回 日本痴呆学会 2000年9月28-29日 木更津

柳澤勝彦
アミロイド β 蛋白凝集開始機構における GM1 ガングリオシドの役割
第73回 日本生化学大会 シンポジウム「神経機能発現における糖鎖の役割」 2000年10月11-14日 横浜

川村勇樹、菊池 章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系におけるプレセニリン1の役割
第73回 日本生化学大会 2000年10月11-14日 横浜

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

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、
芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系における変異プレセニン
1 の抑制作用
第 43 回 日本神経化学学会 2000 年 10 月 18-20
日 金沢

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

バルプロ酸のタウ蛋白リン酸化抑制機序につい
て 第 20 回リチウム研究会、経団連会館国際会
議場 2000 年 4 月 22 日 東京

田中稔久、工藤喬、武田雅俊 アルツハイマー病
の診断マーカー シンポジウム 05「老年期痴呆
の基礎研究-最近の話題-」 第 23 回日本神経科学
会、横浜パシフィコ 2000 年月 4 日 横浜

田中稔久、辻尾一郎、和田健二、武田雅俊 リチ
ウムによるタウリン酸化制御について 第 19
回日本痴呆学会、かずさアカデミアパーク
2000 年 9 月 28 日 千葉

田中稔久、辻尾一郎、工藤喬、中村祐、田上真次、
森裕、小池裕子、神野由華、松本均彦、山森英長、
瀬川優子、福所英理子、武田雅俊 一次変性痴
呆治療のためタウ蛋白重合阻害についての研
究 第 33 回精神神経系薬物治療研究報告会、千
里ライフサイエンスセンター 2000 年 12 月 15

日 大阪

Fan Q-W, Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa
M. Cholesterol-dependent modulation of tau
phosphorylation and microtubule stabilization in
cultured neurons. 30th Society for Neuroscience
Annual Meeting, November, 2000, New Orleans,
USA.

Takeda M, Kudo T, Nakano Y, Nakamura Y, Tanaka T,
Katayama T, Imaizumi K, Tohyam M. Presenilin,
ER stress, and Alzheimer neurodegeneration Sixth
International Stockholm/ Springfield Symposium on
Advances in Alzheimer Therapy, Stockholm City
Conference Center, Apr, 5-8, 2000

Tanaka T, Tsujio I, Takeda M. Dephosphorylation of
tau protein by neuropsychiatric drug. The 7th
international conference on Alzheimer disease and
related disorders. Jul, 9-18, 2000, Washington, U.S.A.

Takeda M, Kudo T, Imaizumi K, Tanaka T, Nakamura
Y, Tohyama M. Presenilin and ER stress in
Alzheimer pathogenesis. The 7th international
conference on Alzheimer disease and related disorders
Jul, 9-18, 2000, Washington, U.S.A.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

アミロイド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の脳内沈着の初期過程を解明することを目的に、可溶性 Aβの凝集を促進する作用（seeding 作用）をもつ GM1 ガングリオシド結合型 Aβ (GM1-Aβ) の形成ならびに、それによる可溶性 Aβ凝集促進の分子機構を検討した。その結果、Aβが膜上の GM1 ガングリオシドと特異的に結合し、seed となって可溶性 Aβの凝集を促進し、形態学的にも典型的なアミロイド線維を形成することが確認された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) 脳内における Aβ蓄積機構を解明することは、AD の病態解明の上で最も重要な研究課題の一つである。本主任研究者らは初期 AD 脳内に、選択的に細胞膜を構成する糖脂質の一つである GM1 ガングリオシドと結合した特異な Aβ (GM1-Aβ) が形成されることを報告した。本研究は GM1-Aβの形成ならびに、それによる可溶性 Aβ凝集促進の分子機構を *in vitro* の実験系を用いて明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) liposome 作製

コレステロール (CH)、スフィンゴミエリン (SM)、フォスファチジルコリン (PC) を有機溶媒に溶解し、窒素ガス気流にて乾燥後、トリス生食緩衝液 (tris-buffered saline: TBS) 中で攪拌し、凍結・融解を反復の上、超音波破碎機にか

け、均一な liposome を形成させた。

(2) Aβの liposome 結合実験

¹²⁵I 標識 Aβ1-40 (アマシャム) とアイソトープ非標識 Aβ1-40 とを TBS 中で liposome と 37 度 C、30 分間、インキュベートし、遠心にて非結合 Aβを分離し、liposome を十分に洗浄後、結合 Aβのアイソトープ活性を測定した。

(3) Aβ凝集実験

Aβ凝集によるアミロイド線維化を定量的ならびに定性的に評価するにあたり、アミロイド構造を特異的に認識し、蛍光を発する薬剤である thioflavin T (ThT) を用いた。同時に、インキュベート液を遠心して得られた沈澱物の電子顕微鏡学的観察を行い、形態学的に Aβ線維の構造を観察した。

C. 研究結果

Liposome への Aβ結合は、GM1 ガングリオシドを含む liposome に特異的に認められた。この結合は GM1 ガングリオシドが存在する liposome

の脂質組成に大きく影響され、PC/GM1 liposome よりも SM/CH/GM1 liposome における場合に高度に観察された。また、A β と GM1 ガングリオシド含有 liposome との結合はインキュベーション直後から認められ、両分子の結合は lag time なく進むことが確認された。Liposome とのインキュベーションによる可溶性 A β の凝集促進を、脂質組成の異なる SM/CH/GM1、SM/CH、PC の3種の liposome を用いて検討したところ、SM/CH/GM1 liposome においてのみ A β 溶液とのインキュベーションによって著しい ThT 活性の上昇を認めた。一方、GM1 ガングリオシドを含まない SM/CH liposome、PC liposome と A β とのインキュベーションによつては ThT の上昇は認められなかった。SM/CH/GM1 liposome と A β とのインキュベーション溶液を遠心し、得られた沈殿物を電子顕微鏡にて観察したところ、ヘリカル構造を示す、幅約 10nm の、典型的なアミロイド線維の形成を確認した。

D. 考察

本主任研究者らは過去に初期 AD に選択的に GM1-A β を見い出したが、その形成メカニズムならびに可溶性 A β に対する凝集促進の分子機構は不明であった。最近、京都大学の研究グループが GM1 ガングリオシドと A β との結合は、GM1 ガングリオシドが存在する膜 (host membrane) の脂質組成に大きく影響されること、特にそのコレステロール濃度が重要であることを報告した (Matsuzaki and Horikiri, *Biochemistry*, 1999; Kakio et al., submitted)。本実験においても、SM/CH/GM1 liposome における A β の結合は、PC/GM1 liposome における場合よりも高度であることが確認され、先の彼等の報告を指示した。

GM1 ガングリオシドは細胞内では、コレステロールやスフィンゴミエリンの豊富なドメイン(ラフト)に高濃度で存在し、ラフト内には生理的にも A β が存在することが最近示されていることより、今後、細胞内ないしは細胞表面上での A β 凝集の可能性を GM1 ガングリオシドと A β との結合の視点から検討することが重要であると考えられた。

E. 結論

A β と GM1 ガングリオシドは膜表面上でにおいて結合し、可溶性 A β に対して seed として働き、その凝集を促進することが確認された。

F.健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1.論文発表

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide(MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* (in press)

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 by mitogenactivated protein kinase in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* (in press)

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

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama Y, Komano H and Yanagisawa K. Intracellular site of γ -secretase cleavage for A β 42 generation in Neuro 2a(N2a) cells harboring *presenilin 1* mutation. *Eur J Biochem* 267:2036-2045,2000

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. *Eur Neurol* 43:155-160,2000

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* 43:161-169,2000

Hayashi H, Mizuno T, Michikawa M, Haass C, 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* 162:51-60,2000

2.学会発表

柳澤勝彦 分子レベルからみた危険因子
第41回 日本神経学会総会シンポジウム アルツハイマー病研究の進歩 2000年5月24-26日 松本

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

柳澤勝彦 神経細胞のコレステロール代謝からみたアルツハイマー病成立機構
第23回 日本神経科学学会 2000年9月4-6日 横浜

柳澤勝彦 アルツハイマー病の基礎的観点からみた最新の論点
第19回 日本痴呆学会 サテライトシンポジウム 2000年9月28-29日 木更津

柳澤勝彦
Molecular antichaperone for A β aggregation
COE 国際シンポジウム「Alzheimer 病研究最新情報」

報」 2000年9月30日 木更津

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- 第19回 日本痴呆学会 2000年9月28-29日 木更津

柳澤勝彦
アミロイド β 蛋白凝集開始機構における GM1 ガングリオシドの役割
第73回 日本生化学大会 シンポジウム「神経機能発現における糖鎖の役割」 2000年10月11-14日 横浜

川村勇樹、菊池 章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系におけるプレセニン1の役割
第73回 日本生化学大会 2000年10月11-14日 横浜

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

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系における変異プレセニン1の抑制作用
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, Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau

phosphorylation and microtubule stabilization in cultured neurons. 30th Society for Neuroscience Annual Meeting, November, 2000, New Orleans, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

A β 産生に関与する γ -セクレターゼの解析

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 A β のN末端とC末端は、APPが、それぞれ、 β -セクレターゼと γ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。このうち、 γ -セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が担っていることが明らかとなってきた。平成12年度は、これら γ -セクレターゼ活性に必要な因子のcDNAを同定することを目標とした。スクリーニングを容易にするため、 γ -セクレターゼによる切断がおこると細胞がピューロマイシン耐性になるという独自の細胞株を樹立し、これを用いてスクリーニングを行った。この細胞を用いて、まず、ピューロマイシン耐性を与えるcDNAをセレクションし、このcDNAがA β 産生活性をもつかどうかを次に確認した。その結果、 γ -セクレターゼ活性を上げるcDNAを、少なくとも4種類同定し、このうちのひとつは、新規蛋白をコードするcDNAであることが明らかとなった。

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）患者の脳ではA β を主成分とする老人斑が多く観察されている。A β は細胞毒性を有し、A β の脳内蓄積がADにおいて深刻な問題となっている。

A β のN末端とC末端は、APPが、それぞれ、 β -セクレターゼと γ -セクレターゼと呼ばれるプロテアーゼによって切断を受けて産生される。 β -セクレターゼは、新規のアスパラギン酸プロテアーゼであることが明らかとなったが、 γ -セクレターゼについてはこれまでにない新しいタイプのプロテアーゼであることが明らかになりつつある。すなわち、 γ -セクレターゼ活性は、家族性アルツハイマー病原因遺伝子産物であるプレセニリンを含む複数の因子による複合体が

担っていることが明らかとなってきた。しかしながら、プレセニリン以外の因子に関して、どのような分子による複合体なのか、その実体は明らかとなっていない。

平成12年度は、これら γ -セクレターゼ活性に必要な因子のcDNAを同定することを目標とした。スクリーニングを容易にするため、 γ -セクレターゼによる切断がおこると細胞がピューロマイシン耐性になるという独自の系を構築し、これを用いてスクリーニングを行った。この系で、まず、ピューロマイシン耐性を与えるcDNAをスクリーニングし、このcDNAがA β 産生活性をもつかどうかを次に確認を行った。

B. 研究方法

γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定には、次の様な独自に開発したスクリーニング系を用いた。まず、A β の N 末端から γ -セクレターゼ切断部位を含む APP 領域 (C53) と Notch(Schroeter et al., Nature393:382-386 1998)の C 端側転写因子領域との fusion gene を安定に遺伝子導入した細胞株を得る。また、この細胞は、Notch の転写活性により、ピューロマイシン耐性遺伝子がオンとなるように作製する。すなわち、細胞内で C53-Notch キメラ蛋白が γ -セクレターゼによって切断を受け、Notch が遊離すると、細胞がピューロマイシン耐性になるという系を構築した。また、cDNA library をヒトの脳の mRNA より調製した。平成 12 年度は、この細胞株に cDNA library をトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性を与える cDNA をセレクトし、この cDNA が A β 産生活性をもつかどうかを確認することにより、 γ -セクレターゼ活性を促進する cDNA を単離する。

C. 研究結果

上記の fusion gene を安定に遺伝子導入された細胞 4X10⁶ を cDNA library でトランスフェクトした結果、32 クローンがピューロマイシン耐性となった。さらに、これら細胞の培地中に産生する A β をイムノプロット法により検出した結果、約半分の 12 クローンが、A β の産生をあげていることが明らかとなった。次にベクターの部分の塩基配列をプライマーにして PCR 法により、細胞中にある cDNA を単離し、これを、Human kidney 293 cells (HK293 細胞)に再びトランスフェクトし、APP から産生される A β に及ぼす影響を確認した。その結果、現在、4 種類の cDNA について、APP から産生される A β を上昇するこ

とが明らかとなった。現在これら cDNA の塩基配列の解析中であるが、このうちのひとつは、全く新規の蛋白をコードしていることが明らかとなった。

D. 考察

独自に開発したスクリーニング系を用いることにより、 γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA の同定できること明らかとなり、その結果、すくなくとも 4 種類の cDNA が γ -セクレターゼ活性を上げることが確認できた。今後は、まだ、未解析の cDNA を解析し、これらが、 γ -セクレターゼ活性複合体の構成因子なのか、あるいは、 γ -セクレターゼ活性を調節する因子なのか、その作用機構を明らかにする必要がある。

E. 結論

本研究により、独自に開発したスクリーニング系を用いることにより、 γ -セクレターゼ活性を上げる cDNA を 4 種類同定できた。また、このうちのひとつは、全く新規の蛋白をコードしていることがわかった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sudoh S, Hua G, Kawamura Y, Maruyama K, Komano H and Yanagisawa K.

Intracellular site of γ -secretase for Ab42 generation in Neuro 2a cells harboring presenilin 1 mutation. Eur. J. Biochem. 267:2036-2045,2000

Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Shibamoto S, Yanagisawa K and Komano H. Inhibitory effect of presenilin 1 mutation on the Wnt signaling pathway through enhance of phosphorylation of β -catenin (submitted)

2. 学会発表

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人

Wntシグナル伝達系におけるプレセニン1の役割

第73回 日本生化学会 2000年10月11-14日 横浜

川村勇樹、菊池章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人

Wntシグナル伝達系における変異プレセニン1の抑制作用

第43回 日本神経化学会 2000年10月18-20日 金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（予定）

1-1. A β 産生抑制剤の新しいスクリーニング系 1-

2. A β 産生に關与する新規遺伝子 GAF

厚生科学研究補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

アルツハイマー病におけるアポリポタン 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 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。これらの結果と、昨年度に我々が明らかにしたコレステロールの低下がタウのリン酸化を誘導するという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し、軸索の脱重合、シナプス形成能の低下を招くことを見いだした。本年度、我々は更に注目すべき事実として、(4) 凝集アミロイド β 蛋白は神経細胞からコレステロールを搬出して異常な HDL を形成し、(5) 凝集アミロイド β 蛋白が神経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。

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ソール：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

凝集させた A β 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 β 抗体を用いた免疫電顕により A β 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た。さらに、この凝集 A β 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思われる。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。昨年度は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を明らかにした。本年度は、さらにコレステロール代謝障害を持ち、タウの異常リン酸化を伴う神経原線維変化を来す疾患であるニーマンピック病のモデルマウス脳において、タウのリン酸化を確認した。ニーマンピック病はコレステロールの蓄積病であるが、利用可能なコレステロール量はむしろ減少していると考えられ、昨年度の我々の結果を *in vivo* でも確認できたことになる。また、本年はこれに加えて、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 β のような病的 A β 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。以上のような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線維変化、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 A β 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 A β 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 A β (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。こうした oligomerized A β 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, 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, Michikawa M.

3-(45-dimethylthiazol-2-yl)-25 dipheniltetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organellae in cultured rat astrocytes.

J. Neurochem. (in press)

Fan Q.W., Yu W, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M.

Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons.

J. Neurochem. 76: 391-400, 2001

Michikawa M, Fan Q-W., Isobe I, 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, Michikawa M.

A possible model of senile plaques using synthetic