

厚生科学研究費補助金

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成14 (2002) 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ipoprotein E の分子機構の解明 ————— 7  
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 ————— 12  
- 細胞内コレステロール輸送におけるスフィンゴリエリンの役割 -  
伊藤 仁一
3. 遺伝性脳髄黄色腫症の遺伝子異常および  
ミトコンドリア DNA 欠失細胞株の脂質・金属代謝異常に関する研究 ————— 16  
福山 隆一

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 20

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 22

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ミトコンドリア DNA 欠失細胞株を樹立し、コレステロール代謝金属代謝等について検討した。その結果、重合体を形成したアミロイドβ蛋白は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が、単体 Aβは強力な抗酸化作用を有することが明らかになった。また、脳内 HDL 産生細胞であるアストロサイトのコレステロール放出機構に関する研究では、細胞内でのコレステロール輸送に関わるスフィンゴミエリンの機能を検討した。apoAI は特異的にスフィンゴミエリン合成酵素の活性化を介してスフィンゴミエリンの合成を促進したが、スフィンゴミエリン合成を薬剤で抑制すると、ER から細胞質へのコレステロール移行、コレステロール合成およびコレステロール搬出のいずれもが抑制された。一方、ミトコンドリア形態および機能異常がアルツハイマー病脳で報告されていることから、ミトコンドリア DNA 欠失細胞株を樹立し、それを解析したところ、糖代謝の活性化、コレステロール量の減少、鉄およびその他の金属の蓄積、PHF タウ量の減少、酸化ストレスに対する脆弱性、等が認められ、アルツハイマー病脳の代謝障害細胞モデルとして病態解明および治療法の開発に利用できる可能性が示された。

分担研究者

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

速なスピードで進んでおり、高齢者の増加に伴う様々な課題に直面しつつある。加齢に伴う変化の一つとして中枢神経を含む幾つかの組織におけるコレステロール産生能の低下が報告されている。また脂質代謝に深く関与する apoE ε4 がアルツハイマー病をはじめとする age-related disease の危険因子であることが明らかにされている。従って、こうした神経変性疾患の発症機構の解明及びその治療法の開発には神経系にお

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

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とおして、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旨とする。

## B. 研究方法

(1) 神経系細胞（アストロサイトおよび神経細胞）における脂質代謝の全体を明らかにするために (1) 培養神経系細胞の脂質代謝に対する Aβ重合体の効果を搬出、合成の側面から検討する系の確立および解析、(2) 単体 Aβの神経細胞生存への影響の検討、(3) 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、(4) ラットアストロサイトの培養をすでに確立した方法により行った。

【アストロサイト培養法】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% trypsin 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% trypsin 溶液で処理し、ピペッティング後 6-well multitrays 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。

【脂質分析】Cholesterol (Cho), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC) 合成には 3H-acetate で、さらに SM, セラミドの合成は 14C-serine 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 1.2-1.007g/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。

### 【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。TLC により脂質を分析した。

### 【ミトコンドリア DNA 欠失細胞株の樹立】

mtDNA 欠失細胞作製において、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)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。ρ-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 (研究協力者、名古屋市立大学、堂前による)、GSH 量、ATP 量、5 種類の金属量 (研究協力者、京都薬科大学、桜井・中山による) を測定した。さらに、ウェスタンブロット法により、タウと PHF タウ蛋白、APP、プレゼニン-1 発現を検討した。ミトコンドリア移行シグナルを有する発現プラスミド (大阪大学若林先生より供与) を細胞に電氣的に導入し、その蛍光がミトコンドリアに局在するかどうかを検討した。

### (倫理面への配慮)

動物を用いた研究：マウスおよびラットの検体/材料を用いる場合や屠殺に際しては動物に苦

痛を与えないよう麻酔を使用した。また当研究計画に関連する動物実験はすべて、当施設の動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

ヒトの材料を用いた研究：健常者および患者と家族からのサンプルの解析に当たっては、事前にインフォームドコンセント得て行った。患者および家族の匿名性保持のため、姓名については患者の家族名のみ知らされたが、それ以外の名前および住所は主治医から告げられていない。その他患者および家族個人を特定できる情報はいっさい知らされていない。発表の際には患者・家族氏名は使われていない。以上の理由により、倫理上の問題はないと判断した。正常サイブリッド作製にあたっては 2 名の健常ボランティアの血小板を用いたので、倫理上の問題はない。

### C. 研究結果

重合体 A $\beta$ は DMSO に溶解後に PBS で 10 $\mu$ M にしたものを摂氏 37 度で 24 時間インキュベーションしたものを用いた。単体の A $\beta$ は用事調整したものをすぐに使用した。それぞれの A $\beta$ の添加前および処理後における重合度は Thioflavin-T アッセイおよび架橋剤処理による電気泳動/銀染色によって確認した。神経細胞をスカベンジャーなしの培地で培養すると、2 日後にはほぼすべての細胞が、金属（鉄）との反応により産生される活性酸素毒性により細胞死をおこすが、単体の A $\beta$ を 5 $\mu$ M 以上の濃度で加えるとこの細胞死は抑制された。この時、細胞内活性酸素の産生量も低下していた。また、単体 A $\beta$ は他の金属キレーターと同様に金属添加による細胞死は抑制したが、過酸化水素の細胞毒性は抑制できなかつた。以上を考え併せると、単体 A $\beta$ は活性酸素のスカベンジャーとし

て働いているのではなく、金属に結合することで活性酸素の産生を抑制し、細胞保護作用を發揮していると考えられた。重合体 A $\beta$ にはこの保護作用は認めなかつた。（道川）

AD や PEO および糖・脂質・金属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 p-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 Sp-0 細胞、Rp-0 細胞、Ip-0 細胞を数クローンずつ樹立できた。コントロールとしてヒト骨肉腫由来 143B 細胞とその p-0(p0206) (福井医大、米田先生より供与) を用いた。さらに、Sp-0 系と p0206 より正常者の血小板と融合させることにより、正常サイブリッド細胞を作製した。

乳酸産生の亢進より p-0 細胞は解糖系依存であることが確かめられたが、正常サイブリッドではこれは親細胞レベルにもどった。コレステロール量はすべての p-0 細胞において減少していた。Sp-0 細胞では鉄が、Ip-0、Rp-0 および p0206 細胞ではアルミ、亜鉛、マンガン、銅が上昇していた。p0206 細胞の正常サイブリッドではすべての金属量は親レベルにもどった。以上のことより、mtDNA 欠失によるミトコンドリアの機能異常により、糖代謝への変移、コレステロールおよび金属代謝異常が生じることが証明された。AD の大脳では糖・脂質・エネルギー・金属・カルシウム代謝が異常であるとする多数の報告があるが、これらが互いに連関して起るのか、その原因は何か、など代謝異常にかかわる疑問はほとんど解かれていない現状である。本研究は細胞モデルとはいえ、いくつかの代謝異常がミトコンドリア DNA 欠失によるミトコンドリア障

害というひとつの原因で誘導されることを証明し、さまざまな代謝の恒常性維持におけるミトコンドリアの重要性を明らかにした。(福山)

スフィンゴリエリナーゼ(SMase)処理されたアストロサイトは SM, PC, diacylglyceride(DG)の合成が促進された。また DG, SM の合成は phosphatidylcholine-specific phospholipase C 阻害剤と考えられている D609 によって抑制された。また 3H-serine からの SM の合成も D609 により抑制され、逆にセラミドの産生は促進された。これらの知見から、SMase 作用後の SM 合成は PC とセラミドから合成されることが示唆された。一方、apoAI で刺激されたアストロサイトも、定常状態と異なり、PC とセラミドを介して特異的に SM が促進された。

アストロサイトの apoAI 依存性のコレステロール搬出は、D609 によって抑制された。同様に、BALB3T3 や RAW264 などの細胞からの apoAI 依存性コレステロール放出も抑制された。D609 はコレステロールの de novo 合成を抑制したが、HMG-CoA reductase 活性には直接抑制作用を示さなかった。またコレステロール合成阻害剤である compactin や mevalotin によってスフィンゴリエリナーゼ合成は抑制されなかった。apoAI 依存性のコレステロール搬出には ER から細胞質へのコレステロール移行が重要なステップとなるが、D609 はこの細胞質へのコレステロール移行をも強く抑制した。(伊藤)

#### E. 結論

(1) A $\beta$ は単体として存在すれば、活性酸素産生を引き起こす金属イオンに結合し、その反応を抑制することで、強い抗酸化作用、神経保護作用を有することが示された。これは、同じ A $\beta$

といってもその存在形態が単体か重合体かによって、神経毒性を発揮するのか、神経保護作用を有するのか大きく異なることを示している。これらの結果は、A $\beta$ の重合体化を抑制することによる治療法開発の可能性が示されたと考えられる。

(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、アストロサイト細胞内スフィンゴリエリナーゼ合成に関連していた。すなわち、apoAI は特異的にスフィンゴリエリナーゼ合成酵素の活性化を介してスフィンゴリエリナーゼの合成を促進した。このスフィンゴリエリナーゼ合成を D609 で抑制すると、ER から細胞質へのコレステロール移行、コレステロール合成およびコレステロール搬出のいずれもが抑制された。

(3) 3 種類の p-0 細胞を樹立し、ミトコンドリア機能障害の影響を検討した。糖代謝異常、コレステロール代謝異常、金属蓄積やタウリン酸化調節変動などいくつかの代謝異常がミトコンドリア DNA 欠失によるミトコンドリア障害というひとつの原因で誘導されることを証明し、さまざまな代謝の恒常性維持におけるミトコンドリアの重要性を明らかにした。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N and Yanagisawa K.  
A novel action of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release.  
J Neurosci 21(18):7226-7235,2001

Sawamura N, Gong JS, Garver WS, Heidenreich

- RA, 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* 276:10314-10319,2001
- Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M.  
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organelles in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 77:274-280,2001
- Fan QW, 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 QW, 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. *J Amer Aging Assoc* 24: 1-10,2001
- Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80: 178-190,2002
- Garver WS, Krishnan K, Michikawa M, Francis Ga and Heidenreich RA.  
The Neimann-Pick C1 protein facilitates cholesterol transport to the *trans*-Golgi network and plasma membrane caveolae. *J Lipid Res* (in press)
- Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.  
Amyloid  $\beta$ -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* (in press)
- Suzuki T, Ito J, Takagi H, Saitoh F, Nawa H. and Shimizu H. Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Molecular Brain Res* 89:20-28,2001
- Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R and Yokoyama S. Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid, and caveolin-1 to cytosol in rat astrocytes. *J Biol Chem* (in press)
- Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, Furukawa T and Yokoyama S. An acidic fibroblast growth factor-like factor secreted into the brain cell culture medium upregulates apoE synthesis, HDL secretion and cholesterol metabolism in rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* (in press)
- Toba H, Fukuyama R, Sasaki M, Shiga K, Ishibashi S and Fushiki S.  
A Japanese patient with cerebrotendinous xanthomatosis was compound heterozygous for different mutations within two functional domains of CYP27. *Clin Genet* (in press)
2. 学会発表  
道川 誠  
アルツハイマー病の分子機構におけるコレステロールの役割  
第43回老年医学会学術集会 プレナリーレクチャー 2001年6月13日 大阪
- 柳澤勝彦、道川 誠、林 秀樹、澤村直哉、松崎勝巳  
脂質代謝とアルツハイマー病の分子病理  
第44回 日本神経化学学会 2001年9月26-28日 京都
- 道川 誠、范 企文、ユ ウエイ、千田隆夫、キョウ 建生、ゾウ クン、柳澤勝彦  
培養神経細胞におけるコレステロールによる樹状突起伸長調節作用の検討  
第44回 日本神経化学学会 2001年9月26-28日 京都
- キョウ 建生、柳澤勝彦、道川 誠  
Amyloid  $\beta$ -protein のコレステロール代謝に対する影響  
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重
- 澤村直哉、キョウ 建生、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠  
ニーマンピック病C型モデルマウスにおけるMAPKの活性化に伴うタウ蛋白の部位特異的なリン酸化  
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重
- 伊藤仁一、長安祐子、横山信治  
apoA-I 依存性コレステロール放出におけるスフィンゴミエリンの役割  
第44回日本神経化学学会 2001年9月26-28日 京都
- 上野幸子、伊藤仁一、長安祐子、横山信治  
セロトニンによるアストロサイトのコレステロール代謝調節  
第44回日本神経化学学会 2001年9月26-28日 京都

鳥羽裕恵、福山隆一、中瀬泰然、太田好美、  
才脇卓也、伏木信次  
神経系由来ミトコンドリア DNA 欠失細胞の樹  
立と特性の解析  
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日  
京都

福山隆一、鳥羽裕恵、中瀬泰然、坂口博史、  
向仲輝雄、才脇卓也、太田好美、伏木信次  
シュワン細胞由来の株細胞より樹立されたミト  
コンドリア DNA 欠失細胞( $\rho$ -0 細胞)はその他の  
組織由来の  $\rho$ -0 細胞とは異なった表現型を示す。  
第 6 回グリア研究会 2001 年 12 月 8 日 大阪

Michikawa M.  
Aggregation state-dependent actions of Amyloid  
 $\beta$ -protein.  
Cheju-Ajou University Joint Conference on  
Neuroscience. Feb. 21-22, 2002, Cheju, Korea

Michikawa M, Gong J. S., Fan Q-W,  
Sawamura N and Yanagisawa K.  
A novel action of amyloid  $\beta$ -protein in cellular  
lipid metabolism in the central nervous system.  
31th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
Nov.10-15,2001, San Diego, California,USA.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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

Amyloid  $\beta$ -蛋白(A $\beta$ )単体の中樞神経細胞に対する作用を検討した。A $\beta$ は単体で細胞外へ分泌され、その後、重合体さらに線維形成に至り脳内に沈着すると考えられるため重合状態の違いによる A $\beta$ の作用の検討が必要である。昨年度、我々は A $\beta$ 重合体が神経細胞からコレステロール、リン脂質などを搬出し細胞に取り込まれない異常な HDL 様粒子を形成最終的に細胞内コレステロール量を低下させることを明らかにした。これらの結果から、A $\beta$ 重合体が細胞内コレステロール量を低下させ、その結果シナプス可塑性の低下およびタウのリン酸化亢進を誘導し、最終的に細胞死を引き起こす可能性が示された。apoE は脂質の搬出と取り込みの双方の機構により脂質代謝の恒常性維持に貢献すると考えられるが、脂質搬出作用の強さにはアイソフォーム特異性があるためアイソフォームの違いが疾患発症に関連すると思われる。本年度は重合体ではない単体 A $\beta$ の作用について検討した。その結果、単体の A $\beta$ は細胞内コレステロール代謝に対して影響を与えないばかりでなく、強い抗酸化作用を持ち、むしろ神経細胞の保護作用を有することが明らかになった。単体 A $\beta$ の持つこのような強い抗酸化作用発揮の機構として、A $\beta$ が鉄や銅などの金属と結合し、金属による活性酸素の発生を抑制する機序が考えられた。従来から凝集または重合 A $\beta$ は活性酸素を産生することで強い神経細胞毒性を有することが知られているが、単体 A $\beta$ は強い神経保護作用を持つという結果は、疾患の予防法や治療法の開発に A $\beta$ の重合抑制という新たな視点を提供すると考えられた。

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。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、我々は 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。そこで我々は、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。昨年度、我々は更に注目すべき事実として、(4) 重合したアミロイド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) 神経細胞内コレステロール合成抑制を通して細胞内コレステロール量の減少を招くことを明らかにした。Aβの重合状態あるいは凝集状態の違いに依存した Aβの生物活性を検討することにより、アルツハイマー病における細胞レベルでの病態を明らかにすることを目的に、本年度は残された問題、すなわち単体 Aβの作用について検討を加えた。

## 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 6 ウェルで培養した。ペプチド研から購入した Aβ1-40 は、DMSO またはアンモニア水で溶解したものを用事調整して使用するか（単体 Aβ）、あるいは PBS で 10μM の濃度に希釈したものを 24 時間、摂氏 37 度でインキュベーションしたもの（重合 Aβ）を使用した。

（倫理面への配慮）

マウスおよびラットの検体/材料を用いる場合や屠殺に際しては動物に苦痛を与えないよう麻酔を用いた。また当研究計画に関連する動物実験はすべて、当施設の動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

## C. 研究結果

それぞれの Aβの添加前および処理後における重合度は Thioflavin-T アッセイおよび架橋剤処理による電気泳動/銀染色によって確認した。神経細胞をスカベンジャーなしの培地で培養すると、2 日後にはほぼすべての細胞が、金属（鉄）との反応により産生される活性酸素毒性により細胞死をおこすが、単体の Aβを 5μM 以上の濃度で加えるとこの細胞死は抑制された。この時、細胞内活性酸素の産生量も低下していた。また、単体 Aβは他の金属キレーターと同様に金属添加による細胞死は抑制したが、過酸化水素の細胞毒性は抑制できなかった。以上を考え併せると、単体 Aβは活性酸素のスカベンジャーとして働いているのではなく、金属に結合することで活性酸素の産生を抑制し、細胞保護作用を発揮していると考えられた。重合体 Aβにはこの保護作用は認めなかった。

## 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代謝変動がタウのリン酸化を促進することを、神経細胞培養系およびコレステロール代謝障害を持つニーマンピック病のモデルマウス脳において確認した。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ている。昨年度はこれに加えて、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重合体を形成した 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 $\beta$ 蛋白の重合体形成、凝集、沈着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、我々の研究結果は、(1)

アルツハイマー病患者の脳内（細胞外）で増加する A $\beta$ 重合体がコレステロール代謝を変動させ、

(2) 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亢進、シナプス可塑性の低下、および神経細胞死を招く、ということでアミロイドカスケードを説明できることを示している。このとき、apoE は A $\beta$ 重合体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。

このように一旦、重合体を形成した A $\beta$ はアミロイドカスケードの引き金を引き、病態を促進させるものがあることが示されたが、今回の我々の研究結果は、A $\beta$ であっても単体として存在すれば、それは活性酸素産生を引き起こす金属イオンに結合し、その反応を抑制することで抗酸化作用、神経保護作用を有することが示された。これは、同じ A $\beta$ といってもその存在形態が単体か重合体かによって、神経毒性を発揮するのか、神経保護作用を有するのか大きく異なることを意味している。現在、アルツハイマー病の治療戦略として A $\beta$ の産生抑制、A $\beta$ の分解促進、A $\beta$ の除去効率の亢進等の視点があげられているが、今回の我々の研究結果は、A $\beta$ の重合化を抑制することにより A $\beta$ の毒性発揮を予防するのみにとどまらず、単体 A $\beta$ の神経保護作用を発揮させることができることを示しており、A $\beta$ の重合体化を抑制することによる治療法開発の可能性を示されたと考えられる。

## E. 結論

本研究により、A $\beta$ は単体として存在すれば、活性酸素産生を引き起こす金属イオンに結合し、

その反応を抑制することで、強い抗酸化作用、神経保護作用を有することが示された。これは、同じA $\beta$ といってもその存在形態が単体か重合体かによって、神経毒性を発揮するのか、神経保護作用を有するのか大きく異なることを示している。これらの結果は、A $\beta$ の重合体化を抑制することによる治療法開発の可能性が示されたと考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N and Yanagisawa K.

A novel action of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release. *J Neurosci* 21(18):7226-7235,2001

Sawamura N, Gong JS, Garver WS, Heidenreich RA, 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* 276:10314-10319,2001

Isobe I, Yanagisawa K and Michikawa M. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) causes Akt phosphorylation and morphological changes in intracellular organellae in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 77:274-280,2001

Fan QW, 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 QW, 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. *J Amer Aging Assoc* 24: 1-10,2001

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80: 178-190,2002

Garver WS, Krishnan K, Michikawa M, Francis Ga and Heidenreich RA. The Niemann-Pick C1 protein facilitates cholesterol transport to the *trans*-Golgi network and plasma membrane caveolae. *J Lipid Res* (in press)

Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M. Amyloid  $\beta$ -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* (in press)

##### 2. 学会発表

道川 誠

アルツハイマー病の分子機構におけるコレステロールの役割  
第43回老年医学会学術集会 プレナリーレクチャー 2001年6月13日 大阪

柳澤勝彦、道川 誠、林 秀樹、澤村直哉、松崎勝巳

脂質代謝とアルツハイマー病の分子病理  
第44回 日本神経化学会 2001年9月26-28日 京都

道川 誠、范 企文、ユ ウエイ、千田隆夫、キョウ 建生、ゾウ クン、柳澤勝彦  
培養神経細胞におけるコレステロールによる樹状突起伸長調節作用の検討  
第44回 日本神経化学会 2001年9月26-28日 京都

キョウ 建生、柳澤勝彦、道川 誠

Amyloid  $\beta$ -proteinのコレステロール代謝に対する影響  
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重

澤村直哉、キョウ 建生、二宮治明、大野耕策、柳澤勝彦、道川 誠

ニーマンピック病C型モデルマウスにおけるMAPKの活性化に伴うタウ蛋白の部位特異的なリン酸化  
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重

Michikawa M.

Aggregation state-dependent actions of Amyloid  $\beta$ -protein.  
Cheju-Ajou University Joint Conference on Neuroscience

Feb. 21-22, 2002, Cheju, Korea

Michikawa M, Gong J. S., Fan Q-W,  
Sawamura N and Yanagisawa K.

A novel action of amyloid  $\beta$ -protein in cellular  
lipid metabolism in the central nervous system.  
31th Society for Neuroscience Annual Meeting,  
Nov.10-15,2001, San Diego, California, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

神経系細胞におけるコレステロール efflux 機構の解明

— 細胞内コレステロール輸送におけるスフィンゴミエリンの役割 —

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

これまでの研究で、アストロサイトをアポリポタンパク A-I (apoAI) で刺激すると、細胞質 caveolin1 と cyclophilin A との協調により ER で合成されたコレステロールが細胞質へと移行し、これらが特異的に細胞質内リボタンパク粒子を形成して細胞膜まで輸送されることを見出した。本研究では、こうした apoAI 作用後のコレステロール細胞内輸送における de novo 合成されたスフィンゴミエリンの関与を検討した。

apoAI で刺激されたラットアストロサイトはスフィンゴミエリナーゼ (SMase) で処理された時と同様にセラミドとホスファチジルコリン (PC) からスフィンゴミエリン (SM) の合成が特異的に促進された。apoAI による SM 合成を D609 で抑制すると、apoAI 依存性のコレステロール放出が抑制された。また、D609 はアストロサイトのコレステロール合成を抑制したが、in vitro では HMG-CoA reductase を抑制しなかった。一方、コレステロール合成抑制剤は SM 合成を抑制しなかった。これらの知見から、D609 は SM 合成抑制を介して間接的にコレステロール代謝を抑制することが示唆された。D609 は apoAI 刺激によるコレステロールの細胞質への移行を抑制することから、apoAI 作用後、細胞内において合成された SM はコレステロールの細胞内輸送の初期反応に関与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タンパク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、中枢神経系組織には神経系細胞間コレステロール輸送の調節機構を含む、固有のコレステロールホメオスタシスに関わる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・輸送に中心的な役割をもつことが考えられる。

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、特に脳内 HDL 産生細胞であるアストロサイトのコレステロール放出機構に焦点を合わせ、今回はアストロサイト細胞

内でのコレステロール輸送に関わるスフィンゴ  
ミエリンの機能を検討した。

## 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% trypsin 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% trypsin 溶液で処理し、ピペッティング後 6-  
well multitray あるいは petri dish (直径 15cm)  
にはん種し、1週間 secondary culture し、実験  
に供した。

### (2) 脂質分析

cholesterol (Cho), sphingomyelin (SM),  
phosphatidylcholine (PC) 合成には 3H-acetate  
で、さらに SM, セラミドの合成は 14C-serine 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。

(3) 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。TLC により脂質を分析した。

(倫理面への配慮)

ラットあるいはマウスの検体を用いる場合はエ

ーテル麻酔により苦痛を与えないよう心掛けた。

## C. 研究結果

スフィンゴミエリナーゼ (SMase) 処理され  
たアストロサイトは SM, PC, diacylglyceride  
(DG) の合成が促進された。また DG, SM の合  
成は phosphatidylcholine-specific  
phospholipase C 阻害剤と考えられている  
D609 によって抑制された。また 3H-serine から  
の SM の合成も D609 により抑制され、逆に  
セラミドの産生は促進された。これらの知見か  
ら、SMase 作用後の SM 合成は PC とセラミ  
ドから合成されることが示唆された。一方、  
apoAI で刺激されたアストロサイトも、定常状  
態と異なり、PC とセラミドを介して特異的に  
SM が促進された。

アストロサイトの apoAI 依存性のコレステ  
ロール搬出は、D609 によって抑制された。同様  
に、BALB3T3 や RAW264 などの細胞からの  
apoAI 依存性コレステロール放出も抑制され  
た。D609 はコレステロールの de novo 合成を  
抑制したが、HMG-CoA reductase 活性には直接  
抑制作用を示さなかった。またコレステロール  
合成阻害剤である compactin や mevalotin によ  
ってスフィンゴミエリン合成は抑制されなかつ  
た。apoAI 依存性のコレステロール搬出には  
ER から細胞質へのコレステロール移行が重要  
なステップとなるが、D609 はこの細胞質へのコ  
レステロール移行をも強く抑制した。

## D. 考察

アストロサイトは exogenous apoAI に反応し  
てコレステロールを放出するがコレステロール  
搬出量は低く、しかも一時的なものである。細胞

膜コレステロールは特に caveolae domain に分布するスフィンゴリエリンによって強く制御されており、スフィンゴリエリナーゼで前処理することにより、caveolae domain に分布するコレステロールの流動性が著しく上昇し、apoAI 依存性のコレステロール搬出も大きく促進される。しかしながら、スフィンゴリエリンの de novo 合成の上昇と共に apoAI によるコレステロール搬出はふたたび減少する。これまでの研究で得られた上述の知見を基に、本研究では SMase 処理後のスフィンゴリエリン合成を抑制した時に、apoAI によるコレステロール搬出が継続して促進されるかどうかを調べると同時に、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およびコレステロール搬出における細胞内スフィンゴリエリンの機能が検討された。

本研究で、apoAI は特異的にアストロサイトのスフィンゴリエリン合成をホスファチジルコリンからセラミドへのホスホコリン転移反応を介して促進することがわかった。また、スフィンゴリエリナーゼ処理後、D609 でスフィンゴリエリンの合成を抑制すると、予想に反して apoAI によるコレステロールの細胞外への搬出は抑制された。このことは、apoAI によるコレステロールの搬出がスフィンゴリエリンの de novo 合成に依存することを示唆した。

D609 はスフィンゴリエリンの合成のみならず、コレステロールの合成も抑制した。apoAI で刺激されたアストロサイトは、caveolin1 と cydophilin A との協同作用により ER から細胞質へのコレステロール移行が促進され、続いて ER 膜上での SREBP の processing が進み、さらにコレステロール合成が促進され、細胞膜へのコレステロール供給が継続されると同時に apoAI

によるコレステロール搬出が促進される。一方、コレステロール合成の抑制剤である compactin や mevalotin がスフィンゴリエリンの合成を抑制しないことから、apoAI 作用後のスフィンゴリエリンの合成はコレステロール合成系の上流にあつてこれを制御していることが考えられる。これらの知見から、スフィンゴリエリンの de novo 合成はコレステロールの合成を間接的に制御し、apoAI によるコレステロール搬出に対し、正の制御をしていることが示唆された。

apoAI 刺激によって、アストロサイトの細胞内ではコレステロール合成や細胞外への搬出に先立って、ER から細胞質へのコレステロールの移行が促進される。細胞膜のスフィンゴリエリンが apoAI によるコレステロール搬出に抑制的に作用すること、また D609 が apoAI によるコレステロールの細胞質への移行を阻害したことは、de novo 合成されたスフィンゴリエリンが細胞膜でのコレステロール放出に直接関与するのではなく、apoAI 刺激後の細胞内コレステロール輸送の初期反応に大きく関与していることを示唆するものである。

## E. 結論

apoAI 作用後のアストロサイト細胞内スフィンゴリエリン合成のコレステロールの細胞内輸送およびコレステロール搬出における機能について検討した。apoAI は特異的にスフィンゴリエリン合成酵素の活性化を介してスフィンゴリエリンの合成を促進した。このスフィンゴリエリン合成を D609 で抑制すると、ER から細胞質へのコレステロール移行、コレステロール合成およびコレステロール搬出のいずれもが抑制された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki T, Ito J, Takagi H, Saitoh F, Nawa H. and Shimizu H. Biochemical evidence for localization of AMPA-type glutamate receptor subunits in the dendritic raft. *Molecular Brain Res* 89:20-28, 2001

Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R and Yokoyama S. Apolipoprotein A-I induces translocation of cholesterol, phospholipid, and caveolin-1 to cytosol in rat astrocytes. *J Biol Chem* (in press)

Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, Furukawa T and Yokoyama S. An acidic fibroblast growth factor-like factor secreted into the brain cell culture medium upregulates apoE synthesis, HDL secretion and cholesterol metabolism in rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* (in press)

2. 学会発表

伊藤仁一、長安祐子、横山信治  
apoA-I 依存性コレステロール放出におけるスフィンゴリエリンの役割  
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

上野幸子、伊藤仁一、長安祐子、横山信治  
セロトニンによるアストロサイトのコレステロール代謝調節  
第 44 回日本神経化学会 2001 年 9 月 26-28 日 京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

遺伝性脳腱黄色腫症の遺伝子異常および

ミトコンドリア DNA 欠失細胞株の脂質・金属代謝異常に関する研究

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

研究要旨

コレステロール代謝異常が脳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腱黄色腫症一例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脂質・金属代謝やアルツハイマー病(AD)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。また、正常ミトコンドリア DNA をこれにもどしたサイブリッド細胞をも数種類樹立した。親細胞、mtDNA 欠失細胞、正常サイブリッド細胞を比較検討した結果、mtDNA 欠失細胞における 1) 糖代謝の活性化 2) コレステロール量の減少 3) 鉄およびその他の金属の蓄積 4) PHF タウ量の減少 5) 蛋白質のミトコンドリア移行機能維持 6) 細胞種により異なる酸化ストレスに対する脆弱性、が認められ、少なくとも糖代謝への変移と金属の過剰蓄積は mtDNA に依存性であることが見いだされた。AD 脳におけるさまざまな代謝変化を示す細胞モデルと位置付けられる細胞モデルが得られたことで、AD の病態発生の研究、疾患マーカーの探索および治療薬剤のスクリーニングなど促進されるだろう。

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; Fukuyama et al., 2001)。また、疾患モデルとなる可能性のある遺伝性疾患 CTX

と PEO の原因遺伝子変異を同定した(Shiga et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999; Saiwaki et al., *Mol Pathol*, 2001)。今年度の目的は前年に引き続き、1)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、2)mtDNA 欠失細胞と正常サイブリッドの作製、それらとコレステロール、金属代謝異常との関連および AD 脳関連分子の変化を検討することである。

B. 研究方法

CTX の解析には一昨年度報告した研究(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 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( $\rho$ -0 化)、クローニングした。 $\rho$ -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(研究協力者、名古屋市立大学、堂前による)、GSH 量、ATP 量、5 種類の金属量(研究協力者、京都薬科大学、桜井・中山による)を測定した。さらに、ウエスタンブロット法により、タウと PHF タウ蛋白、APP、プレゼニリン-1 発現を検討した。ミトコンドリア移行シグナルを有する発現プラスミド(大阪大学若林先生より供与)を細胞に電気的に導入し、その蛍光がミトコンドリアに局在するかどうかを検討した。

(倫理面への配慮)

健常者の DNA に関しては昨年度報告の通り。また、本 CTX 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。

正常サイブリッド作製にあたっては 2 名の健常ボランティアの血小板を用いたので、倫理上の問題はない。

#### 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(Clin. Genet., inpress)。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ケースではある。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。

AD や PEO および糖・脂質・金属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  $\rho$ -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  $S\rho$ -0 細胞、 $R\rho$ -0 細胞、 $I\rho$ -0 細胞を数クローンずつ樹立できた。コントロールとしてヒト骨肉腫由来 143B 細胞とその  $\rho$ -0( $\rho$ 0206) (福井医大、米田先生より供与) を用いた。さらに、 $S\rho$ -0 系と  $\rho$ 0206 より正常者の血小板と融合させることにより、正常サイブリッド細胞を作製した。

乳酸産生の亢進より  $\rho$ -0 細胞は解糖系依存であることが確かめられたが、正常サイブリッドではこれは親細胞レベルにもどった。コレステロール量はすべての  $\rho$ -0 細胞において減少していた。 $S\rho$ -0 細胞では鉄が、 $I\rho$ -0、 $R\rho$ -0 および  $\rho$ 0206 細胞ではアルミ、亜鉛、マンガン、銅が上昇していた。 $\rho$ 0206 細胞の正常サイブリッドではすべての金属

量は親レベルにもどった。以上のことより、mtDNA欠失によるミトコンドリアの機能異常により、糖代謝への変移、コレステロールおよび金属代謝異常が生じることが証明された。ADの脳では糖・脂質・エネルギー・金属・カルシウム代謝が異常であるとする多数の報告があるが、これらが互いに連関して起るのか、その原因は何か、など代謝異常にかかわる疑問はほとんど解かれていない現状である。本研究は細胞モデルとはいえ、いくつかの代謝異常がミトコンドリアDNA欠失によるミトコンドリア障害というひとつの原因で誘導されることを証明し、さまざまな代謝の恒常性維持におけるミトコンドリアの重要性を明らかにした。ミトコンドリアの機能および形態異常は老人斑のまだ見られない病初期よりAD患者脳に見い出されることから、孤発例のADの病態発生において、トリガーとなる環境要因は、それがどのようなものであれ、まずミトコンドリアの障害を引き起こす、と考えればAD脳において多くの代謝障害が同時に発生することが理解される。今後、ADを引き起こす要因を検討する際には、ミトコンドリア障害を慢性に発する環境中の因子に注目すべきであろう。前年度のAD患者の脳脊髄液中のGFAP蛋白の検討より、アストログリアも変性しているとの知見を報告している(Fukuyama et al., Eur J Neurol, 2000)。ADを引き起こす環境要因は神経細胞のみならず、アストロ細胞のミトコンドリアをも傷害する比較的毒性の高いものと推定される。鉄などの遷移金属増加のメカニズムは全く不明であるが、mtDNA欠失細胞に正常 mtDNAをもどすとこれが親細胞レベルにもどったので、この金属蓄積はmtDNA依存性であったことがわかる。今後、本細胞を用いてその機序を検討する必要がある。

SILAとSp-0細胞におけるAPP、プレゼニン-1 および全タウ蛋白量に大きな差は見られなかったが、PHF タウ発現が著減していた。PHFをリン酸化する酵素としてGSK3 $\beta$ 、CDK5、MAPKなどが報告されているが、in vivoにおいてその機能が示されているのはGSK3 $\beta$ である。これはグリコーゲン合成酵素のリン酸化酵素でもあり、mtDNA欠失細胞における糖代謝への変移という連関で考えると、mtDNA欠失細胞ではGSK3 $\beta$ 活性が抑制され、PHF産生が抑制されるとともに、グリコーゲンが蓄積するとの可能性が考えられる。糖代謝異常とPHFおよび $\beta$ アミロイド産生の連関については今後の検討を要する興味深いテーマである。

#### 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) 3種類のp-0細胞を樹立し、脂質代謝異常、金属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。ミトコンドリアの慢性異常がPHF産生をむしろ抑制することを見い出した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Toba H, Fukuyama R, Sasaki M, Shiga K, Ishibashi S, Fushiki S.  
A Japanese patient with cerebrotendinous xanthomatosis was compound heterozygous for different mutations within two functional domains of CYP27. Clin Genet (in press)

##### 2. 学会発表

鳥羽裕恵、福山隆一、中瀬泰然、太田好美、