

れる。従って我々は、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した。一昨年度までに、apoE がコレステロールを含む脂質代謝を搬出の面からアイソフォーム特異的に制御していることを明らかにした。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。また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、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、タウのリン酸化の亢進を確認した。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る。また、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 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 蛋白の重合体形成、凝集、着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)で増加する重合体 A β がコレステロール代謝を変動させ、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。

以上のように昨年までの我々の研究から、一連のアミロイドカスケードの引き金を引き、促進させるものが重合体 A β であることが示されたが、今回の我々の研究結果は、A β 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 β 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 β の産生抑制、A β の分解促進、A β 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 β の重合化を抑制することにより A β の毒性発揮を予防するのみにとどまらず、単体 A β 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 β 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 β 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 β 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 β 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 β -protein (A β): oligomeric A β 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 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 β -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 ウェイ、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 β -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, Gong J. S., Fan Q-W, Sawamura N and Yanagisawa K.

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

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

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（脳科学研究事業）

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

分担研究者 横山信治 名古屋市立大学大学院医学研究科代謝細胞生化学 教授

研究要旨

中枢神経系のステロール代謝平衡と障害修復に於けるその役割を明らかにするため、脳内脂質代謝の中心となるアストロサイトについて検討した。ラット・アストロサイトはアポEを合成し HDL を分泌する一方、外因性アポA I と反応しても HDL を生ずる。この HDL 新生反応に使われるコレステロールが細胞質内を caveolin-1 と cyclophilin A に結合した粒子として輸送されることが同定された。またアストロサイトのアポE合成・HDL 分泌・コレステロール生合成、は自ら産生する酸性 FGF の autocrine 刺激により著明に増加し、これらは中枢神経系障害修復機転に於けるアストロサイトの重要な役割を示すと考えられる。ApoE ノックアウトマウスのアストロサイトを用いて検討すると、aFGF はコレステロール生合成を apoE 生合成とは独立に増強するが、apoJ-HDL 新生を促進せず、利用コレステロールコンパートメントが異なることを示唆した。

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

ラットまたはマウス胎児脳より分離培養したアストロサイトを用いた。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。

（倫理面への配慮）

本研究の実施にあたっては実験動物としてマウ

スを用いるが、その使用にあたっては屠殺を麻酔下において実施する等の十分な配慮を加える。動物愛護上問題となる実験手技は本研究の遂行上にはないと考えられる。

C. 研究結果

アストロサイトによる HDL 新生反応において、新たに生合成されたコレステロールと磷脂質はアポ A-I 刺激によって細胞質内に転移し caveolin-1 と cydophilin A に結合した HDL 粒子として現れる。これは時間的にはこのコレステロール分子が細胞外に新生する HDL 粒子に組み込まれる以前である。またアストロサイトのアポE合成・HDL 分泌・コレステロール生合成、は自ら産生する酸性 FGF の autocrine 刺激により著明に増加し、これらは中枢神経系障害修復機転に於けるアストロサイトの重要な役割を示すと考えられる。ApoE ノックアウトマウスのアストロサイトを用いて検討すると、aFGF はコレステロール生合成を apoE 生合成とは独立に増強するが、apoJ-HDL 新生を促進せず、利用コレステロールコンパートメントが異なることを示唆した。apoE ノックアウトマウスでは、脳の冷凍障害後の障害修復が遅く、この時患側ではアストロサイトに 酸性 FGF の著明な増加と apoE ノックアウトに於ける開腹の遷延が認められた。

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。さらにアストロサイトは自ら産生する酸性

FGF の作用により apoE-HDL の分泌を増加させることが分かった。その結果神経細胞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ーコレステロール含有 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役割を持つものと推定される。細胞内コレステロールは細胞質内を運ばれて後者の反応に供給され、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ーコレステロールに富んだドメインの機能に依存する。前者の反応は、神経細胞からの酸性 FGF に応答して発現し、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.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tomimoto S, Tsujita M, Okazaki M, Usui S, Tada T, Ito S, Itoh M and 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* 21: 394-400,2001

Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okuyama-Noji K and Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: A study based on coronary angiography. *Atherosclerosis* 159: 153-163,2001

Kojima K, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Murakami I, Suzumori K and Yokoyama S. Progesterone inhibits apolipoprotein-mediated cellular lipid release: a putative mechanism for the decrease of HDL. *Biochim Biophys Acta* 1532: 173-184,2001

Tanaka A R, Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, Yokoyama S and Ueda K. Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 283:1019-1025,2001

Okumura-Noji K, Sasai K, Zhan R, Kawaguchi H, Maruyama H, Tada T, Takahashi H, Okazaki M, Miida T, Sakuma N, Kimura G, Ohta N and Yokoyama S. Cholesteryl ester transfer protein-deficiency causes slow egg embryonation of schistosoma japonicum. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 305-310,2001

Li O, Yokoyama S and Agellon L B. Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* (in press)

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)

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

伊藤仁一、長安祐子、横山信治
スフィンゴリエリンによるラットアストロサイトの細胞内コレステロール輸送の促進
第 74 回日本生化学 2001 年 10 月 25-28 日
京都

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S. Stimulation by acidic FGF of cholesterol metabolism of rat astrocytes. The 14th Biennial Meeting of the International Society for developmental Neuroscience, Jan.31-Feb.4,2002, Sydney, Australia

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 横山信治他、「アポリポ蛋白質 E の分泌促進剤」2001. 8. 31、特願 2001-263547
- 2) 横山信治他、「低 HDL 血症改善剤」2001.10.12、特願 2001-314756

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

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

分担研究者 田中稔久 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学 助手

研究要旨

変異プレセニリンに関連すると言われる ER ストレス脆弱性に関連して、その ER に局在するリボソームに対する蛋白翻訳阻害ストレス（リボトキシックストレス）について検討をおこなった。核酸の酸化を誘導する singlet oxygen を介する酸化ストレスによってリボトキシックストレスは誘導され、タウ蛋白のリン酸化をとまなう細胞死が観察されたが、cholesterol にはこの酸化ストレスを抑制する機序があることが示唆された。

A. 研究目的

高齢化社会になる現在、アルツハイマー病 (AD) などの痴呆性疾患への対策は重要な課題である。しかし、その発症機序の分子メカニズムについては不明な点が多く、根本的治療法は存在しない。家族性 AD の原因遺伝子として 1995 年に同定されたプレセニリンはこの β アミロイド蛋白の生成に密接に関与していることが報告されているが、これとは別にプレセニリン変異は小胞体 (ER) 内蛋白コンフォメーション異常に伴う ER ストレス対応機構の障害と密接に関与することが報告された (Katayama T, et al., Nature Cell Biol 1,479-485,1999)。この報告によると、プレセニリンは Ire 1 という ER 上のセンサー蛋白と結合しており、tunicamycin 等により蛋白コンフォメーション異常を誘導する (ER ストレス) と通常は Ire 1 の経路を通過して GRP78 などの分子シャペロンが誘導されるのだが、プレセニリン変異を持つ細胞は ER ストレスに暴露すると GRP78

を誘導できずアポトーシスを起こしやすいという。ところで、もともと ER にはリボソームの付着する rough ER とリボソームの付着しない smooth ER とに分類され、アルツハイマー病脳の電子顕微鏡的検討によるとリン酸化タウ蛋白は電子顕微鏡的には rough ER に多いという報告がある (Papasozomenos S, Lab Invest 60,375-389,1989)。小胞体と AD におけるタウ蛋白リン酸化との関連を考えた場合、通常の ER ストレス (tunicamycin, thapsigargin、カルシウムイオンフォア等の添加) ではタウ蛋白のリン酸化レベルは一定のままかむしろ脱リン酸化が誘導されることが知られており、ER ストレス脆弱性だけでは AD 脳の病理は説明できない。そこで、昨年度はリボソームにおける蛋白合成 (翻訳) が阻害された時に反応性に SAPK や p38 MAP といったストレス関連キナーゼが活性化し細胞死が誘導されるストレス、すなわちリボトキシックストレス (Iordanov M, Mol Cell Biol 17,3373-3381,1997,

Iordanov M, JBC 273,15794-15803,1998, Shifrin V, JBC 274,13985-13992,1999)について、タウ蛋白のリン酸化および細胞死への影響を検討した。anisomycine, T2 triolなどのリボトキシックストレス誘導剤の添加によって、SY5Y 細胞ではアポトーシス非依存性の細胞死が認められ、また p38 MAP キナーゼおよび SAPK 依存性のタウ蛋白リン酸化亢進が認められた。さらに、このようなりボトキシックストレスを核酸 (Ribosomal RNA) の酸化によって誘導するために、singlet oxygen を誘導することが知られている rose bengal または methylene blue などの色素を添加し光照射を行うと、SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化が亢進した。そこで、今年度はこの singlet oxygen の誘導に伴うタウ蛋白リン酸化と核酸の酸化および cholesterol の影響について検討をおこなった。

B. 研究方法

SY5Y 神経芽細胞腫は 5% FCS を含む D-MEM/F-12 にて培養し、singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスとして色素 (2 μ g/ml rose bengal, 2 μ g/ml methylene blue) を添加後さらに光 (100W、10cm) を照射し、30 分から 2 時間後までの細胞を集めた。このとき、singlet oxygen のスカベンジャーとなる 1mM azide, 一般に抗酸化剤としてよく使用される 30 mM N-acetyl-L-cystein を同時添加したのも同様の系にて検討した。さらに、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 cholesterol を deplete したのも、1 μ M compactin と同時に 1 μ g/ml cholesterol を添加して内因性 cholesterol 合成を阻害すると同時に外因性 cholesterol を補充したのものについても同様の系

にて検討した。細胞はバッファー (100 mM PIPES, pH6.8, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml aprotinine, 5 μ g/ml leupeptine, 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、p38 MAP キナーゼまた 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、核酸 (ribosomal RNA) への酸化を確認するために、細胞から RNA isolation kit (Ambion)を用いて RNA を回収し、それをアガロース/ポリアクリルアミドゲルに電気泳動させた後ニトロセルロース膜に転写し、抗 8-ヒドロキシグアノシン抗体 (1F7 抗体) を用いてウエスタンブロットの要領で 28S および 18S の ribosomal RNA の酸化を解析した。さらに、細胞死のレベルは Live and Dead kit (Molecular Probe より購入)にて測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた実験であるので、特に倫理面への配慮は必要としていない。

C. 研究結果

核酸への酸化ストレス導入法として色素 rose bengal または 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、 Thr231/Ser235、 Ser422 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、1 μ g/ml 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、タウ蛋白のリン酸化は増加し、さらに 1 μ M compactin と同時に 1 μ g/ml cholesterol を添加して外因性に cholesterol を補充したものについては、タウ蛋白リン酸化の増加は減弱した。よって、cholesterol 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。このタウ蛋白リン酸化の変化は p38MAPK および SAPK のリン酸化と対応しており、cholesterol はタウリン酸化キナーゼの上流で効果をもつことが示唆された。そこで、28S および 18S ribosomal RNA の酸化のレベルを抗 8-ヒドロキシグアノシン抗体 (1F7 抗体) を用いて検討したところ、compactin の添加後に 2 μ g/ml rose bengal 添加後光照射をおこなった細胞では 28S および 18S ribosomal RNA の酸化が増大していたが、compactin と同時に cholesterol を添加して外因性に補充したものについては compactin のみを添加しておいたものに比べて 28S および 18S ribosomal RNA の酸化が減少していた。

そして、以上のような条件で細胞死のレベルについても検討したところ、2 μ g/ml rose bengal 添加後光照射をおこなうと細胞死数は時間とともに増大し、この処理を compactin をあらかじめ添加した SY5Y 細胞でおこなうと、細胞死数の増加は促進された。しかし、compactin と同時に cholesterol を添加して外因性に補充したものに

ついては、その細胞死促進効果が減弱していた。以上より、cholesterol 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

神経原線維変化はアルツハイマー病の病理学的特徴のひとつであるが、それを構成するリン酸化タウ蛋白の生成機序については不明な点が多い。アポトーシスによって単に神経細胞死を誘導すると逆にタウ蛋白は脱リン酸化することから (Tsujiro I., et al. FEBS Lett 469,111-117,2000.)、タウ蛋白のリン酸化にともなう細胞死の機序を知ることが、アルツハイマー病の発症メカニズムの探求において重要と考えられる。今回の実験は、変異プレセニリンに関連すると言われる ER ストレス脆弱性に関連して、その ER にも局在するリボソームへのストレス (リボトキシックストレス) が核酸への酸化ストレスによって誘導され、タウ蛋白リン酸化をとこなう細胞死を誘導することをまず確認した。アルツハイマー病脳の変化にリボトキシックストレスが関与している可能性としては、この実験系で示された p38 および SAPK のリン酸化亢進は報告されており (Hensley K., J Neurochem 72,2053-2058,1999.)、また核酸特にリボソーム 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する可能性については、AD 脳における過剰な RNA の酸化が報告されている (Nunomura A, et al., J Neurosci 19,1959-1964,1999)。次に、核酸の酸化を誘導しやすいとされる singlet oxygen を介する系を用いると、SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化は亢進し、さらに 28S および 18S ribosomal RNA の酸化が増大していた。このような酸化ストレス

の系において cholesterol の役割を知るために、compactin で処理して cholesterol を deplete したものと compactin 処理と同時に外因性 cholesterol を添加したもので比較すると、タウ蛋白リン酸化、p38MAPK および SAPK 活性、28S および 18S ribosomal RNA の酸化レベル、および細胞死が compactin のみの処理にて増大し、compactin 処理に外因性 cholesterol 添加をおこなったものではその増大分が減弱した。ここでの cholesterol の機能についてはさらに解析が必要であるが、cholesterol そのものが singlet oxygen を補足してストレスを減弱している可能性などが考えやすい。実際に cholesterol は singlet oxygen と反応して 3 β -hydroxy-5 α -cholest-6-ene-5-hydroperoxide などの酸化物が生成されることが知られている(Girotti AW, et al., Meth Enzymol 319, 85-100,2000)。今後、変異プレセニリン導入細胞さらには変異タウ蛋白導入細胞において、このような核酸の酸化に伴うリポトキシックストレスに対する脆弱性の有無や、脂質の関与について検討を加える必要がある。

E. 結論

タウ蛋白リン酸化亢進をともなう細胞死を誘導するストレスとしてリポトキシックストレスが同定された。核酸の酸化を誘導する singlet oxygen を介する酸化ストレスによってリポトキシックストレスは誘導され、タウ蛋白のリン酸化、p38MAPK および SAPK の活性化、28S および 18S ribosomal RNA の酸化をともなう細胞死が観察されたが、cholesterol にはこの酸化ストレスを抑制する機序があることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takeda M, Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Matshubayashi T, Sugita M and Yoshida H. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi study in Japan. Psychogeriatrics 1: 56-63,2001

Fukusyo E, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Kudo T, Tanaka T, Matsumoto N, Kida T, Nakano Y, Shinosaki K and Takeda M. Effects of presenilin 1 missense mutation and aluminum on early neuronal development of mouse brain. Psychogeriatrics 1: 126-132, 2001

田中稔久、武田雅俊
シリーズ精神医学用語解説 タウオパチー
臨床精神医学 30: 80-82,2001

田中稔久、武田雅俊
文献抄録「アミロイド β ペプチドの免疫はアルツハイマー病モデルマウスの行動障害および老人斑を減少させる」「変異タウ蛋白(P301L)を発現するマウスにおける神経原線維変化、筋萎縮、進行性運動障害」
老年精神医学雑誌 12: 305, 2001

田中稔久、山森英長、和田健二、辻尾一郎、工藤喬、中村祐、柏木雄次郎、車谷隆宏、田上真次、森裕、小池裕子、神野由華、松本均彦、瀬川優子、福所英理子、武田雅俊
一次変性痴呆治療のためのタウ蛋白重合阻害についての研究
精神薬療研究年報 33: 2-10, 2001

田中稔久、武田雅俊
タウ蛋白の異常リン酸化機構
先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患 杉田秀夫、福内靖男、柴崎浩監修 先端医療技術研究所
190-194, 2001

2. 学会発表

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊
リチウムによるタウ蛋白のリン酸化誘導
第 21 回リチウム研究会 2001 年 4 月 21 日 東京

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、武田雅俊
2 本鎖 RNA によるタウ蛋白リン酸化への影響の検討 第 42 回日本神経学会総会
2001 年 5 月 11-13 日 東京

和田健二、田中稔久、中島健二、武田雅俊
Ribotoxic stress 応答におけるタウ蛋白リン酸化
の検討 第42回日本神経学会総会 2001年5月
11-13日 東京

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊
アルツハイマー病のリン酸化調節異常
第44回日本神経化学・第24回日本神経科学合同
大会 (Neuro2001)、2001年9月26日 京都

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、
武田雅俊 タウ蛋白リン酸化と結合蛋白
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重

和田健二、田中稔久、涌谷陽介、浦上克哉、
山形薫、中島健二、武田雅俊
酸化ストレスによるタウ蛋白リン酸化の検討
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重

山森英長、田中稔久、武田雅俊
カスパーゼ阻害とタウ蛋白リン酸化について
第20回日本痴呆学会 2001年10月4日 三重
田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、鈴木
英雄、工藤喬、紙野晃人、大河内正康、谷井久志、
小池裕子、安田由華、貴田智之、松本均彦、
福森亮雄、武田雅俊
タウ蛋白重合蓄積への結合因子の関与とその阻
害剤開発についての 第34回精神神経系薬物治
療研究報告会、2001年12月7日 大阪

Yamamori H, Tanaka T and Takeda M.
Changes of Phosphorylation Level of Tau
Protein in Cultured Cells by Cytotoxic Reagents.
5th International Conference on Progress in
Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD
2001), May 31-Apr.5,2001, Kyoto, Japan

Tanaka T., Yamamori H., Wada K.,
Nakashima K and Takeda M.
Phosphorylation of Tau Protein in Cultured
Cells by Polyinosinic-Polycytidylic Acid. 5th
International Conference on Progress in
Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD
2001), May 31-Apr.5,2001, Kyoto, Japan

Takeda M., Tanaka T, Arai H, Sasaki H, Shoji
M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K,
Katsubayashi T, Sugita M and Yoshida H.
Basic and clinical studies on the measurement of
 β -amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as a
diagnostic marker for Alzheimer's disease and
related disorders : Multi center study in Japan.
(Abst.) Tenth Congress of the International
Psychogeriatric Association Sept. 9-13, 2001
Nice, France

Tanaka T, Yamamori H and Takeda M.
Effects of lithium on phosphorylation levels of
tau protein (Abst.) Tenth Congress of the
International Psychogeriatric Association
Sept. 9-13, 2001, Nice, France

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

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
Yanagisawa K	Molecular mechanism underlying initiation of amyloid fibril formation.	Tanaka C, Ihara Y and McGeer PI	Neuroscientific Basis of Dementia	Birkhauser Verlag	Germany	2001	241-247
柳澤勝彦	コレステロール代謝からみたアルツハイマー病	杉田秀夫 他	神経・筋疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2001	103-108

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
Sai X, Kawamura Y, Kokam K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, De Strooper B, Yanagisawa K, Komano H.	Endoplasmic reticulum stress-inducible protein, Herp, enhances presenilin-mediated generation of amyloid β -protein.	J Biol Chem	(in press)		
Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K, Michikawa M.	Amyloid β -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons: Implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade.	J Neurosci Res	(in press)		
Garver WS, Krishnan K, Michikawa M, Francis GA, Heidenreich RA.	The Neimann-Pick C1 protein facilitates cholesterol transport to the <i>trans</i> -Golgi network and plasma membrane caveolae.	J Lipid Res	(in press)		
Hayashi H, Igbavoa U, Hamanaka H, Kobayashi M, Fujita S C, Wood W G, Yanagisawa K.	Cholesterol is increased in the exofacial leaflet of synaptic plasma membranes of human apolipoprotein E4 knock-in mice.	Neuroreport	13	383-386	2002
Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M.	Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons.	J Neurochem	80	178-190	2002
Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K.	Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid β -protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid.	J Biol Chem	276	24985-24990	2001
Kawamura Y, Kikuchi A, Takada R, Takada S, Sudoh S, Shibamoto S, Yanagisawa K, Komano H, Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N, Yanagisawa K.	Inhibitory effect of a presenilin 1 mutation on the Wnt signalling pathway by enhancement of β -catenin phosphorylation.	Eur J Biochem	268	3036-3041	2001
Isobe I, Yanagisawa K, Michikawa M.	A novel action of Alzheimer's amyloid β -protein ($A\beta$): oligomeric $A\beta$ promotes lipid release.	J Neurosci	21	7226-7235	2001
	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	77	274-280	2001

Sawamura N, Gong J-S, Garver W S, Heidenreich R A, Ninomiya H, Ohno K, <u>Yanagisawa K</u> , <u>Michikawa M.</u>	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
Fan Q-W, Yu-W, Senda T, <u>Yanagisawa K</u> , <u>Michikawa M.</u>	Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons.	J Neurochem	76	391-400	2001
Fan Q.W., Isobe I, Asou H, <u>Yanagisawa K</u> , <u>Michikawa M.</u>	Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture:A review	J Amer Aigng Assoc	24	1-10	2001
Li O, <u>Yokoyama S</u> , Agellon L B.	Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins	Biochim Biophys Acta	(in press)		
Ito J, Nagayasu Y, Kato K, Sato R, <u>Yokoyama S.</u>	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 <u>Yokoyama S.</u>	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)		
Okumura-Noji K, Sasai K, Zhan R, Kawaguchi H, Maruyama H, Tada T, Takahashi H, Okazaki M, Miida T, Sakuma N, Kimura G, Ohta N, <u>Yokoyama S.</u>	Cholesteryl Ester Transfer Protein-Deficiency Causes Slow Egg Embryonation of Schistosoma japonicum.	Biochem Biophys Res Commun	286	305-310	2001
Tanaka A R, Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, <u>Yokoyama S</u> , Ueda K.	Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's syndrome.	Biochem Biophys Res Commun	283	1019-1025	2001
Kojima K, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Murakami I, Suzumori K, <u>Yokoyama S.</u>	Progesterone Inhibits Apolipoprotein-mediated cellular lipid release: A putative mechanism for the decrease of HDL	Biochim Biophys Acta	1532	173-184	2001
Tomimoto S, Tsujita M, Okazaki M, Usui S, Tada T, Ito S, Itoh M, <u>Yokoyama S.</u>	Effect of probucol in lecithin-cholesterol acyltransferase deficient mice: Inhibition of two independent cellular cholesterol releasing pathways in vivo. Arterioscler.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	21	394-400	2001
Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okuyama-Noji K, <u>Yokoyama S.</u>	Cholesteryl ester transfer protein and atherosclerosis in Japanese subjects: A study based on coronary angiography.	Atherosclerosis	159	153-163	2001
Takeda M, <u>Tanaka T</u> , Arai H, Sasaki H, Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima K, Matshubayashi T, Sugita M, Yoshida H.	Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi study in Japan.	Psycho-geriatrics	1	56-63	2001

研究成果の刊行物・別刷

20010614

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。