

20020190

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロール  
の役割の検討

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成15（2003）年3月

# 目次

## I. 総括研究報告書

- アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割の検討 1  
道川 誠

## II. 分担研究報告書

1. アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割の検討 8  
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  
- apoA-I 刺激によるアストロサイトのセカンドメッセンジャー産生 -  
伊藤 仁一
3. アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割の検討 16  
藤野 貴広

## 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 20

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割の検討

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

我々は、アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割を明らかにし、コレステロール代謝を制御することでアルツハイマー病の発症予防、治療法の開発を目指している。中枢神経系におけるコレステロール代謝制御は主に apolipoprotein E(apoE)によって行われていると考えられるため、apoE のコレステロール代謝作用に着目した研究が必要である。我々の現在までの研究から、アルツハイマー病病理の進行にコレステロールの減少が促進的に働くことを明らかにした。本年度は、こうしたコレステロール代謝の破綻に対して、apoE がアイソフォーム依存性に HDL 新生およびその供給を通してコレステロール代謝の恒常性維持に貢献していることを明らかにした。すなわち、apoE3 は E4 に比べて HDL 新生能が高く、従ってコレステロール供給能に優れ、コレステロール代謝恒常性維持能が高いことを示した。これに比べ apoE4 はその能力が劣ることからアルツハイマー病発症が早まるのではないかと考えられた。一方、伊藤らは、こうした apolipoprotein による HDL 新生の細胞内メカニズムについて検討した。その結果、細胞質 caveolin 1 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ポ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。これらの知見は、HDL 新生はすでに細胞内で生じていることを示す全く新しいものであり、apoE のアイソフォーム依存的な HDL 新生も細胞内メカニズムの制御による可能性があり、今後の治療戦略を考える際に重要な情報となると考えられた。また、藤野らは、HDL コレステロールの選択的取り込みに重要な役割を果たすと考えられる新規 GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質を新たに同定した。コレステロール供給そしてその代謝恒常性維持には apoE などによる HDL 新生とともに、HDL の取り込みが重要な役割を果たすと考えられるため、この視点からの検討も重要であると考えられる。

分担研究者

伊藤仁一 名古屋市立大学大学院・  
医学研究科・  
代謝細胞生化学I 助教授  
藤野貴広 東北大学遺伝子実験施設  
助手

A. 研究目的

我々の研究室では、現在までに以下の点を明らかにした。すなわち、(1) コレステロ

ール代謝の維持が神経細胞の生存に重要であること、(2) その代謝は主に apoE によってアイソフォーム特異的に制御されること、(3) その細胞内機構にはカベオラーという cholesterol および sphingomyelin の豊富なドメインが関与する可能性が示唆された。更に、(4) 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、(5) 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、(6) 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、(7) 単体  $\text{A}\beta$  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、(8) 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、(9) 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こと、(10) 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ることを明らかにした。これらは、アルツハイマー病病理の進行にコレステロールの減少が促進的に働くことを示している。本年度は、こうしたコレステロール代謝の破綻に対して、apoE がアイソフォーム依存性に HDL 新生およびその供給を通してコレステロール代謝の恒常性維持に貢献していることを明らかにした。すなわち、apoE3 は E4 に比べて HDL 新生能が高く、従ってコレステロール供給能に優れ、コレステロール代謝恒常性維持能が高いことを示した。これに比べ apoE4 はその能力が劣ることからアルツハイマー病発症が早まるのではないかと考えられた。一方、伊藤らは、こうした apolipoprotein による HDL 新生の細胞内メカニズムについて検討した。その結果、細胞質 caveolin 1 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ポ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。これらの知見は、HDL 新生はすでに細胞内で生じていることを示す全く新しいものであり、apoE のアイソフォーム依存的な HDL 新生も細胞内メカニズムの制御による可能性があり、今後の治療戦略を考える際に重要な情報となると考えられた。また、藤野らは、HDL-コレステロールの選択的取り込みに

重要な役割を果たすと考えられる新規 GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質を新たに同定した。コレステロール供給そしてその代謝恒常性維持には apoE などによる HDL 新生とともに、HDL の取り込みが重要な役割を果たすと考えられるため、この視点からの検討も重要である。

## B. 研究方法

(1) 新生仔マウス（生後 1-2 日目）大脳皮質からのアストロサイト培養、得られた検体の脂質生化学的および生化学的解析は、既に報告した方法(Michikawa M. et al, J Neurosci, 2001)により行った。

(2) ラットアストロサイトの培養では、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。脂質分析では、diacylglyceride (DG), cholesterol (Cho), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC) 合成には  $^3\text{H}$ -acetate を用い、TLC によって分析した。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。細胞内リポタンパクの分析：ラットアストロサイトに 40  $\mu\text{Ci/ml}$  の  $^3\text{H}$ -acetate を 2 時間取り込ませてコレステロールを代謝的に  $^3\text{H}$  標識した。細胞を洗浄して、5  $\mu\text{g/ml}$  の apoAI を 90 分作用させ、低張液で細胞を処理し、300,000  $\times g$ , 30 min の超遠心で細胞質を得た。細胞質を 1.175

g/ml の sucrose 溶液に重層して、49,000 rpm , 48 h 遠心した。これを 12 画分に分け、それぞれの画分より脂質を抽出し、TLC により分析した。

(3)マウス LRP5 遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、LRP5 欠損マウスを作製した。また、アポ E/LRP5 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウスを作製した。これらのマウスに生化学及び組織学的解析を行うことにより、その表現系を解析した。また、HDL 結合能を指標に発現スクリーニング法により新規 HDL 結合タンパク質をコードする cDNA を単離した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる実験は、国立療養所中部病院、名古屋市立大学大学院・医学研究科および東北大学農学部の各施設における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

(1)アポリポ蛋白 E3 型および E4 型アストロサイトから時間依存的にコレステロールが HDL 様粒子として搬出され、前者からの搬出量は、後者の約 2 倍であった。(2)しかし、アポリポ蛋白 E の分泌量および HDL 粒子サイズには E3 および E4 間で違いがなかった。(3)HDL 画分におけるアポリポ蛋白 E に対するコレステロールのモル比は E3-HDL および E4-HDL でそれぞれ 250 および 119 であった。(4)分泌されたアポリポ蛋白 E3 はシステインを介して 2 量体を形成していたが、E4 は単体で存在した。

(2) アストロサイトを apoA-I で刺激すると 5 分後に SM や PC などコリンホスホリピットに比べ DG は特異的にその合成が促進された。U73122 によって DG 産生を抑制すると、DG 産

生に加えて、Cho, SM などの脂質合成も抑制され、さらに細胞内コレステロール輸送、apoA-I によるコレステロール搬出も抑制された。また、U73433 はこれらの諸反応を抑制しなかった。

これらの知見から、apoA-I 作用後の細胞内 DG 産生は apoA-I で誘導される細胞内コレステロール輸送およびコレステロール搬出に重要な役割をもつものと考えられる。apoA-I 刺激後 5 分で産生される DG は細胞膜ではなく、細胞質リポタンパク画分において観察された。apoA-I 刺激後の細胞内 protein kinase C $\alpha$  の分布を調べてみると、刺激後 5 分以降で細胞膜 protein kinase C $\alpha$  は減少し、細胞質のそれは増加した。また、細胞質に分布する phospholipase C $\alpha$  は apoA-I 刺激後 5 分で細胞質リポタンパク画分に移行した。このことから、apoA-I 作用後 5 分で、phospholipase C $\alpha$  が何らかのシグナルにより細胞質リポタンパク画分に移行し、そこで DG 産生が上昇するものと思われる。細胞質リポタンパク画分における DG 産生の上昇と共に、protein kinase C $\alpha$  もこの画分に移行した。U73122 は protein kinase C $\alpha$  の細胞質リポタンパク画分への移行を阻害した。また、細胞質リポタンパク画分へ移行した protein kinase C $\alpha$  はセリンリン酸化されていた。抗 caveolin-1 抗体で細胞質 protein kinase C $\alpha$  が免疫沈降し、また抗 protein kinase C $\alpha$  抗体でも caveolin-1 が沈降することから、細胞質リポタンパクにおいて、caveolin-1 と抗 protein kinase C $\alpha$  とが結合していることが示唆された。Protein kinase C 阻害剤は apoA-I で誘導される細胞内コレステロール輸送およびコレステロールの細胞外搬出のいずれもが抑制された。

(3) LRP5 欠損マウスは外見、行動、繁殖は正常

で、組織学的にもほとんどの組織に異常は観察されなかった。唯一、頭頂骨と脛骨の骨密度の低下が観察され、また、グルコース刺激時においてラ氏島β細胞からのインスリン分泌不全を示した。これに伴ってラ氏島ではグルコース刺激による細胞内カルシウム及び ATP 産生の低下、グルコキナーゼ、IGF 受容体及び IRS-2 の発現低下が観察された。さらに、血中カイロミクロン (CM) のクリアランスの低下を示し、血中コレステロール濃度の上昇が観察された。アポ E/LRP5 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウスではさらに顕著で、著しい血中コレステロール濃度の上昇と動脈硬化巣形成の促進が観察された。新規 HDL 結合タンパク質は GPI アンカー型の膜タンパク質で、心臓に最も高く、次いで肝臓、肺に発現が認められた。また、本タンパク質は HDL に依存した細胞内への選択的コレステロール取り込みに関与する事が明らかとなった。

#### D. 考察

(1) apoE3 は、apoE4 の約半分の分子数で同じサイズの HDL 粒子を形成する能力があること、従ってアポリポ蛋白 E3 型のアストロサイトは神経細胞へのコレステロール供給能に優れている可能性を示している。これは、おそらく 2 量体を形成したアポリポ蛋白は単体に比べ両親媒性  $\alpha$ -helix 長が長いことため粒子安定化作用に優れているためと考えられた。外傷後の回復期やシナプス可塑性の盛んな場所では、アストロサイトからのコレステロール供給が重要であると考えられることから、コレステロール供給能におけるアイソフォーム依存性がアルツハイマー病発症メカニズムに関与するかもしれない。

(2) Apolipoprotein (apoAI) による コレステロール搬出 (HDL 新生) には細胞質リポタンパク画分における diacylglyceride の産生と、protein kinase C $\alpha$  の活性化が、重要であることが明らかになった。以前の研究結果から、apoA-I 作用後新たに合成されたコレステロールが ER から細胞質リポタンパク画分へと移行し、さらに細胞膜へと運搬されることから、細胞質リポタンパクはいわばコレステロールの細胞内輸送の担体そのものであることが示唆された。このような細胞質リポタンパクが、コレステロールの細胞内輸送に直接関わる情報伝達の間をも形成することは大きな驚きである。現段階では、apoA-I で誘導されるシグナル産生とそのカスケードに関する多くのことは不明のままである。どのようなシグナルが phospholipase C $\gamma$  を細胞質リポタンパク画分への移行を誘導するか、また活性化された protein kinase C $\alpha$  がいかなる細胞質タンパクをリン酸化するかについては今後の研究課題といえる。

(3) LRP5 はグルコース刺激時におけるインスリン分泌と正常な血中コレステロール代謝に重要な役割を果たしており、新規 GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質は選択的な細胞内コレステロールの取り込みに重要である。LRP5 はリポタンパク受容体としてだけでなく Wnt の受容体としても機能している。LRP5 欠損マウスが耐糖能異常を示し、それと共にラ氏島におけるグルコキナーゼ、IGF 受容体及び IRS-2 の発現低下が観察されたことは、これらグルコースセンシングに関わる分子の発現調節の上流に Wnt 受容体として位置する事を示唆した。また、血中カイロミクロンのクリアランスの低下や apoE/LRP5 欠損マウスにおける著しい血中コレ

ステロール濃度の上昇と動脈硬化巣形成の促進は本受容体がカイロミクロソームナント受容体としても機能していることを示した。GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質はこれまで明らかにされている HDL 受容体の SR-BI とは異なり、選択的にコレステロールの取り込みは行うが選択的排出は行わないことから、全く新しいタイプの HDL 受容体であることが示唆された。

#### E. 結論

apoE3 は、apoE4 の約半分の分子数で同じサイズの HDL 粒子を形成する能力があること、従って apoE3 型のアストロサイトは神経細胞へのコレステロール供給能に優れていることが明らかになった。Apolipoprotein(apoAI)によるコレステロール搬出 (HDL 新生) には細胞質リポタンパク画分における diacylglyceride の産生と、protein kinase C $\alpha$ の活性化が、重要であることが明らかになった。GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質はこれまで明らかにされている HDL 受容体の SR-BI とは異なり、選択的にコレステロールの取り込みは行うが選択的排出は行わないことから、全く新しいタイプの HDL 受容体であることが示唆され、apoE-HDL の取り込みにも関与している可能性を検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, Michikawa M.  
Promotion of tau phosphorylation by MAP Kinase Erk1/2 is accompanied by reduced

cholesterol level in detergent-insoluble membrane domains in Niemann-Pick C1-deficient cells.

*J Neurochem* 84: 1086-1096, 2003

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K, Michikawa M.

Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice.

*J Biol Chem* 277: 29919-29926, 2002

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M.

A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.

*J Neurosci* 22(12): 4833-4841, 2002

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* 70: 438-446, 2002

Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, Yanagisawa K, Michikawa M.

Cholesterol-dependent dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons.

*J Neurochem.* 80: 178-190, 2002

Garver WS, Krishnan K, Gallagos JR, Michikawa M., Francis GA, Heidenreich RA.

Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae.

*J Lipid Res* 43(4):579-89, 2002

Watarai M, Makino S, Michikawa M.

Yanagisawa K, Murakami S and Shirahata T. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes *Brucella abortus* infection of mice. *Infection and Immunity* 70:4818-4825, 2002

Michikawa M.

Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *J Neuro Res* 72,2003 (in press)

Michikawa M.

Role of cholesterol in pathogenesis of Alzheimer's disease.

*Mol Neurobiol* (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* 277: 7929-7935, 2002

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* 1589: 261-272, 2002

Ito J, Nagayasu Y, Ueno S and Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated cellular lipid release requires replenishment of sphingomyelin in a phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent manner.  
*J Biol Chem* 277: 44709-44714, 2002

Ioka R X, Kang M-J, Kamiyama S, Kim D-H, Magoori K, Kamataki A, Ito Y, Takei Y A, Sasaki M, Suzuki T, Sasano H, Takahashi S, Sakai J, Fujino T and Yamamoto T T.  
Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *J Biol Chem* 278:7344-7349, 2003

Fujino T, Asaba H, Kang M-J, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim D-H, Ioka R X, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J and Yamamoto T T.  
Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 100: 229-234, 2003

Magoori K, Kang M-J, Iwazaki M I, Kakuuchi H, Ioka R X, Kamataki A, Kim D-H, Asaba H, Iwasaki S, Takei Y A, Sasaki M, Usui U, Okazaki M, Takahashi S, Ono M, Nose M, Sakai J, Fujino T and Yamamoto T T.  
Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance and advanced atherosclerosis in mice lacking both Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) and apolipoprotein E.  
*J Biol Chem* 2003 (in press)

## 2. 学会発表

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita S, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Apolipoprotein E (apoE)-isoform-dependent cholesterol release from astrocytes prepared

from human apoE3- and apoE4-knock-in mice.  
Society for Neuroscience Annual Meeting. Nov. 7, 2002, Orland, USA

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, Michikawa M, Niemann-Pick C1 deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane fractions leading to activation of MAP kinase pathway and increased phosphorylation.  
Society for Neuroscience Annual Meeting. Nov. 6, 2002, Orland, USA

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.  
Society for Neuroscience Annual Meeting. Nov. 8, 2002, Orland, USA

キョウ建生、小林まり子、林秀樹、ゾウケン、澤村直哉、藤田 忍、柳澤勝彦、道川 誠  
ヒトアポリポ蛋白 E3-E4-ノックインマウスから調製したアストロサイトにおけるアイソフォーム依存的コレステロール搬出機構の検討  
第25回日本痴呆学会 2002年10月4日 大阪

澤村直哉、キョウ建生、チャン タユアン、柳澤勝彦、道川 誠  
ニーマンピック C 型モデル細胞におけるタウ蛋白のリン酸化の検討  
第25回日本痴呆学会 2002年10月4日 大阪

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita S, Yanagisawa K and Michikawa M.  
Isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apolipoprotein E3- and E4-knock-in mice.  
第45回日本神経化学学会 2002年7月16-19日 札幌

澤村直哉、キョウ建生、チャン タユアン、柳澤勝彦、道川 誠  
Niemann-Pick C1 deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane fractions leading to activation of MAP kinase pathway and increased phosphorylation.  
第45回日本神経化学学会 2002年7月16-19日 札幌

ゾウケン、キョウ建生、柳澤勝彦、道川 誠  
A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule

against metal -induced oxidative damage.  
第 45 回日本神経化学会 2002 年 7 月 16-19 日  
札幌

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S.  
Stimulation by acidicFGF of cholesterol  
metabolism of rat astrocytes.  
The 14th Biennial Meeting of the International  
Society for Developmental Neuroscience  
Jan.31-Feb.2, Sydney, Australia 2002,

伊藤仁一、長安祐子、横山信治  
アストロサイト産生 acidicFGF によるアストロ  
サイトのコレステロール代謝のオートクリン調  
節 第 75 回日本生化学会 2002 年 10 月 14-17  
日 京都

伊藤仁一、長安祐子、横山信治  
Autocrine action of acidicFGF to stimulate  
cholesterol metabolism and apoE secretion of rat  
cholesterol 第 45 回日本神経化学会 2002 年  
7 月 17-19 日 札幌

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
出願番号：2002-64458  
発明者：山本徳男、酒井寿郎、藤野貴広  
発明の名称：Wnt の新規作用及び、疾患治  
療への応用  
出願人：アンジェス エムジー株式会社  
出願日：2002 年 3 月 8 日
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割の検討

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

ヒトリコンビナント apoE3 および apoE4 のノックインマウスから調製したアストロサイト培養を用いて apoE のアイソフォームの違いによる HDL 新生を解析した。アストロサイトから分泌される apoE 量には差がなかったが、HDL 新生量(粒子数)は apoE3 型のアストロサイト培地では apoE4 型のアストロサイト培地に比べ約 2 倍であった。また、apoE3 型から分泌される HDL 粒子サイズは apoE4 型アストロサイトからの HDL 粒子サイズと同じであった。apoE3 は、apoE3 のみが持つシステインによって 2 量体を形成したが、apoE4 は単体で存在した。以上で示された apoE3 の HDL 新生能の高さは、apoE3 が 2 量体形成によって 1 分子あたりの両親媒性の $\alpha$ ヘリックス長が長くなり、その脂質粒子安定化に依存している可能性が考えられた。以上の結果は、アストロサイトから神経細胞へのコレステロール供給能に apoE のアイソフォーム依存的な違いがあり、apoE3 は apoE4 に比べコレステロール代謝恒常性維持能力に優れていることを示している。アミロイド $\beta$ 蛋白の重合体による細胞内コレステロール量の低下に対し、apoE は HDL の新生による HDL コレステロールの供給によってその恒常性維持に働くと考えられるが、この能力にアイソフォーム依存性 (apoE3>apoE4) があるために、apoE4 ではより早期にコレステロール代謝の破綻と疾患発症を招く可能性を考えることができる。

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、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、(i) apoE のアイソフォーム特異的なコレステロール代謝調節作用、(ii) コレステロール代謝変動とアミロイドカスケードとの関連についてそれぞれ研究している。当研究室におけるこれまでの研究成果は、(ii)の観点からまとめると次のようになる。(1)アルツハイマー病脳で増加していると考えられるアミロイド $\beta$ 蛋白

(A $\beta$ )の重合体が神経細胞におけるコレステロール代謝に影響を与え(Michikawa et al., *J. Neurosci.*, 2001)、神経細胞内コレステロール量を減少させる(Gong et al., *J. Neurosci. Res.*, 2002)が、単体の A $\beta$ は細胞保護作用があること(Zou et al., *J. Neurosci.*, 2002)、(2)細胞内コレステロールの減少が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(Fan et al., *J. Neurochem.*, 2001; Fan et al., *J. Neurochem.*, 2002)、(3)コレステロール代謝障害を持つニーマンピック病 C 型マウス脳で MAPK の活性の亢進を伴ったタウのリン酸化亢進を来すこと(Sawamura et al., *J. Biol. Chem.*, 2001)、その原因として raft におけるコレステロール減少が考えられること(Sawamura et al., *J. Neurochem.*, in press)、等である。これらは、アミロイドカスケード説をコレステロール代謝変動によって説明できることを示している。すなわち、加齢に伴って脳内で増加すると考えられる A $\beta$ がやがて重合体を形成し、それが神経細胞内コレステロール量を低下させ、コレステロール量の低下が、タウのリン酸化・シナプス形成抑制・神経細胞死を招くという考え方である。本年度は、コレステロールが中核的役割を演じていると考えられるアミロイドカスケードに apoE は如何に関与するか(i)の観点について検討した。

## B. 研究方法

アストロサイト培養は、生後 1 日目の apoE3-, E4 ノックインマウス脳から準備し、DMEM/F12 に 10% FBS を含む培地で培養した。これらの細胞を 2 週間後にまき換え、さらに 1-2 週間後に 12well dish にまき直したものをを用いた。培地中

へ放出された脂質(コレステロールおよびリン脂質)はキットにより定量した。アイソトープラベル:アストロサイト細胞は<sup>14</sup>C]acetate で 48 時間ラベルし、培地中へ放出される脂質は、クロロフォルム:メタノール法によりを抽出し、TLC 展開によりコレステロールおよびリン脂質を定量した。また密度勾配法により 12 のフラクションを得、それぞれに含まれるコレステロールおよびリン脂質を定量し、apoE 量をウエスタンブロットにより検出定量した。

(倫理面への配慮)

実験動物を用いる実験は、各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

アストロサイトから培地中へ出てくる脂質量は apoE3 型が apoE4 型のアストロサイトに比べ約 2 倍量であった。しかし、apoE そのものの量は変化がなかった。このときの脂質はすべて HDL として存在した。apoE あたりのコレステロールのモル比は apoE3 型が 250、apoE4 型が 119 であった。HDL のサイズには apoE アイソフォーム別での違いは無かった。apoE3 はシステインを含むため、これによる 2 量体形成がみられた。

## D. 考察

以上の結果をまとめると、ヒトリコンビナント apoE3 および apoE4 のノックインマウスから調製したアストロサイト培養系における HDL 新生を解析したところ、分泌される apoE 量には差がなかったが、HDL 新生量(粒子数)は apoE3 が apoE4 の約 2 倍であり、この作用の違いは apoE3 のみが持つシステインによって 2 量体を

形成し、それが脂質粒子安定化に寄与している可能性が考えられた。一般に apolipoprotein によるコレステロール搬出作用は apolipoprotein の持つ $\alpha$ ヘリックス長によって決定するとされる。apoE3 は 2 量体を形成することで1分子あたりの  $\alpha$ ヘリックス長が長くなり脂質粒子安定化に寄与していると考えられた。ApoE によって形成される HDL は apoE 受容体によって神経細胞に取り込まれ再利用されることから、apoE3 は apoE4 に比しコレステロール供給能に優れ、従ってコレステロール代謝恒常性維持により優れた能力を持つことを示している。アルツハイマー病発症との関連で言えば、A $\beta$ 重合体による細胞内コレステロール量の低下に対して、apoE は HDL の新生による HDL コレステロールの供給によってその恒常性維持に働くが、この能力にアイソフォーム依存性 (apoE3>apoE4) があるために、apoE4 ではより早期にコレステロール代謝の破綻と疾患発症を招く可能性を考慮することができる。アストロサイトから神経細胞へのコレステロール供給能に apoE のアイソフォーム依存的な違いがあることは(Gong et al., *J. Biol. Chem.*, 2002)として発表した。

#### E. 結論

(1) ヒト apoE3 および apoE4 のノックインマウスから調製したアストロサイト培養系における HDL 新生量 (粒子数) は apoE3 が apoE4 の約 2 倍であった。ApoE によって形成される HDL は apoE 受容体によって神経細胞に取り込まれ再利用されることから、apoE3 は apoE4 に比しコレステロール供給能に優れ、従ってコレステロール代謝恒常性機能により優れた能力を持つと考えられた。

(2) apoA-I 作用後の細胞質リポタンパク画分における diacylglyceride の産生と、protein kinase Ca の活性化が細胞内コレステロール輸送と apoA-I によるコレステロール搬出に重要な役割を持つと考えられる。

(3) apoE 受容体の一つである LRP5 欠損マウスの解析から、LRP5 はグルコース刺激時におけるインスリン分泌と正常な血中コレステロール代謝に重要な役割を果たすこと、また新たに同定した新規 GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質は選択的な細胞内コレステロールの取り込みに重要であることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, Michikawa M.

Promotion of tau phosphorylation by MAP Kinase Erk1/2 Is accompanied by reduced cholesterol level in detergent-insoluble membrane domains in Niemann-Pick C1-deficient cells.

*J Neurochem* 84: 1086-1096, 2003

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K, Michikawa M.

Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice. *J Biol Chem* 277: 29919-29926, 2002

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M.

A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.

*J Neurosci* 22(12): 4833-4841, 2002

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* 70: 438-446, 2002

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

Garver WS, Krishnan K, Gallagos JR, Michikawa M, Francis GA, Heidenreich RA. Niemann-Pick C1 protein regulates cholesterol transport to the trans-Golgi network and plasma membrane caveolae. *J Lipid Res* 43(4):579-89, 2002

Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S and Shirahata T. Macrophage plasma membrane cholesterol contributes *Brucella abortus* infection of mice. *Infection and Immunity* 70:4818-4825, 2002

Michikawa M.

Cholesterol paradox: is high total or low HDL Cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *J Neuro Res* 72,2003 (in press)

Michikawa M.

Role of cholesterol in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* (in press)

2. 学会発表

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita S, Yanagisawa K and Michikawa M. Apolipoprotein E (apoE)-isoform- dependent cholesterol release from astrocytes prepared from human apoE3- and apoE4-knock-in mice. Society for Neuroscience Annual Meeting. Nov. 7, 2002, Orland, USA

Sawamura N, Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, Michikawa M. Niemann-Pick C1 deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane fractions leading to activation of MAP kinase pathway and increased phosphorylation. Society for Neuroscience Annual Meeting. Nov. 6, 2002, Orland, USA

Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M. A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -

protein serving as an antioxidant molecule against metal -induced oxidative damage. Society for Neuroscience Annual Meeting. Nov. 8, 2002, Orland, USA

キョウ建生、小林まり子、林秀樹、ゾウケン、澤村直哉、藤田 忍、柳澤勝彦、道川 誠 ヒトアポリポ蛋白 E3-E4-ノックインマウスから調製したアストロサイトにおけるアイソフォーム依存的コレステロール搬出機構の検討 第25回日本痴呆学会 2002年10月4日 大阪

澤村直哉、キョウ建生、チャン タユアン、柳澤勝彦、道川 誠 ニーマンピック C 型モデル細胞におけるタウ蛋白のリン酸化の検討 第25回日本痴呆学会 2002年10月4日 大阪

Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita S, Yanagisawa K and Michikawa M. Isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human apolipoprotein E3- and E4-knock-in mice. 第45回日本神経化学会 2002年7月16-19日 札幌

澤村直哉、キョウ建生、チャン タユアン、柳澤勝彦、道川 誠 Niemann-Pick C1 deficiency reduces the levels of cholesterol in detergent insoluble, low-density membrane fractions leading to activation of MAP kinase pathway and increased phosphorylation. 第45回日本神経化学会 2002年7月16-19日 札幌

ゾウケン、キョウ建生、柳澤勝彦、道川 誠 A novel function of monomeric amyloid  $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule against metal -induced oxidative damage. 第45回日本神経化学会 2002年7月16-19日 札幌

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

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

分担研究報告書

神経系細胞におけるコレステロール efflux 機構の解明

apoA-I 刺激によるアストロサイトのセカンドメッセンジャー産生

分担研究者 伊藤 仁一 名古屋市立大学大学院・医学研究科・代謝細胞生化学 I 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rotein A-I (apoAI) で刺激すると、細胞質 caveolin 1 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ポ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。細胞内スフィンゴミエリンはコレステロールの細胞内輸送因子として機能し、細胞膜に到達した後は、コレステロールのアンカーとして外来性 apoA-I によるコレステロール搬出を抑制することがわかった。本研究では apoA-I 作用後のアストロサイト内での一連の反応を誘導するセカンドメッセンジャーの産生を検討した。

apoA-I 刺激後 5 分に、細胞質において diacylglyceride 産生の一過性の上昇が認められた。この diacylglyceride 産生は、細胞質リポタンパク画分において上昇し、phospholipase C $\gamma$  も apoA-I 刺激に反応して細胞質リポタンパク画分に移行することが分かった。また protein kinase C $\alpha$  も apoA-I 刺激後 5 分にこの画分に translocate され、そのセリン残基がリン酸化されることが分かった。この細胞質における diacylglyceride の産生や、protein kinase C $\alpha$  の活性化を阻害すると、apoA-I によるコレステロールの搬出が著しく抑制された。これらの知見から、apoA-I 作用後の細胞質リポタンパク画分における diacylglyceride の産生と、protein kinase C $\alpha$  の活性化が細胞内コレステロール輸送と apoA-I によるコレステロール搬出に重要な役割を持つことが示唆された。

#### A. 研究目的

中枢神経組織はコレステロール要求性の高い組織で、からだ全体の約 30%のコレステロールが脳に分布する。しかしながら、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と考えられる。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。さらにアストロサイトは外来性 apoA-I にも反応して一過性にコレステロールを搬出する。

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、外来性 apoA-I 作用後のアストロサイト細胞内におけるセカンドメッセンジャーの産生に焦点を当てて検討した。

## B. 研究方法

(1) ラットおよびマウスアストロサイトの培養  
胎生期 17 日目のラットあるいはマウス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。

(2) 脂質分析  
diacylglyceride (DG), cholesterol (Cho), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC) 合成には  $^3\text{H}$ -acetate を用い、TLC によって分析した。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) 細胞内リポタンパクの分析

ラットアストロサイトに 40 uCi/ml の  $^3\text{H}$ -acetate を 2 時間取り込ませてコレステロールを代謝的に  $^3\text{H}$  標識した。細胞を洗浄して、5ug/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。細胞質を 1.175 g/ml の sucrose 溶液に重層して、49,000 rpm, 48 h 遠心した。これを 12 画分

に分け、それぞれの画分より脂質を抽出し、TLC により分析した。

(倫理面への配慮)

アストロサイトの培養に当たって、妊娠 17 日目のラットおよびマウスをドライアイスにより CO<sub>2</sub> 窒息させ、呼吸停止を確認した後、開腹し胎児を得た。

## C. 研究結果

アストロサイトを apoA-I で刺激すると 5 分後に SM や PC などコリンホスホリピッドに比べ DG は特異的にその合成が促進された。U73122 によって DG 産生を抑制すると、DG 産生に加えて、Cho, SM などの脂質合成も抑制され、さらに細胞内コレステロール輸送、apoA-I によるコレステロール搬出も抑制された。また、U73433 はこれらの諸反応を抑制しなかった。これらの知見から、apoA-I 作用後の細胞内 DG 産生は apoA-I で誘導される細胞内コレステロール輸送およびコレステロール搬出に重要な役割をもつものと考えられる。

apoA-I 刺激後 5 分で産生される DG は細胞膜ではなく、細胞質リポタンパク画分において観察された。apoA-I 刺激後の細胞内 protein kinase C $\alpha$  の分布を調べてみると、刺激後 5 分以降で細胞膜 protein kinase C $\alpha$  は減少し、細胞質のそれは増加した。また、細胞質に分布する phospholipase C $\gamma$  は apoA-I 刺激後 5 分で細胞質リポタンパク画分に移行した。このことから、apoA-I 作用後 5 分で、phospholipase C $\gamma$  が何らかのシグナルにより細胞質リポタンパク画分に移行し、そこで DG 産生が上昇するものと思われる。細胞質リポタンパク画分における DG 産生の上昇と共に、protein kinase C $\alpha$  もこ

の画分に移行した。U73122 は protein kinase C $\alpha$ の細胞質リポタンパク画分への移行を阻害した。また、細胞質リポタンパク画分へ移行した protein kinase C $\alpha$ はセリンリン酸化されていた。抗 caveolin-1 抗体で細胞質 protein kinase C $\alpha$ が免疫沈降し、また抗 protein kinase C $\alpha$ 抗体でも caveolin-1 が沈降することから、細胞質リポタンパクにおいて、caveolin-1 と抗 protein kinase C $\alpha$ とが結合していることが示唆された。kinase C 阻害剤は apoA-I で誘導される細胞内コレステロール輸送およびコレステロールの細胞外搬出のいずれもが抑制された。

#### 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。本実験で、apoA-I 作用後5分で細胞質リポタンパク画分に phospholipase C $\gamma$  が移行し、この画分において diacylglyceride (DG) が産生されることが見出された。現在のところ、phospholipase C $\gamma$  の細胞質リポタンパク画分への移行を誘導するシグナルについては不明である。一般に、EGF、PDGF などの因子による刺激は細胞膜の受容体のチロシンリン酸化と SH2 domain を有する phospholipase C $\gamma$  との相互作用を誘導し、その結果、本酵素は細胞膜に移行し、DG も細胞膜で産生される。さらに protein kinase C も細胞膜へと移行するのが一般的である。したがって、apoA-I で刺激されたアストロサイトの細胞質リポタンパクにおいて何らかのタンパク質のチロシンリン酸化が生じているのかも知れない。今回見出された細胞質リポタンパク画分でのDG産生は apoA-I に特異的な反応であり、アストロサイトの apoA-I 刺激によるセカンドメッセ

ンジャー産生が一般の成長因子によって産生されるそれとは大きく異なる極めてユニークなものであると言える。細胞質リポタンパク画分における DG 産生の上昇は、予想通り protein kinase C $\alpha$  のこの画分への移行を誘導し、セリンリン酸化を促進した。

apoA-I 刺激後、アストロサイトの細胞質リポタンパク画分における DG 産生を U73122 で阻害すると、コレステロールの合成、細胞内輸送、細胞外への搬出のいずれの反応も阻害された。また、protein kinase C inhibitor によっても、同様にこれらの反応が抑制された。これらの知見は apoA-I 刺激後の細胞質リポタンパク画分での DG 産生とこれに続く protein kinase C $\alpha$  の活性化が apoA-I によるコレステロール搬出反応にとって、重要な細胞内反応であることを意味する。以前の研究結果から、apoA-I 作用後新たに合成されたコレステロールが ER から細胞質リポタンパク画分へと移行し、さらに細胞膜へと運搬されることから、細胞質リポタンパクはいわばコレステロールの細胞内輸送の担体そのものであることが示唆された。このような細胞質リポタンパクが、コレステロールの細胞内輸送に直接関わる情報伝達の間をも形成することは大きな驚きである。現段階では、apoA-I で誘導されるシグナル産生とそのカスケードに関する多くのことは不明のままである。どのようなシグナルが phospholipase C $\gamma$  を細胞質リポタンパク画分への移行を誘導するか、また活性化された protein kinase C $\alpha$  がいかなる細胞質タンパクをリン酸化するかについては今後の研究課題といえる。

#### E. 結論

apoAI 作用後のアストロサイト細胞内シグナ

ル産生を検討した。apoAI は特異的に細胞質リポタンパク画分への phospholipase C $\gamma$  移行と diacylglyceride 産生を促進した。また、protein kinase C $\alpha$  もこの画分に移行し、セリンリン酸化された。

F. 健康危険情報  
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

*JBiol Chem* 277: 7929-7935, 2002

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* 1589: 261-272, 2002

Ito J, Nagayasu Y, Ueno S and Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated cellular lipid release requires replenishment of sphingomyelin in a phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent manner.

*JBiol Chem* 277: 44709-44714, 2002

2. 学会発表

Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S.  
Stimulation by acidicFGF of cholesterol metabolism of rat astrocytes  
The 14th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience  
Jan.31-Feb.2, Sydney, Australia

伊藤仁一、長安祐子、横山信治

アストロサイト産生 acidicFGF によるアストロサイトのコレステロール代謝のオートクリン調節 日本生化学会第 75 回大会  
2002 年 10 月 14-17 日 京都

伊藤仁一、長安祐子、横山信治

Autocrine action of acidicFGF to stimulate

cholesterol metabolism and apoE secretion of rat cholesterol 第 45 回日本神経化学会 2002 年 7 月 17-19 日 札幌

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

アルツハイマー病発症の分子機構におけるコレステロールの役割の検討

分担研究者 藤野 貴広 東北大学遺伝子実験施設・助手

研究要旨

LDL 受容体関連タンパク 5 (LRP5) 遺伝子を欠損したマウスを作製した。本欠損マウスでは頭頂骨の骨密度低下、グルコース刺激時におけるランゲルハンス島からのインスリン分泌不全、血中カイロミクロンレムナントのクリアランス異常を示した。さらに、アポ E/LRP5 を共に欠損するマウスでは高コレステロール血症を示し、動脈硬化巣形成が亢進していた。しかし、これらのマウスにおいて脳神経系への異常は観察されなかった。また、新規 GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質を発見し、解析を行った。

A. 研究目的

脳におけるリポタンパク受容体の機能解析を通して、脳内のコレステロール代謝及びアルツハイマー病との関連を明らかにする。

B. 研究方法

マウス LRP5 遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、LRP5 欠損マウスを作製した。また、アポ E/LRP5 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウスを作製した。これらのマウスに生化学及び組織学的解析を行うことにより、その表現系を解析した。また、HDL 結合能を指標に発現スクリーニング法により新規 HDL 結合タンパク質をコードする cDNA を単離した。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる実験は、東北大学農学部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

LRP5 欠損マウスは外見、行動、繁殖は正常で、組織学的にもほとんどの組織に異常は観察されなかった。唯一、頭頂骨と脛骨の骨密度の低下が観察され、また、グルコース刺激時においてラ氏島β細胞からのインスリン分泌不全を示した。これに伴ってラ氏島ではグルコース刺激による細胞内カルシウム及び ATP 産生の低下、グルコキナーゼ、IGF 受容体及び IRS-2 の発現低下が観察された。さらに、血中カイロミクロン (CM) のクリアランスの低下を示し、血中コレステロール濃度の上昇が観察された。アポ E/LRP5 遺伝子を欠損したダブルノックアウトマウスではさらに顕著で、著しい血中コレステロール濃度の上昇と動脈硬化巣形成の促進が観察された。

新規 HDL 結合タンパク質は GPI アンカー型の膜タンパク質で、心臓に最も高く、次いで肝臓、肺に発現が認められた。また、本タンパク質は

HDL に依存した細胞内への選択的コレステロール取り込みに関与する事が明らかとなった。

#### D. 考察

LRP5 はリポタンパク受容体としてだけではなく Wnt の受容体としても機能している。LRP5 欠損マウスが耐糖能異常を示し、それと共にラ氏島におけるグルコキナーゼ、IGF 受容体及び IRS-2 の発現低下が観察されたことは、これらグルコースセンシングに関わる分子の発現調節の上流に Wnt 受容体として位置する事を示唆した。また、血中カイロミクロンのクリアランスの低下やアポ E/LRP5 欠損マウスにおける著しい血中コレステロール濃度の上昇と動脈硬化巣形成の促進は本受容体がカイロミクロンレムナント受容体としても機能していることを示した。

GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質はこれまで明らかにされている HDL 受容体の SR-BI とは異なり、選択的にコレステロールの取り込みは行うが選択的排出は行わないことから、全く新しいタイプの HDL 受容体であることが示唆された。

#### E. 結論

LRP5 はグルコース刺激時におけるインスリン分泌と正常な血中コレステロール代謝に重要な役割を果たしており、新規 GPI アンカー型 HDL 結合タンパク質は選択的な細胞内コレステロールの取り込みに重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Magoori K, Kang M-J, Iwazaki MI, Kakuuchi H, Ioka R X, Kamataki A, Kim D-H, Asaba H, Iwasaki S, Takei Y A, Sasaki M, Usui U, Okazaki M, Takahashi S, Ono M, Nose M, Sakai J, Fujino T and Yamamoto T T.  
Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance and advanced atherosclerosis in mice

lacking both Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) and apolipoprotein E. *JBiol Chem* 2003 (in press)

Ioka R X, Kang M-J, Kamiyama S, Kim D-H, Magoori K, Kamataki A, Ito Y, Takei Y A, Sasaki M, Suzuki T, Sasano H, Takahashi S, Sakai J, Fujino T and Yamamoto T T.

Expression cloning and characterization of a novel glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein, GPI-HBP1. *JBiol Chem* 278:7344-7349, 2003

Fujino T, Asaba H, Kang M-J, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim D-H, Ioka R X, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J and Yamamoto T T.  
Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 229-234, 2003

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

出願番号：2002-64458

発明者：山本徳男、酒井寿郎、藤野貴広

発明の名称：Wnt の新規作用及び、疾患治療への応用

出願人：アンジェス エムジー株式会社

出願日：2002年3月8日

##### 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

### 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
(道川) 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	70	438-446	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
Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, Yanagisawa K and Michikawa M.	Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE3- and apoE4-knock-in mice.	J Biol Chem	277	29919-29926	2002
Zou K, Gong JS, Yanagisawa K and Michikawa M.	A Novel function of monomeric amyloid $\beta$ -protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.	J Neurosci	22	4833-4841	2002
Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S and Shirahata T.	Macrophage plasma membrane cholesterol contributes <i>Brucella abortus</i> infection of mice.	Infection and Immunity	70	4818-4825	2002
Garver WS, Krishnan K and Michikawa M, Francis GA and Heidenreich RA.	The Niemann-Pick C1 protein facilitates cholesterol transport to the <i>trans</i> -Golgi network and plasma membrane caveolae.	J Lipid Res	43	579-589	2002
Sawamura N Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, and Michikawa M.	Promotion of Tau Phosphorylation by MAP Kinase Erk1/2 Is Accompanied by Reduced Cholesterol Level in Detergent-Insoluble Membrane Domains in Niemann-Pick C1-Deficient Cells.	J Neurochem	84	1086-1096	2003
Michikawa M.	Cholesterol paradox: is high total or low HDL Cholesterol level a risk for Alzheimer's disease?	J Neuro Res	73	(in press)	2003
Michikawa M.	Role of cholesterol in pathogenesis of Alzheimer's disease.	Mol Neurobiol		(in press)	
Sawamura N Gong JS, Chang TY, Yanagisawa K, and Michikawa M.	Promotion of Tau Phosphorylation by MAP Kinase Erk1/2 Is Accompanied by Reduced Cholesterol Level in Detergent-Insoluble Membrane Domains in Niemann-Pick C1-Deficient Cells.	J Neurochem	84	1086-1096	2003