アミロイドβ蛋白によるコレステロール代謝破綻に対して、apoE はアストロサイトからコレステロールを HDL 新生によって搬出し、神経細胞へ HDL としてコレステロール供給している可能性が考えられる。そこで本年、我々は、ヒト apoE3 および E4 のノックインマウス脳（三菱化学生命科学研究所　藤田先生との共同研究）からアストロサイト培養を調製し、アイソフォーム依存的な HDL 新生およびそのメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

アストロサイト培養:生後 1-2 日目のアポ E3, E4 ノックインマウス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 で 20 分間 incubation した後、パスツールピペットでピペッテングして、細胞を単離し、10% 胎仔牛血清入りの培地で培養した。2 週間目に 6-well の培養皿に撒きなおし、培養皿がアストロサイト細胞で敷き詰められたのを確認後に実験に使用した。培地中の脂質定量はキットあるいは放射線ラベル後 TLC 展開して定量した。また、HDL 分画の分離には、sucrose による密度勾配法を用いた。

（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充分な配慮を加える。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

(1)apoE はアストロサイトからのコレステロール、リン脂質を搬出し 2 種類の HDL を新生する。(2)軽いほうの HDL には apoE が結合し、やや比重の大きなほうの HDL には apoJ が結合していた。(3) HDL 分画に含まれる脂質量のほとんどは apoE の分布する HDL 画分に存在した。(4) apoE による HDL 新生量は apoE3 が E4 に比べ約 2 倍量であったが、apoE の分泌量には差がなかった。(5) HDL サイズには apoE3, E4 の違いはなかった。(6)apoE3 はシステインが 1 つ含まれているため 2 量体を形成していた。以上の結果は、apoE3 と apoE4 の分泌量に差がないものの、HDL 新生能は前者が後者の 2 倍以上あり、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る ことを示唆している。

D. 考察

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、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、このカスケードを支える分子基盤については不明である。我々の昨年までの研究結果は、コレステロールが、このカスケードを促進させる中核的分子である可能性を示した。すなわち (1) アルツハイマー病患者の脳内（細胞外）で増加する Aβ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のではないかということである。こうしたコレステロール代謝破綻にたいして apoE は HDL 新生および供給によって、その恒常性維持に働くと思われる。しかし、本年度の研究結果が示したように、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を左右する可能性があるのではないかと考えられる。

apoE の HDL 新生作用にアイソフォーム特異性を生じさせている分子メカニズムについては、我々の実験結果から、apoE3 の持つシステインによるヂスルフィド結合によって 2 量体を形成することが脂質粒子の安定化に関連があるのではないかと考えれられた。

E. 結論

ApoE3 は apoE4 に比べ約 2 倍の HDL 新生能を持つことが明らかになった。中枢神経系での細胞内コレステロール代謝恒常性維持は、apoE 受容体による細胞外 HDL の取り込み、および apoEによるコレステロール搬出機構に大きく依存し、アミロイドカスケードの進行を担う分子基盤としてコレステロール代謝破綻(低下)の可能性が考えられることから、apoE-HDL 供給能(すなわち apoE の HDL 新生能)の低い apoE4 タイプの人はより早期にアルツハイマー病を発症するのではないかと説明することができる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

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

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 choleterol in pahotgenesis of Alzheimer's disease.
Mol Neurobiol (in press)

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

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 β-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、ゾウクン、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
ニーマンクピック 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 form human apolipoprotein E3- and E4-knock-in mice.
第 45 回日本神経化学会　2002 年月 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

ゾウクン、キョウ建生、柳澤勝彦、道川誠
A novel function of monomeric amyloid β-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（こころの健康科学研究事業）
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I　教授

研究要旨
ラットアストロサイトを用い、脳内HDL産生の機構とその脳障害時に於けるその修復機能に於ける役割について検討した。その結果、1)アストロサイトは、一定の条件下で酸性FGFを産生し、そのautocrine効果によりアポE新生が転写レベルから刺激されて、コレステロールに富んだHDLを放出する。
2）アストロサイトは、外因性アポA-Iなどに反応しHDLを産生するが、この時新規合成されたコレステロールとカベオリンが細胞質中の脂質・蛋白複合粒子に転移し、後にHDL中に現れる。この粒子にはcyclophilin Aが含まれ、その機能阻害でコレステロールのHDL中への放出もとまる。
3）HDL産生時に細胞からスフィンゴミエリンが放出され、それを補うためにレシチンから燐酸化コリンがセラミドへ転移される結果、シグナル開始脂質であるジグリセリドのが産生されることが分かった。

A. 研究目的

本研究は、脳の急性・慢性の障害修復機転の主要な機構である、脳内での障害細胞の処理と細胞・細胞膜再生のための細胞間コレステロール輸送システムの解明とそれによる脳内ステロール代謝平衡の維持の機序を明らかにすることを目的とした。このシステムの中心を担うのは、アストロサイトなどにより産生されるHDLであり、具体的には、このHDL産生の機序とその制御機構を中心に、詳細な検討を行った。

B. 研究方法

ラット胎児脳から分離したアストロサイトを中心に、そのアポE産生と外因性アポAI添加に反応しておこるHDL産生を詳細に検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は患者または正常人を問わずヒト試料を使用しておらず、倫理面で問題にすべき側面を含まない。また動物実験に関しては、本学動物実験安全倫理委員会の承認を得たものである。

C. 研究結果、及び　D. 考察

1）脳の障害後における、アストロサイトによるHDL産生の制御。脳の損傷後に、局所に於けるアストロサイトのアポE産生が刺激されることが知られ、それによるHDL産生も増加すると考えられている。アポEは癌化したアストロサイトからは合成されにくく、アストロサイトの分化マーカーの一つと考えられる（Zhang et al. JB 128, 837, 2000）。このメカニズムをin vivoとin vitroで検討した。マウスの脳を液体窒素の接触で損傷させ、その後の治癒を瘢痕の収縮で観察

すると、アポ E 欠損マウスでは正常マウスに比べ有意に遅延することが認められた。この時、正常マウスの患部のアストロサイトには、アポ E 合成増加に先立ち酸性 FGF の産生が認められ、アポ E 欠損マウスでも同じ時期に同じことが認められた（Tada, Ito, Yokoyama, manuscript submitted）。この病態生理的意義を検討するため、アストロサイトをストレス状態に置くために、長期培養を試みた。ラット小脳細胞を一ヶ月培養し、その後 1 週間アストロサイトとして 2 次培養すると、アポ E の合成。分泌が大幅に高まっており、培地中には HDL の産生が増加していた。この状態のアストロサイトの培地を通常の 1 週間 1 次、1 週間 2 次培養で得たアストロサイトに添加すると、アポ E-HDL の産生増加が認められ、この効果は産生 FGF の得意的抗体による培地の事前処理で消失した。また、長期培養細胞培地添加と同じアポ E-HDL 増産効果が、産生 FGF のアストロサイトへの添加によって再現された（Ueno et al.,BBA 1589, 261, 2002）。この結果、脳損傷後のアストロサイトでのアポ E-HDL 産生の増加は、アストロサイト自身により産生される酸性 FGF によるオートクリン刺激によるものであることが強く示唆された。今後、この酸性 FGF 産生をもたらす刺激を解明するとともに、シグナルペプチドを持たない酸性 FGF が放出される機序を明らかにする必要がある。

2) アストロサイトに於けるアポリポタンパク質による HDL 新生の機構。アストロサイトは、自ら合成するアポ E によってコレステロールに富んだ HDL を産生し、外因性のアポ A-I などにより相対的にコレステロールの少ない HDL を産生することは以前報告した（Ito et al. J. Neurochem. 72, 2362, 1999）。この機序について、外因性のアポ A-I に反応するコレステロールは、スフィンゴミエリンと堅く結合していることで運動性が低く、HDL に積み込まれにくいことが理由であることが示されて、所謂ラフト・ドメインの HDL 新生への関与が示唆された（Ito et al. J. LipidRes. 41, 894, 2000）。外因性アポ A-I との反応において、細胞内コレステロールと caveolin-1 の細胞質中の脂質蛋白複合粒子への移行が観察され、HDL 新生へのコレステロール動員の重要な機構であると考えられる（JBC 277, 7929, 2002）。また、HDL 新生に伴いスフィンゴミエリンが細胞から奪われるのに伴って、フォスファチジルコリンからセラミドへの燐酸コリンの転移で補填されることが示され、このときに結果的にジグリセリドが産生されて、シグナル起動の機序であることが想定された（JBC 277, 44709, 2002）。これらの反応には、アストロサイト特有のものと、他の細胞にも普遍的なものがあり、これらについてさらに詳細な検討を行っている。また、他の体細胞においてこの反応に於ける ABCA1 の中心的役割を果たしていることが示されていて、脳の障害修復機構に於ける ABCA1 の役割をさらに検討したい。

E. 結論

アストロサイトは脳内 HDL の産生の主要な細胞であり、脳障害など特定の条件で内因性アポ E 合成の昂進させる。また外因性アポリポ蛋白質にも反応して HDL を産生し、これに関連して細胞内コレステロール輸送の特異的経路が存在し、また細胞内情報伝達機構が起動する。

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中に健康危険情報として厚生労働省に報告すべきものはない。

G. 研究発表

1、論文発表

Li Q, Yokoyama S, Agellon LB.
Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins.
Biochim Biophys Acta 1580:22-30, 2002

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, 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 Biopys Acta 1589: 261-272, 2002

Arakawa R and Yokoyama S.
Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation.
J Biol Chem 277: 22426-22429, 2002

Wu C, Tsujita M, Okumura-Noji K, Usui S, Kakuuchi H, Okazaki M, Yokoyama S.
Cholesteryl Ester TransferProtein Expressed in Lecithin: Cholesterol Acyltransferase-Deficient Mice. Arterioscler. Thromb Vasc Biol 22: 1347-1353, 2002

Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S, Tsujita M, Kawabe Y, Kobayashi M, Izumi A, Khoro T, Tanaka T, Taniguchi H, Koyama H, Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y, Niki E, THamakubo T and Kodama T. Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of the LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions. Arterioscler. Thromb Vasc Biol 22: 1712-1719, 2002

Ito J, Nagayasu Y, Ueno and 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

Yamauchi Y, Abe-Dohmae S and Yokoyama S.
Differential Regulation of Apolipoprotein A-I/ATP binding Cassette Transporter A1 mediated Cholesterol and Phospholipid release. Biochim Biophys Acta1585: 1-10, 2002

Harada-Shiba M,Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S and Yamamoto A.
Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia.
Jclin Endocrin and Met. 2002 (in press)

Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okumura-Noji K and Yokoyama S.
Plasma Concentrations of LPL and LCAT are in Putative Association with Female Sex and Alcohol That are Independent Negative Risk Factors For Coronary Atherosclerosis in Japanese. Clin Chim Acta 2002 (in press)

Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T, Aoki R, Morinaga G, Okuhira K, Ikeda Y, Kano F, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Murata M, Yokoyama S and Ueda K. Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP binding/ hydrolysis. J Biol Chem 2003 (in press)

Yokoyama S. Brief history of LDL apheresis. Therapeutic Apheresis. Invited review. 2002 (in press)

Ito J and Yokoyama S.
Roles of glia cells in cholesterol homeostasis in the brain. In Non-neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction, Edited by Leif Hertz. Elsevier, Amsterdam 2003 (in press)

2.学会発表

奥平桂一郎、半田哲郎、山内祥生、堂前純子、横山信治　Lipid-free,Lipid-bound apoA-1 と細胞との相互作用　脂質搬出機構のメカニズムの解析　第 66 回日本循環器学会学術集会　2002 年 4 月 24-26 日　札幌

山内祥生、堂前純子、横山信治
アポリポタンパク質依存的な High Density Lipoprotein 形成のカスケード反応
第 44 回日本脂質生化学研究会　2002 年 6 月 14-15 日　東京

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 astrocytes.
第 45 回日本神経化学会大会 2002 年 7 月 17-19 日

呉　成愛、辻田麻紀、野路久仁子、臼井真一、角内　創、岡崎三代、横山信治
LCAT による血中 CETP 量の調節
第 34 回日本動脈硬化学会 2002 年 6 月 18-19 日 神戸

辻田麻紀、呉成愛、角内創、臼井真一、岡崎三代、Vance Dennis、横山信治
肝細胞における apoAI-HDL 産生の機構
第 34 回日本動脈硬化学会 2002 年 6 月 18-19 日 神戸

堂前純子、青木綾、植田和光、横山信治
アポ AI 依存性 HDL 新生反応と ABCA1 遺伝子発現　堂前純子、青木綾、植田和光、横山信治第 34 回日本動脈硬化学会 2002 年 6 月 18-19 日　神戸

呉　成愛、辻田麻紀、野路久仁子、臼井真一、角内　創、岡崎三代、横山信治
HDL 濃度による 血中 CETP レベルの調節
第 75 回日本生化学会大会　10 月 14-17 日　京都

辻田麻紀、呉成愛、臼井真一、角内創、岡崎三代、横山信治
ヒト肝株細胞における apoAI-ABCA1 経路による HDL 新生の機序　第 75 回日本生化学会大会 2002 年 10 月 14-17 日　京都

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 回日本生化学会大会　2002 年 10 月 14-17 日　京都

奥平桂一郎、半田哲郎、山内祥生、堂前純子、横山信治
脂質搬出における HDL 粒子と細胞との相互作用
第 75 回日本生化学会大会　2002 年 10 月 14-17 日　京都

堂前純子、植田和光、横山信治
ABCA1 ならびに ABCA7 を介したアポリポタンパク質依存性 HDL 新生反応　第 75 回日本生化学会大会　2002 年 10 月 14-17 日　京都

山内祥生、堂前純子、横山信治
Protein Kinase C による ATP binding cassette transporter (ABC) A1 のタンパク質レベルの調節　第 75 回日本生化学会大会　2002 年 10 月 14-17 日　京都

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

Suzuki S, Shigeyama J, Takeda Y, Suzumura H, Yamada Y, Horio T, Fukutomi T, Abe-Dohmae S, Itoh M, Yokoyama S. Verapamil enhances apolipoprotein A-I (apoa-I) mediated cellular lipid release and ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 expression in RAW264cell-line cells. The 14th Biennial Meeting of the Internatinal Society for Developmental Neuroscience .
2002, Jan.31- Feb. 2, Sydney, Australia

Yamauchi Y, Arakawa R, Abe-Dohmae S and Yokoyama S.
Cascade reactions for cholesterol mobilization to assenbly of high density lipoprotein by the apolipoprotein/ATP binding cassette transporter A1pathway ordon Research. Conference on Lipoprotein Metabolism June 16 – 21, 2002 Madelene, NH

Yokoyama S.
Cellular responses to Apolipoprotein/ABCA1-mediated removal of cellular lipids. Australian Atherosclerosis Society. October 1–3, 2002 Sydney, Australia

Yokoyama S.
Course on HDL, Atherosclerosis and The Metabolic Syndrome, sponsored by International Society of Atherosclerosis October 1–3, 2002, Sydney, Australia

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
   アポリポタンパク質 E の分泌促進剤
   出願番号：特願 2001-263547
   発明者：横山信治・金明俊
   出願人：中外製薬　特許出願中

   プロテアーゼ阻害剤による低 HDL 血症改善
   出願番号：特願 2001-314756
   発明者：横山信治・荒川礼二郎、
   出願人：グレラン製薬　特許出願中

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（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

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

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もなう細胞死が観察された。変異プレセニリンはタウ蛋白のリン酸化、p38MAPK および SAPK の活性化を抑制し、プレセニリンが SAPK カスケードに関与していることが示唆された。また、cholesterol はこのカスケードよりも上流にて酸化ストレスに抑制的に関与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)内蛋白コンフォー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、tunicamicine 等により蛋白コンフォーメーション異常を誘導する（ER ストレス）と通常は Ire 1 の経路を通って 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、thapisgargine、カルシウムイオノフォア等の添加）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。一昨年度および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、

さらにこの 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。その結果としては、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、このようなリ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、28S および 18S の ribosomal RNA の酸化は亢進し、また SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化が亢進した。また、cholesterol の合成阻害剤である compactin 添加して同様の実験をおこなうと、28S および 18S の ribosomal RNA の酸化はさらに亢進すること、SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化はさらに増加することが判明した。これにより、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ていた。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 の効果について、プレセニリン変異の影響を検討した。

B. 研究方法

SY5Y 神経芽細胞腫にプレセニリン（ wild type、L250S 変異、⊿Exon9 ）を強制発現した細胞株は、Dr. Tanii H より供与いただき(Tanii, H., et al. Neuroscience. 2000;95(2):593-601.)、これを 5% FCS を含む D-MEM/F-12 にて培養して実験に使用した。以前と同様に、singlet oxygen を介する核酸への酸化ストレスとして色素（ 2μg/ml rose bengal、2 μg/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。さらに、および脂質の影響を見るために細胞を 1 μM compactin で 24 時間処理し cholesterol を deplete した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 $MgCl_2$、 0.1 mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM NaF、1 mM Na_3VO_4、1 mM PMSF、 5 μg/ml aprotinine、 5 μg/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)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。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

プレセニリン（wild type、L250S 変異、⊿Exon9）を強制発現した細胞株において、rose bengal を添加し光照射を行って、核酸への酸化ストレスを導入して、15 分、30 分、60 分、120 後の細胞を回収して検討をおこなった。まず、wild type のものに比べて L250S 変異および⊿Exon9 の細胞においては、p38 および SAPK のリン酸化反応はほとんど消失していた。このとき、p38 および SAPK の発

現量は一定であった（リン酸化非依存性抗体により確認）。さらに、タウ蛋白リン酸化（Ser396/404）についても、wild typeのものに比べてL250S変異および⊿Exon9の細胞においては、リン酸化の亢進はほとんど消失していた。しかし、細胞死に関しては、wild typeのものでも刺激後時間とともに細胞死は増大したが、変異プレセニリン導入細胞の方が細胞死率が高かった。以上により、変異プレセニリンは、何らかの機序でストレスに関する情報がp38およびSAPKに伝達する過程で障害が生じている可能性が示唆された。

次に、このプレセニリン導入細胞に1μg/ml compactin添加した後にrose bengalを添加し光を照射して検討をおこなった。昨年度の検討では、通常のSY5Y神経芽細胞腫においてcompactin添加したものと添加しなかったものに刺激をおこない比較したところ、compactin添加したもののほうが、28Sおよび18Sのribosomal RNAの酸化は亢進し、またSAPK活性とタウ蛋白のリン酸化が亢進していた。プレセニリン導入細胞にcompactinを添加したものと添加しなかったものに刺激をおこない比較したところ、wild typeのもので昨年と同様に、compactinを添加したものにおいてはSAPK活性とタウ蛋白のリン酸化が亢進が増強していた。しかし、L250S変異および⊿Exon9の変異プレセニリン導入細胞においては、SAPK活性とタウ蛋白のリン酸化はcompactinを添加したものにおいても添加しなかったものにおいてもどちらも認められなかった。さらに細胞死に関しての検討では、compactin添加したもののほうが細胞死が多いという現象は、wild typeのものでもL250S変異および⊿Exon9のものでも認められた。よって、cholesterolにはSAPK活性とタウ蛋白のリン酸化に直接関与するのではなく、より上流のレベルで関与すること、および細胞死に関してはcholesterolがなくなることにより加算的に関与することが示唆された。

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(Tsujio, 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は、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。また、statin系薬剤がアルツハイマー病発症に関して抑制的にはたらくという疫学調査や、cholesterolの細胞内輸送蛋白である蛋白NPCの機能欠損によって生じるNiemann-Pick病type Cにおいて脳内に広範に神経原線維変化が認められるという事実は、cholesterolと神経変性との間に密接な関わりがあることを示唆している。そこで、昨年度までの研究はこのタウ蛋白リン酸化をともなう神経細胞死を誘導するストレスとして、リボトキシックストレスを用いて検討をおこないcholesterolの関与に関しても検討をおこなった。リボソームはERにも局在することから、このストレスはERを含む細胞内代謝過程に密接な関係があるものと推定されている。昨年までの結果から示唆されたことは、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ボトキシックストレスがあり、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、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ということであった。

今年度は変異プレセニリンそのものを細胞に導入して、このリボトキシックストレス反応への影響を検討した。結果としては、プレセニリン（wild type、L250S 変異、⊿Exon9）を強制発現した細胞株でリボトキシックストレスを負荷すると、wild type のものに比べて L250S 変異および⊿Exon9 の細胞においては、p38 および SAPK のリン酸化反応はほとんど消失しており、さらにタウ蛋白リン酸化（Ser396/404）についても同様にリン酸化の亢進はほとんど消失していた。しかし、細胞死に関しては、wild type のものより変異プレセニリン導入細胞の方が細胞死率が高かった。これらのことは、まず何らかの機序でストレスに関する情報が p38 および SAPK に伝達する過程でプレセニリンが関与しており、変異プレセリンによって何らかの障害が生じている可能性が考えられる。現時点でこの点を明確にすることはできないが、今までの報告からプレセニリンが結合する APP（アミロイド前駆体蛋白）が JIP（JNK に結合する活性化抑制蛋白）とも結合することが報告されており、プレセニリンコンプレックス全体のコンフォーメーションの変化が何らかの影響を与えている可能性を示唆しているものと推定される。具体的には、JIP と JNK の結合・共在が強化されていることが確認されれば、この考え方が正しいことが示唆されるが、現在検討中である。また、細胞死に関しては wild type のものに比べて L250S 変異および⊿Exon9 の細胞の方が、細胞死率は高かったが、このことは細胞死シグナルが p38 および SAPK の下流にあるのみではなく、独立のカスケードにも依存していることを示唆していると考えられる。

次に、プレセニリン導入細胞に compactin を添加して比較したところ、変異プレセニリン導入細胞においては SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化は compactin を添加したものにおいても添加しなかったものにおいてもどちらも認められなかった。この結果によると、cholesterol には SAPK 活性とタウ蛋白のリン酸化に直接関与するのではなく、より上流のレベルで関与することが示唆されている。昨年度の結果からは、cholesterol の機能については singlet oxygen を補足してストレスを減弱している可能性などを想定していた。例えば、cholesterol は singlet oxygen と反応して 3β-hydroxy-5α-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)。つまり、この実験系におけるストレスの情報伝達において最も上流で作用していることを想定していたが、今回の結果はこれと矛盾してない。今後、変異タウ蛋白導入細胞においても、このような核酸の酸化に伴うリボ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予定でいる。

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ボトキシックストレスがあり、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、p38MAPK および SAPK の活性化が誘導される。変異プレセニリンはタウ蛋白のリン酸化、p38MAPK および SAPK の活性化を抑制し、プレセニリンが SAPK カスケードに関与していることが示唆された。また、cholesterol はこのカスケードよりも上流にて酸化ストレスに抑制的に関与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

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、鈴木英鷹、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研究 精神薬療研究年報 34:21-27,2002

Kamino K, Kida T, Tanaka T, Tanii H, Ohkochi M, Kudo T, Kobayashi T, Takeda M.
Apolipoproteins and β amyloid transport pathway
Psychogeriatrics 2,149-155,2002.

田中稔久、武田雅俊 アルツハイマー病の診断の新機軸 臨床と研究 79,930-933,2002

田中稔久、武田雅俊 免疫療法の開発と問題点
老年精神医学雑誌 31,1177-1180,2002

田中稔久、武田雅俊 タウ蛋白の異常と痴呆症 − 神経変性メカニズムの理解 脳と神経 54,777-787,2002

紙野晃人、田中稔久、貴田智之、大河内正康、谷井久志、工藤喬、武田雅俊 アルツハイマー病における脂質代謝の役割 日本神経精神薬理雑誌 22,103-110,2002

2. 学会発表

武田雅俊、田中稔久、和田健二、山森英長 核酸の酸化にともなうタウ蛋白リン酸化についての検討 第 68 回老化防止委員会 2002 年 1 月 12 日 名古屋

田中稔久 シンポジウムII タウ・シヌクレイン・ニューロフィラメントと神経変性メカニズム タウ蛋白と神経変性メカニズム 第 21 回日本痴呆学会 2002 年 10 月 3-4 日 大阪

田中稔久、山森英長、田中修二、和田健二、鈴木英雄、紙野晃人、工藤喬、大河内正康、谷井久志、小池裕子、以倉康充、貴田智之、松本均彦、福森亮雄、金山大祐、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研究 第 35 回精神神経系薬物治療研究報告会 2002 年 12 月 6 日 大阪

Tanaka T, Tanaka S, Yamamori H, Wada K, Takeda M.
Phosphorylation of Tau Protein in Cultured Cells by Polyinocinic-Polycytidic Acid.
The 8th international conference on Alzheimer disease and related disorders.
Neurobiol Aging (Abst.)
July 20-25, 2002, Stockholm, Sweden

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

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
Ito J and Yokoyama S.	Roles of glia cells in cholesterol homeostasis in the brain.	Hertz	In Non-neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction.	Elsevier	Amsterdam	2003	(in press)

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, Kokame 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	27	12915-12920	2002
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	70	438-446	2002
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 J S 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
Yanagisawa K.	Cholesterol and pathological processes in Alzheimer's disease.	J Neurosci Res	70	361-366	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 β-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage.	J Neurosci	22	4833-4841	2002
Komano H, Shiraishi H, Kawamura Y, Sai X, Suzuki R, Serneels L, Kawaichi M, Kitamura T and Yanagisawa K	A new functional screening system for identification of regulators for the generation of amyloid β-protein.	J Biol Chem	277	39627-39633	2002
Kakio A, Nishimoto S, Yanagisawa K, Kozutsumi Y and Matsuzaki K.	Interactions of amyloid β-protein with various gangliosides in raft like membranes: Importance of GM1 ganglioside-bound form as an endogenous seed for Alzheimer amyloid.	Biochemistry	23	7385-7390	2002
Watarai M, Makino S, Michikawa M,	Macrophage plasma membrane cholesterol contributes *Brucella abortus*	Infection and Immunity	70	4818-4825	2002

Yanagaisawa K, Murakami S and Shirahata T.	us infection of mice.			4825	
Garver WS, Krishnan K and 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	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	72	(in press)	2003
Michikawa M.	Role of choleterol in pahotgenesis of Alzheimer's disease.	Mol Neurobiol		(in press)	2003
Yamauchi Y, Abe-Dohmae S, Yokoyama S.	Differential regulation of apolipoprotein A-I/ATP binding cassette transporter A1-mediated cholesterol and phospholipid release.	Biochim Biophys Acta	1585	1-10	2002
Ito J, Nagayasu Y, Ueno S, Yokoyama S.	Apolipoprotein-mediated cellular lipid release requires replenishment of sphingomyelin in a phosphatidylcholine-specific phospholipase C-dependent manner	J Biol Chem.	227	44709-44714.	2002
Ueno S, Ito J, Nagayasu Y, Furukawa T, 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
Arakawa R and Yokoyama S.	Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation.	J Biol Chem	227	22426-22469	2002
Li O, Yokoyama S, Agellon L B.	Active taurocholic acid flux through hepatoma cells increases the cellular pool of unesterified cholesterol derived from lipoproteins	Biochim Biophys Acta	1580	22-30	2002
Wu C, Tsujita M, Okumura-Noji K, Usui S, Kakuuchi H, Okazaki M, Yokoyama S.	Cholesteryl Ester TransferProtein Expressed in Lecithin: Cholesterol Acyltransferase-Deficient Mice.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	22	1347-1353	2002
Wada Y, Sugiyama A, Yamamoto T, Naito M, Noguchi N, Yokoyama S Tsujita M, Kawabe Y, Kobayashi M, Izumi A, Khoro T, Tanaka T, Taniguchi H, Koyama H Hirano K, Yamashita S, Matsuzawa Y, Niki E, THamakubo T and Kodama T.	Lipid accumulation in smooth muscle cells under LDL loading is independent of the LDL receptor pathway and enhanced by hypoxic conditions.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	22	1712-1719	2002
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

Harada-Shiba M,Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S and Yamamoto A.	Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia.	Jclin Endocrin and Met		(in press)	2002
Goto A, Sasai K, Suzuki S, Fukutomi T, Ito S, Matsushita T, Okamoto M, Suzuki T, Itoh M, Okumura-Noji K and Yokoyama S.	Plasma Concentrations of LPL and LCAT are in Putative Association with Female Sex and Alcohol That are Independent Negative Risk Factors For Coronary Atherosclerosis in Japanese.	Clin Chim Acta		(in press)	2002
Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T, Aoki R, Morinaga G, Okuhira K, Ikeda Y, Kano F, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Murata M, Yokoyama S and Ueda K.	Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP binding/ hydrolysis.	J Biol Chem		(in press)	2003
Yokoyama S.	Brief history of LDL apheresis. Therapeutic Apheresis.	Therapeutic Apheresis		(in press)	2002

20020895

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.32－P.34の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。