

20030202

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成16 (2004) 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 ————— 9
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 ————— 13
- cytosolic lipid-protein particle と細胞骨格の相互作用 -
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 ————— 17
藤野 貴広

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

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 国立長寿医療センター（研究所）アルツハイマー病研究部 室長

研究要旨

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、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を担っていることを明らかにした。本年度は、apoE-HDL 複合体の神経細胞膜コレステロールに対する影響を検討した。その結果、apoE4 は apoE3 に比べて、脂質粒子に親和性が高く HDL 表面に apoE 分子が数多く結合し、それが HDL と細胞膜コレステロールとのコレステロール交換作用を抑制するために、コレステロール交換作用は apoE3-HDL >> apoE4-HDL であることを明らかにした。このことは、細胞のコレステロール交換作用が強い apoE3-HDL の方が、新しい細胞膜のコレステロール維持に役立っていると考えられる。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特異的に cytosolic lipid-protein particle (CLPP) を形成すること、またこれらが細胞質へ移行する細胞内輸送反応は、一過性に産生される diacylglyceride に依存することを見出した。これらの知見は、HDL 新生を細胞内メカニズムの制御によって制御することができる可能性を示唆しており、今後の治療戦略を考える際に重要であると考えられた。また、藤野らは、ApoE/VLDLR/ApoER2 を共に欠損する TKO マウスを作製した。このマウスでは DKO マウスと比較して、海馬の層構造形成異常の亢進、血中コレステロール濃度の上昇を引き起こすこと、脳発生過程において VLDLR が ApoE の受容体として主要な役割を果たしていること、ApoER2 及び LDLR KO マウスは、タウ蛋白の高度リン酸化に著しい抵抗性を示すこと等を見出し、脳内のコレステロール代謝変動がアルツハイマー病で見られるタウ蛋白高度リン酸化と深い関連があることを明らかにした。

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 愛媛大学・総合科学研究支援センター
・生物機能解析分野 助教授

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

ベオーラという 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 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、(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) apoA1 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が、スフィンゴリ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 にくらべて 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。この知見を受け、本年度はその細胞内 HDL 新生の分子メカニズムを解明することを目的に研究を行った。また、藤野らは、ApoE の脳内コレステロール代謝における機能及びアルツハイマー病発症における役割を解析することを目的に、ApoE/VLDLR/ApoER2 を共に欠損する TKO マウスを作製し、DKO マウスと比較検討した。その結果、上記 apoE およびコレステロール代謝関連の遺伝子発現の変化に応じて、脳内のコレステロール代謝変動が生じ、その結果アルツハイマー病で見られるタウ蛋白高度リン酸化を引き起こすことを示唆するデータを得た。

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。脂質分析では、diacylglyceride (DG), cholesterol (Cho), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC) 合成には 3H-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 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。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。

(1) 細胞質の調製

培養アストロサイトを 0.02M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing protease inhibitor (0.02M Tris) により回収し、5 分間毎に 20 回強く攪拌し、これを 3 回くり返した。90,000 rpm で 30 分間遠心し、得られた上清を細胞質画分とした。

(2) 培養ろ液の脂質分析

diacylglyceride (DG), cholesterol (Cho), sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC) 合成には 3H-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 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、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。

(4) 微小管様フィラメントの再構成

細胞質画分に 100 uM GTP と 2 mM MgCl₂ を加えて、室温で 20 分間インキュベートした。これを、15,000 rpm ,30 分間遠心沈澱を larger reconstituted microtubule-like filament とし、遠心上清をさらに 80,000 rpm 30 分間の遠心し、その沈澱画分を shorter reconstituted filament とした。

(5) マウス ApoE 受容体 2 (ApoER2) 遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、ApoER2 欠損マウスを作製した。また、VLDLR/ApoER2 遺伝子を欠損したダブルノックアウト (DKO) マウス、更に ApoE/VLDLR/ApoER2 遺伝子を欠損するトリプルノックアウト (TKO) マウスを作製した。これら DKO 及び TKO マウスを組織学及び生化学レベルで比較解析することにより、脳神経系におけるリポタンパク受容体と ApoE の役割を解析した。さらに、ApoE、VLDLR、ApoER2 又は LDLR をそれぞれ欠損したマウスを 48 時間絶食させ、脳内のタウ蛋白リン酸化状態を解析した。

(倫理面の配慮)

実験動物を用いる実験は、国立長寿医療研究センター実験動物倫理委員会、名古屋市立大学医学部倫理委員会、および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

(1) apoE-HDL は、神経細胞からコレステロールを引き抜くことが知られているが、その作用は apoE3-HDL >> apoE4-HDL であった。この違いのメカニズムを明らかにするために、人工的に作った HDL 様粒子 (エマルジョン: EM) を用いて EM-apoE 複合体を作り、apoE と EM との結合比を様々に変えながら、EM-apoE 複合体の神経細胞からのコレステロール引き抜き作用を検討した。その結果、(2) EM の引き抜き作用は、apoE 分子と結合することによってその分子数依存的に抑制されることが明らかになった。(3) また、apoE4 の方が apoE3 に比べて脂質粒子に親和性が高く結合しやすいことが明らかになった。(4) ベータメルカプトエタノールで apoE3 どうしの 2 量体結合を切断すると apoE3 と apoE4 のアイソフォーム依存性は消失した。

(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 α の分布を調べ

てみると、刺激後 5 分以降で細胞膜 protein kinase C α 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 γ 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 γ 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 α もこの画分に移行した。U73122 は protein kinase C α 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 α 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 α が免疫沈降し、また抗 protein kinase C α 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 α 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巢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

(道川) apoE3-HDL および apoE4-HDL の神経細胞からのコレステロール搬出作用は、apoE3 と apoE4 の脂質粒子への親和性の違いによって説明がつくこと、その親和性の違いを生み出しているものが apoE3 の持つシステインによる 2 量体形成であることが明らかになった。昨年度の研究から、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明らかにし、A β 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提示した。今年度の研究結果は、HDL と神経細胞膜間のコレステロール交換作用において、apoE3-HDL は、apoE4 型に比べて圧倒的に強い作用を持つことが明らかになった。これは、加齢あるいは A β 重合体形成・濃度上昇に伴って増加する活性酸素産生によって増加する酸化コレステロールなどを新たなコレステロールと交換する能力が apoE3 型の方が優れていることを示唆している。すなわち、apoE3 型の

アストロサイトは、apoE4 型に比べてコレステロール供給のみならず、膜のコレステロール新陳代謝にも優れていることが考えられる。

(伊藤) アストロサイトを apoA-I で 5 分間刺激すると、細胞質において caveolin-1 と protein kinase C α , β -tubulin, β -actin との結合が増加した。これらの結合は caveolin-1 の scaffolding domain と同一の peptide により抑制された。また、caveolin-1 と protein kinase C α の結合は 60mM octylglycoside と 1% Triton X-100 を含む溶液によっても抑制されないことから、CLPP 上での間接的な結合ではなく、直接結合していることが示唆された。ApoA-I で 5 分間刺激されたアストロサイトの細胞質より微小管を再構成すると、caveolin-1 や protein kinase C α は再構成フィラメントからも回収された。また、apoA-I で 5 分間刺激されたアストロサイトの細胞質をショ糖密度勾配の超遠心で分析すると、CLPP 画分から回収される β -tubulin や β -actin は増加した。これらの結果から、CLPP 画分における caveolin-1 と protein kinase C α は細胞骨格、特に微小管と密接に相互作用することが示唆された。

細胞質におけるコレステロールやリン脂質は部分的に再構成された微小管様フィラメントとともに回収され、これは apoA-I 刺激によりさらに上昇した。

これまでの研究で、CLPP 画分へ移行した protein kinase C α はセリンリン酸化され、活性化されていることを見出した。アストロサイトの細胞質におけるリン酸化反応を検討した結果、apoA-I で 5 分間刺激によりリン酸化反応は著しく増加した。特に、45 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 20 kDa などのタンパク質がリン酸化された。また、細胞

質における抗 caveolin-1 抗体で免疫沈降されたタンパク質のリン酸化反応は、apoA-I 刺激により 52 kDa, 45 kDa, 36 kDa タンパク質のリン酸化が促進された。これらのリン酸化反応は、protein kinase C 阻害剤である bisindolylmaleimide 1 により著しく抑制された。

(藤野) TKO マウスでは DKO マウス (VLDLR/ApoER2) に比べ、明らかに海馬の層構造形成異常が更に亢進しており、ほぼ生後 4 週間以内に死亡する。これは TKO マウスにおける著しい体温低下が原因であることが示唆された。一方、DKO マウスでは約 20%が 3 ヶ月以上生存した。VLDLR(+/-)/ApoER2(-/-)では海馬 CA1 領域及び CA3 領域のリボン部分の錐体細胞層が 2 層に分離しているが、ApoE がさらに欠損することで錐体細胞層が 1 層に回復した。一方、小脳や大脳皮質においては、ApoE の有無による違いは全く見いだせなかった。これら結果は、ApoE が CA1 領域及び CA3 領域において VLDLR と reelin の結合を競合的に阻害していることを示した。また、LDLR/ApoER2 を共に欠損したマウスの解析から、LDLR は VLDLR や ApoER2 に比べ弱いながらも大脳皮質と海馬に於いて reelin 受容体としても機能しているが、ApoE に対する受容体としての機能は見いだせなかった。TKO マウスでは他の遺伝型を持つマウスと比較して、著しく高い血中コレステロール値を示したが、血中リポタンパクの HPLC 解析から、このマウスに見られる高コレステロール血漿は脳形成の異常によるものではないことが示唆された。また、DKO マウス脳内ではタウ蛋白が高度にリン酸化を受けているが、TKO マウスでも同様な高度なリン酸化が検出された。これに伴って Ser9

部位のリン酸化による GSK β 3 inactivation の増加が観察された。これ以外のタウ蛋白・キナーゼである MAPK、p35 CDK5 regulatory subunit、SAPK/JNK、またタウ蛋白・フォスファターゼの PP2A には変化は認められなかった。

ApoE、VLDLR、ApoER2 又は LDLR を欠損したマウスを 48 時間絶食させ、脳内タウ蛋白のリン酸化を解析した。ApoER2 及び LDLR KO マウスでは野生型マウスと比較して、絶食に対するタウ蛋白のリン酸化に著しい抵抗性を示した。

E. 結論

(道川) 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、apoE3-HDL および apoE4-HDL の神経細胞からのコレステロール搬出作用は、apoE3-HDL > apoE4-HDL であること、これは、加齢あるいは A β 重合体形成・濃度上昇に伴って増加する活性酸素産生によって増加する酸化コレステロールなどを新たなコレステロールと交換する能力が apoE3 型の方が優れていることを示唆している。すなわち、apoE3 型のアストロサイトは、apoE4 型に比べてコレステロール供給のみならず、膜のコレステロール新陳代謝にも優れていることが考えられる。

(伊藤) apoA1 は細胞骨格と caveolin-1、protein kinase C および CLPP の結合を促進した。コレステロール細胞内輸送が細胞骨格、特に微小管によって制御されていることが考えられる。

(藤野) KO マウスを用いた解析から、脳内における ApoE 受容体としては VLDLR が主要な役割を果たしていること、ApoE は神経細胞の分化発生や移動及び配置決定に関わるシグナルを伝えている可能性が示唆された。また、ApoER2

及び LDLR はタウ蛋白の高度リン酸化において重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants.

Biochim Biophys Acta., 1676(1): 51-62, 2004.

Sawamura N, Ko M, Yu W, Zou K, Hanada K, Suzuki T, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids.

J. Biol. Chem., 2004 (in press)

Zou K, Kim D, Kakio A, Byun K, Gong JS, Kim M, Sawamura N, Nishimoto S, Matsuzaki K, Lee B, Yanagisawa K, Michikawa M.

Amyloid β -Protein (A β)1-40 Protects Neurons from Damage Induced by A β 1-42 in Culture and in Rat Brain. *J. Neurochem.*, 87: 609-619, 2003.

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.

Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H, Araki N. Tissue culture methods to study neurological disorders: establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology*, 23(1): 68-78, 2003.

Sakaguchi N, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, Maeda N, Noda M, Yamamoto T, Michikawa M, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T.

Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons.

Neurosci. Res., 45(2): 219-24, 2003.

Michikawa M. Cholesterol paradox: Is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease.

J. Neurosci. Res., 72: 141-146, 2003.

Michikawa M. Role of cholesterol in the amyloid cascade. - Dual metabolic interaction between amyloid β -protein and cholesterol.

Mol. Neurobiol., 27: 1-11, 2003.

Tada T, Ito J, Asai M, Yokoyama S.

Fibroblast growth factor 1 is produced prior to apolipoprotein E in the astrocytes after cryo-injury of mouse brain.

Neurochem. Int., (in press)

Magoori K, Kang M-J, Iwazaki MI, Kakuuchi H, Ioka RX, Kamataki A, Kim D-H, Asaba H, Iwasaki S, Takei YA, Sasaki M, Usui U, Okazaki M, Takahashi S, Ono M, Nose M, Sakai J, Fujino T, Yamamoto TT.

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., 278: 11331-11338, 2003.

Fujino T, Ikeda Y, Osborne TF, Takahashi S, Yamamoto TT, Sakai J. Sources of acetyl-CoA : acetyl-CoA synthetase1 and 2.

Curr Med Chem - Immunol, End Met Agents 3: 207-210, 2003

Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Miyamori I, Yamamoto TT.

The very low density lipoprotein (VLDL) receptor - a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. *Mol. Cell Biochem.*, 248: 121-127, 2003.

Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H, Fujino T, Tanaka T, Asaba H, Ioka RX, Iwasaki S, Kaneko I, Takahashi S, Sakaue H, Kodama T, Yanagisawa M, Yamamoto TT, Ito S, Sakai J.

A krüppel-like factor KLF 15 mediates fasting-induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene, AceCS2. *J. Biol. Chem.* 2004 (in press)

2. 学会発表

Michikawa M.

Alzheimer's disease and cholesterol.

Department of Anatomy and Neuroscience, School of Medicine, Cheju National University, 2003年12月22-24日

チェジュ、韓国

Michikawa M.

The role of cholesterol in the amyloid cascade: A putative role in tau phosphorylation. Division of Psychiatry Research, University of Zurich
2003年10月28日
チューリッヒ、スイス

Michikawa M.

Neurodegenerative disease and cholesterol. Asian-Pacific Society for neurochemistry
2004年2月4-7日
香港、中国

Michikawa M.

The role of cholesterol in the amyloid cascade: A putative role in tau phosphorylation. The 3rd International Congress on Vascular Dementia
2003年10月23-26日
プラハ、チェコ共和国

Fujino T. Roles of LDL-receptor related protein 5, LRP5, in lipoprotein and glucose metabolism. Gordon Research Conferences, atherogenesis
2003年
ニューハンプシャー、アメリカ合衆国

Ito J, Nagayasu Y, Yokoyama S.
The XIII th International Symposium on Atherosclerosis Satellite Symposium.
Apo A-I stimulates diacylglyceride production in intracellular lipoprotein fraction of astrocytes.
2004年10月3-4日 沖縄

道川 誠

老年期痴呆疾患とその治療の現状
第16回中部科学技術交流会 (財団法人科学技術交流財団主催) 2004年1月27日 名古屋

道川 誠

アルツハイマー病発症機構におけるコレステロールの果たす役割の研究
日本農芸化学会 2003年4月3日 藤沢

道川 誠

ApoE-isoform-specific risk for Alzheimer's disease mediated by cholesterol
第26回日本神経科学会 2003年7月23日 名古屋

ゾウクン, Kim Daesung, 垣尾敦子, Kyunghee Byun, キョウ建生, Myeongju Kim, 澤村直哉, 西本清一, 松崎勝巳, Bonghee Lee, 柳澤勝彦,
道川 誠

アミロイドβ蛋白(Aβ)42による神経毒性に対する Aβ 40の細胞保護作用の検討
第46回日本神経化学会 2004年9月24日 新潟

Zou K, Kim D, Byun K, Gong JS, Kim M, 澤村直哉, Lee B, 柳澤勝彦, 道川 誠
Aβ1-42によって誘導される神経毒性に対する Aβ1-40の細胞保護作用の検討
第22回日本痴呆学会 2003年10月3日 東京

伊藤仁一、横山信治

脳における HDL 機能とその病態生理
第26回日本神経科学会大会シンポジウム
2004年7月23-25日 名古屋

伊藤仁一、長安祐子、横山信治

Translocation of protein kinase C to cytosol in astrocytes by apolipoprotein A-I.
第46回日本神経化学会 2004年9月24-26日 新潟

伊藤仁一、長安祐子、横山信治

Apolipoprotein A-I induces protein kinase C translocation to cytosol in astrocytes.
第76回日本生化学会 2004年10月15-18日 横浜

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

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 国立長寿医療センター（研究所）アルツハイマー病研究部 室長

研究要旨

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から産生される apoE-HDL の作用について apoE アイソフォーム依存性の観点から検討した。その結果、(1) apoE-HDL は、神経細胞からコレステロールを引き抜くことが知られているが、その作用は apoE3-HDL >> apoE4-HDL であった。この違いのメカニズムを明らかにするために、人工的に作った HDL 様粒子（エマルジョン：EM）を用いて EM-apoE 複合体を作り、apoE と EM との結合比を様々に変えながら、EM-apoE 複合体の神経細胞からのコレステロール引き抜き作用を検討した。その結果、(2) EM の引き抜き作用は、apoE 分子と結合することによってその分子数依存的に抑制されることが明らかになった。(3) また、apoE4 の方が apoE3 に比べて脂質粒子に親和性が高く結合しやすいことが明らかになった。以上から、apoE4 は apoE3 に比べて、脂質粒子に親和性が高く結合しやすいために apoE4-HDL あるいは apoE4-EM 粒子のコレステロール引き抜き作用が弱いと考えられた。HDL による神経細胞からのコレステロール引き抜きは、実は両者間の物理化学的拡散によるコレステロール交換の一環として引き起こされると考えられ、このことは、apoE3-HDL の方が、細胞のコレステロール交換作用が強く、常に新しい細胞膜のコレステロール維持に役立っていることを示唆している。

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、(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研究してきた。当研究室におけるこれまでの研究成果は、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β-蛋白(Aβ)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 β 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 β 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。昨年度は、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、HDL 新生作用は apoE3 型のアストロサイトは apoE4 型に比べ約 2 倍であることを明らかにし、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ため 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明らかにした。本年度は、更に apoE-HDL 粒子の作用そのものについて検討した。

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 HDL を分離精製し、さらにアイソトープラベルした神経細胞に添加した。神経細胞培養の培地に放出された脂質（コレステロールおよびリン脂質）キットあるいはクロロフォルム：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、マイクロエマルジョンは共同研究者である京都大学大学院薬学研究科の半田教授のグループから提供を受け、apoE との複合体を形成させ、それらの神経細胞からの脂質搬出作用を検討した。

C. 研究結果

(1) apoE-HDL は、神経細胞からコレステロールを引き抜くことが知られているが、その作用は apoE3-HDL >> apoE4-HDL であった。この違いのメカニズムを明らかにするために、人工的に作った HDL 様粒子（エマルジョン：EM）を用いて EM-apoE 複合体を作り、apoE と EM との結合比を様々に変えながら、EM-apoE 複合体の神経細胞からのコレステロール引き抜き作用を検討した。その結果、(2) EMの引き抜き作用は、apoE 分子と結合することによってその分子数依存的に抑制されることが明らかになった。(3)また、apoE4の方が apoE3 に比べて脂質粒子に親和性が高く結合しやすいことが明らかになった。(4) ベータメルカプトエタノールで apoE3 どうしの 2 量体結合を切断すると apoE3 と apoE4 のアイソフォーム依存性は消失した。

D. 考察

以上の結果をまとめると、apoE3-HDL および apoE4-HDL の神経細胞からのコレステロール搬出作用は、apoE3 と apoE4 の脂質粒子への親和性の違いによって説明がつくこと、その親和性の違いを生み出しているものが apoE3 の持つシステインによる 2 量体形成であることが明らかになった。昨年度の研究から、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明らかにし、A β 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提示した。今年度の研究結果は、HDL と神経細胞膜間のコレステロール交換作用において、apoE3-HDL は、apoE4 型に比べて圧倒的に強い作用を持つことが明らかになった。これは、加齢あるいは A β 重合体形成・濃度上昇に伴って増加する活性酸素産生によって増加する酸化コレステロールなどを新たなコレステロールと交換する能力が apoE3 型の方が優れていることを示唆している。すなわち、apoE3 型のアストロサイトは、apoE4 型に比べてコレステロール供給のみならず、膜のコレステロール新陳代謝にも優れていることが考えられる。

E. 結論

apoE4 は apoE3 に比べて、脂質粒子に親和性が高く、より多くの apoE 分子が結合するために脂質粒子による細胞膜コレステロール交換作用を

抑制する。このため apoE4-HDL は apoE3-HDL に比して細胞膜コレステロール交換作用が弱く、細胞膜コレステロールを常に新しいコレステロールへ更新する能力が劣ると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim Biophys Acta.*, 1676(1): 51-62, 2004.

Sawamura N, Ko M, Yu W, Zou K, Hanada K, Suzuki T, Gong JS, Yanagisawa K, Michikawa M. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, 2004 (in press)

Zou K, Kim D, Kakio A, Byun K, Gong JS, Kim M, Sawamura N, Nishimoto S, Matsuzaki K, Lee B, Yanagisawa K, Michikawa M. Amyloid β -Protein (A β)1-40 Protects Neurons from Damage Induced by A β 1-42 in Culture and in Rat Brain. *J. Neurochem.*, 87: 609-619, 2003.

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.

Watabe K, Sakamoto T, Kawazoe Y, Michikawa M, Miyamoto K, Yamamura T, Saya H, Araki N. Tissue culture methods to study neurological disorders: establishment of immortalized Schwann cells from murine disease models. *Neuropathology*, 23(1): 68-78, 2003.

Sakaguchi N, Muramatsu H, Ichihara-Tanaka K, Maeda N, Noda M, Yamamoto T, Michikawa M, Ikematsu S, Sakuma S, Muramatsu T. Receptor-type protein tyrosine phosphatase zeta as a component of the signaling receptor complex for

midkine-dependent survival of embryonic neurons.
Neurosci. Res., 45(2): 219-24, 2003.

Michikawa M. Cholesterol paradox: Is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease.
J. Neurosci. Res., 72: 141-146, 2003.

Michikawa M. Role of cholesterol in the amyloid cascade. - Dual metabolic interaction between amyloid β -protein and cholesterol.
Mol. Neurobiol., 27: 1-11, 2003.

2. 学会発表

Michikawa M.
Alzheimer's disease and cholesterol.
Department of Anatomy and Neuroscience,
School of Medicine, Cheju National University,
2003年12月22-24日
チェジュ、韓国

Michikawa M.
The role of cholesterol in the amyloid cascade: A putative role in tau phosphorylation. Division of Psychiatry Research, University of Zurich
2003年10月28日
チューリッヒ、スイス

Michikawa M.
Neurodegenerative disease and cholesterol.
Asian-Pacific Society for neurochemistry
2004年2月4-7日
香港、中国

Michikawa M.
The role of cholesterol in the amyloid cascade: A putative role in tau phosphorylation. The 3rd International Congress on Vascular Dementia
2003年10月23-26日
プラハ、チェコ共和国

道川 誠
老年期痴呆疾患とその治療の現状
第16回中部科学技術交流会 (財団法人科学技術交流財団主催) 2004年1月27日 名古屋

道川 誠
アルツハイマー病発症機構におけるコレステロールの果たす役割の研究
日本農芸化学会 2003年4月3日 藤沢

道川 誠
ApoE-isoform-specific risk for Alzheimer's disease mediated by cholesterol
第26回日本神経科学会 2003年7月23日 名古屋

ゾウクン, Kim Daesung, 垣尾敦子, Kyunghye Byun, キョウ建生, Myeongju Kim, 澤村直哉, 西本清一, 松崎勝巳, Bonghee Lee, 柳澤勝彦, 道川 誠

アミロイド β 蛋白(A β)42による神経毒性に対するA β 40の細胞保護作用の検討
第46回日本神経化学会 2004年9月24日 新潟

Zou K, Kim D, Byun K, Gong JS, Kim M, 澤村直哉, Lee B, 柳澤勝彦, 道川 誠
A β 1-42によって誘導される神経毒性に対するA β 1-40の細胞保護作用の検討
第22回日本痴呆学会 2003年10月3日 東京

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

神経系細胞におけるコレステロール efflux 機構の解明

— cytosolic lipid-protein particle と細胞骨格の相互作用 —

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、アポリポプロテイン A-I (apoAI) で刺激されたアストロサイトは、細胞膜から caveolin 1 そして ER/Golgi からは新たに合成されたコレステロールやリン脂質が細胞質へと移行し、これらは特異的に cytosolic lipid-protein particle (CLPP) を形成して細胞膜まで輸送されることを見出した。ApoA-I 作用後のアストロサイト細胞内での一連のコレステロール細胞内輸送反応は、細胞質において一過性に産生される diacylglyceride に依存した。この diacylglyceride 産生は、CLPP 画分において上昇し、phospholipase C γ や protein kinase C α もまた CLPP 画分に移行した。

本研究では apoA-I で刺激されたアストロサイトにおいて、CLPP 画分に移行した protein kinase C α の細胞内コレステロール輸送における役割を研究した。apoA-I で5分間刺激されたアストロサイトの細胞質 caveolin-1 は CLPP において protein kinase C α 、 α -tubulin そして β -actin と結合した。微小管重合条件下で、caveolin-1 や protein kinase C α は再構成微小管様フィラメントと共に回収された。また、CLPP 画分のコレステロールやリン脂質も再構成微小管様フィラメントと共に回収された。これらの知見から、CLPP は微小管との相互作用を介して細胞内輸送されることが示唆された。また、protein kinase C α は CLPP と細胞骨格との相互作用を調節することが考えられた。

A. 研究目的

近年、アストロサイトの産生する cholesterol/HDL がシナプス形成に重要な因子であることが報告された。またアストロサイトが産生する HDL は neurite outgrowth を促進することからも、中枢神経組織はコレステロール要求性の高い組織であると考えられる。しかしながら中枢神経組織は、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、神経系細胞間コレステロール輸送の調節機構を含む、特異的なコレステロールホメオスタシスに関わる機構が中枢神経組織には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。こうしてアストロサイトの産生する各種 HDL が脳内細胞間コレステロール輸送に強く関わっていると考えられる。

私たちはこれまでの研究で、外来性 apoA-I 作用後のアストロサイト細胞質内に diacylglyceride がセカンドメッセンジャーとして産生されることを見い出した。本研究では、apoA-I 刺激後のアストロサイト細胞内で上昇した diacylglyceride によって活性化される protein kinase C α の細胞内コレステロール輸送における役割を検討した。

B. 研究方法

(1) ラットおよびマウスアストロサイトの養培
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 10 cm) にはん種し、1 週間 secondary culture し、実験に供した。

(2) 細胞質の調製

培養アストロサイトを 0.02M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing protease inhibitor (0.02M Tris) により回収し、5 分間毎に 20 回強く攪拌し、これを 3 回くり返した。90,000 rpm で 30 分間遠心し、得られた上清を細胞質画分とした。

(3) 培養ろ液の脂質分析

diacylglyceride (DG), cholesterol (Cho),

sphingomyelin (SM), phosphatidylcholine (PC) 合成には 3H-acetate を使い、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。

(4) 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 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、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。

(5) 微小管様フィラメントの再構成

細胞質画分に 100 uM GTP と 2 mM MgCl₂ を加えて、室温で 20 分間インキュベートした。これを、15,000 rpm, 30 分間遠心沈澱を larger reconstituted microtubule-like filament とし、遠心上清をさらに 80,000 rpm 30 分間の遠心し、その沈澱画分を shorter reconstituted filament とした。

(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 CO₂ 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 5 分間刺激すると、細胞質において caveolin-1 と protein kinase C α , α -tubulin, β -actin との結合が増加

した。これらの結合は caveolin-1 の scaffolding domain と同一の peptide により抑制された。また、caveolin-1 と protein kinase C α の結合は 60 mM octylglycoside と 1% Triton X-100 を含む溶液によっても抑制されないことから、CLPP 上での間接的な結合ではなく、直接結合していることが示唆された。ApoA-I で 5 分間刺激されたアストロサイトの細胞質より微小管を再構成すると、caveolin-1 や protein kinase C α は再構成フィラメントからも回収された。また、apoA-I で 5 分間刺激されたアストロサイトの細胞質をショ糖密度勾配の超遠心で分析すると、CLPP 画分から回収される α -tubulin や β -actin は増加した。これらの結果から、CLPP 画分における caveolin-1 と protein kinase C α は細胞骨格、特に微小管と密接に相互作用することが示唆された。

細胞質におけるコレステロールやリン脂質は部分的に再構成された微小管様フィラメントとともに回収され、これは apoA-I 刺激によりさらに上昇した。

これまでの研究で、CLPP 画分へ移行した protein kinase C α はセリンリン酸化され、活性化されていることを見出した。アストロサイトの細胞質におけるリン酸化反応を検討した結果、apoA-I で 5 分間刺激によりリン酸化反応は著しく増加した。特に、45 kDa, 36 kDa, 30 kDa, 20 kDa などのタンパク質がリン酸化された。また、細胞質における抗 caveolin-1 抗体で免疫沈降されたタンパク質のリン酸化反応は、apoA-I 刺激により 52 kDa, 45 kDa, 36 kDa タンパク質のリン酸化が促進された。これらのリン酸化反応は、protein kinase C 阻害剤である bisindolylmaleimide 1 により著しく抑制され

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。これまでの実験で、apoA-I 作用後 5 分で CLPP 画分に phospholipase C γ 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。CLPP 画分における DG 産生の上昇は、protein kinase C α のこの画分への移行を誘導し、protein kinase C α はセリンリン酸化され、活性化が促進された。今回の実験では、apoA-I 作用後のアストロサイトの CLPP 画分での diacylglyceride 産生とこれに続く protein kinase C α の移行と活性化のコレステロール細胞内輸送における細胞学的な意義を検討した。

今回の研究結果を要約すると以下となる。すなわち、1) apoA-I 刺激後 5 分で、CLPP 画分において、caveolin-1 と protein kinase C α , α -tubulin および β -actin との結合が増加した。2) apoA-I で 5 分間刺激されたアストロサイトの細胞質から再構成された微小管様フィラメントにおいて、apoA-I で刺激されない細胞から調製されたものに比べて、細胞質脂質および caveolin-1 や protein kinase C α の結合が上昇した。apoA-I 刺激後 5 分で、CLPP 画分において上昇する caveolin-1 と protein kinase C α との結合は、60 mM octylglycoside 処理によっても低下せず、また scaffolding peptide の添加により抑制されたことから、この結合は CLPP の diacylglyceride などの脂質を介したのではなく、直接的で caveolin-1 の scaffolding domain を介したものであることが示唆された。また、apoA-I で 5 分間刺激されたアストロサイ

トの細胞質より再構成された細胞骨格には細胞質脂質の結合が上昇したことから、apoA-I は細胞骨格と CLPP の結合を促進することが示唆された。ApoA-I 刺激で合成が促進されたコレステロールは細胞質へ移行した後、CLPP に取り込まれて、細胞骨格と結合して細胞膜まで輸送されることが考えられる。

E. 結論

apoAI は細胞骨格と caveolin-1 、 protein kinase C および CLPP の結合を促進した。コレステロール細胞内輸送が細胞骨格、特に微小管によって制御されていることが考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tada T, Ito J, Asai M, Yokoyama S. Fibroblast growth factor 1 is produced prior to apolipoprotein E in the astrocytes after cryoinjury of mouse brain *Neurochem. Int.*, (in press)

2. 学会発表

Ito J, Nagayasu Y, Yokoyama S.
The XIII th International Symposium on Atherosclerosis Satellite Symposium.
Apo A-I stimulates diacylglyceride production in intracellular lipoprotein fraction of astrocytes. 2004年10月3-4日 沖縄

伊藤仁一、横山信治

脳における HDL 機能とその病態生理
日本神経科学会大 26 回大会シンポジウム
2004年7月23-25日 名古屋

伊藤仁一、長安祐子、横山信治

Translocation of protein kinase C to cytosol in astrocytes by apolipoprotein A-I.
日本神経化学会第 46 回大会
2004年9月24-26日 新潟

伊藤仁一、長安祐子、横山信治
Apolipoprotein A-I induces protein kinase C translocation to cytosol in astrocytes.
日本生化学会第 76 回大会
2004年10月15-18日 横浜

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

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 愛媛大学・総合科学研究支援センター・生物機能解析分野 助教授

研究要旨

ApoE の脳内における機能及びアルツハイマー病発症における役割を解析する目的で、ApoE/VLDLR/ApoER2 を共に欠損する TKO マウスを作製した。このマウスでは DKO マウスと比較して、海馬の層構造形成異常の亢進、体温低下による著しい生存率の減少及び血中コレステロール濃度の上昇が観察された。また、脳発生過程における ApoE による reelin 結合の競合阻害は海馬領域の VLDLR のみに観察された。これらの結果は、脳内では VLDLR が ApoE の受容体として主要な役割を果たしていること、ApoE は神経細胞の分化発生や移動及び配置決定に関わるシグナルを伝えている可能性を示唆した。また、48 時間の絶食で ApoER2 及び LDLR KO マウスは、タウ蛋白の高度リン酸化に著しい抵抗性を示した。これらの結果は、脳内のコレステロール代謝とアルツハイマー病で見られるタウ蛋白高度リン酸化のメカニズムを解明する上で重要である。

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とアルツハイマー病との関連を明らかにする。

をそれぞれ欠損したマウスを 48 時間絶食させ、脳内のタウ蛋白リン酸化状態を解析した。

（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。

B. 研究方法

マウス ApoE 受容体 2 (ApoER2) 遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、ApoER2 欠損マウスを作製した。また、VLDLR/ApoER2 遺伝子を欠損したダブルノックアウト (DKO) マウス、更に ApoE/VLDLR/ApoER2 遺伝子を欠損するトリプルノックアウト (TKO) マウスを作製した。これら DKO 及び TKO マウスを組織学及び生化学レベルで比較解析することにより、脳神経系におけるリポタンパク受容体と ApoE の役割を解析した。さらに、ApoE、VLDLR、ApoER2 又は LDLR

C. 研究結果

TKO マウスでは DKO マウス (VLDLR/ApoER2) に比べ、明らかに海馬の層構造形成異常が更に亢進しており、ほぼ生後 4 週間以内に死亡する。これは TKO マウスにおける著しい体温低下が原因であることが示唆された。一方、DKO マウスでは約 20%が 3 ヶ月以上生存した。VLDLR(+/-)/ApoER2(-/-)では海馬 CA1 領域及び CA3 領域のリボン部分の錐体細胞層が 2 層に分離しているが、ApoE がさらに欠損する

ことで錐体細胞層が1層に回復した。一方、小脳や大脳皮質においては、ApoEの有無による違いは全く見いだせなかった。これら結果は、ApoEがCA1領域及びCA3領域においてVLDLRとreelinの結合を競合的に阻害していることを示した。また、LDLR/ApoER2を共に欠損したマウスの解析から、LDLRはVLDLRやApoER2に比べ弱いながらも大脳皮質と海馬に於いてreelin受容体としても機能しているが、ApoEに対する受容体としての機能は見いだせなかった。TKOマウスでは他の遺伝型を持つマウスと比較して、著しく高い血中コレステロール値を示したが、血中リポタンパクのHPLC解析から、このマウスに見られる高コレステロール血漿は脳形成の異常によるものではないことが示唆された。また、DKOマウス脳内ではタウ蛋白が高度にリン酸化を受けているが、TKOマウスでも同様な高度なリン酸化が検出された。これに伴ってSer9部位のリン酸化によるGSK-3 β inactivationの増加が観察された。これ以外のタウ蛋白・キナーゼであるMAPK、p35 CDK5 regulatory subunit、SAPK/JNK、またタウ蛋白・フォスファターゼのPP2Aには変化は認められなかった。

ApoE、VLDLR、ApoER2又はLDLRを欠損したマウスを48時間絶食させ、脳内タウ蛋白のリン酸化を解析した。ApoER2及びLDLR KOマウスでは野生型マウスと比較して、絶食に対するタウ蛋白のリン酸化に著しい抵抗性を示した。

D. 考察

脳内におけるコレステロールはアストロサイトからApoE・コレステロールとして分泌・輸送され、ApoEをリガンドとして認識・結合するリポタンパク受容体、LDLR、VLDLR、ApoER2

及びLRP1によって神経細胞に取り込まれる。この中でもVLDLR及びApoER2は神経細胞の移動及び配置決定を制御する分子、reelinの受容体としても機能していることが知られている。また、これらの受容体へのreelinの結合はin vitroではApoEによって競合的に阻害されることが示されている。しかし、我々のKOマウスを用いた解析からは、このApoEによるreelin結合の競合阻害は海馬領域のVLDLRのみに観察されたことから、脳内におけるApoE受容体としてはVLDLRが主要な役割を果たしていることを示唆した。実際に、アルツハイマー病・患者脳の老人斑ではApoEと共にVLDLRも検出されることが知られている。また、TKOマウスに見られる海馬の層構造形成異常の亢進、著しい体温低下による生存率の減少は、ApoEが神経細胞の分化発生や移動及び配置決定に関わるシグナルを伝えている可能性を示唆している。事実、近年ApoEがLRP1やVLDLRを介して、脂肪細胞へ分化シグナルを伝えている可能性を示す結果が報告されている。

一方、DKOマウス脳内で見られるタウ蛋白の高度にリン酸化が、TKOマウスでも同様に受けていることから、このタウ蛋白の高度リン酸化にはApoEは関与していないことを示唆した。

脳のタウ蛋白はグルコース飢餓やヒートショックなどのストレスによって一過性にリン酸化を受けることが知られている。今回発見した絶食によるタウ蛋白の高度リン酸化が大脳皮質や海馬においてApoER2及びLDLR依存的に起こる現象は、アルツハイマー病におけるタウ蛋白リン酸化メカニズムを解明する上で重要な発見で有ると思われる。