

200400316A

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

- 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————— 13
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————— 18
- 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————— 22
藤野 貴広

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表————— 26

- IV. 研究成果の刊行物・別刷————— 28

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

（道川）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を用いて、これらの培養細胞から産生されるapoE-HDL量にアイソフォーム特異性があることを明らかにした。本年度の研究からapoE3とapoE4の違いは、apoE4は、112番目がアルギニンであるために、N端側ドメインとC端側ドメイン（255グルタミン酸）間の相互作用を生み出しapoE構造をコンパクトにしていることに起因することが明らかになった。一方、コレステロール代謝障害をもつNiemann-Pick C1(NPC1) 病マウス脳の解析から、ミトコンドリア膜におけるコレステロール濃度の上昇がミトコンドリア機能障害を誘導し、それに起因するATP産生量の低下が神経細胞変性を起こしていることが明らかになった。アルツハイマー病においてもコレステロール代謝変動とミトコンドリア機能障害が指摘されており、同様のメカニズムの存在が考えられ、今後の研究の新たな展開が示された。（伊藤）外来性 apolipoproteinによるアストロサイトの cholesterol efflux および HDL 新生機構の研究を行なった。apoA-I で刺激されたアストロサイトでは、caveolin-1 が細胞膜から、コレステロールやリン脂質がER/Golgi から細胞質へ移行し、これらがcytosolic lipid-protein particle (CLPP) を形成し、細胞内コレステロール輸送担体として機能した。CLPP による細胞内コレステロール輸送はphospholipase C (PL-C)の活性化に依存した。また、apoA-I刺激によりCLPP と微小管、およびCLPP-related lipidと微小管との結合が上昇した。PL-C やPK-C 阻害剤はいずれもこれらの結合を阻害した。微小管と結合した CLPP-associated PK-C は 52 kDa tubulin を特異的にリン酸化し、CLPP と微小管の解離会合に重要な役割をもつことが示唆された。（藤野）マウス・リポタンパク受容体遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、ノックアウト (KO) マウスを作製した。これらのKO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ApoEをリガンドとして認識するリポタンパク受容体の役割を解析し、コレステロール代謝とアルツハイマー病との関連の解明を行った。

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

伊藤仁一：名古屋市立大学大学院医学研究科

助教授

藤野貴広：愛媛大学 総合科学研究支援セン

ター 助教授

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。最近の研究から、コレステロール代謝変動とアルツハイマー病発症機構との強い相関が指摘されているが、脳内コレステロール代謝の理解は不十分である。本研究班は、脳内コレステロールの意義とその脳内代謝を明らかにするために、コレステロール量変化に連動したタウリン酸化や神経細胞死の分子機構の解明、およびapoEによるコレステロール代謝恒常性維持の解明を道川が、脳内コレステロール代謝恒常性維持におけるアストロサイトの役割の検討を伊藤が、apoE受容体のシナプス形成能、タウのリン酸化制御に対する影響の検討を藤野が担当し、本研究で得られた知見から脳内コレステロールを制御することでアルツハイマー病の予防法の開発に道を開くことを目指した。

(II) 結果: (道川) (1) apoE2, apoE3およびapoE4による神経細胞からのコレステロール搬出(引き抜き)作用を解析し、その作用の強さは、apoE2>apoE3>apoE4であった。更にドメイン相互作用を持たない変異apoE4の作用を検討した結果、変異apoE4による神経細胞からのコレステロール搬出作用は、apoE3のそれと同レベルに回復した。このことから、apoE3とapoE4との作用の違いは、ドメイン相互作用の有無により説明可能と考えられた。(2)Niemann-Pick C1病のモデルマウスであるNPC1マウス脳解析から、NPC1病の神経細胞・アストロサイトにおいては、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP量の減少、ATP産生能の低下が明らかになった。このミトコンドリア機能低下は、ミトコンドリア膜におけるコレステロール代謝変動によって引き起こされることを証明した。(伊藤) アポリポ蛋白によって刺激されたラットアストロサイトでは、コントロール細胞に比べてtubulinのリン

酸化が亢進することを明らかにした。微小管脱重合条件下で調製された細胞質画分をラフト関連蛋白であるcaveolin-1の抗体で免疫沈降すると、protein kinase C α , α -tubulin, β -actinなどのタンパク質が共沈することが明らかになり、これらが複合体を形成している可能性が示された。また、アポリポ蛋白によるtubulinのリン酸化亢進による細胞質脂質蛋白粒子の移動制御が示唆された。(藤野) (1)ApoE受容体のトリプルノックアウト(TKO)マウスはダブルノックアウト(DKO)マウスと異なり、ほぼ生後4週間以内に死亡する。マウス直腸温の解析から、TKOマウスに見られる低生存率は著しい体温の低下によるものであることが明らかとなった。(2)海馬ニューロンの初代培養系を用い、リポタンパク受容体を欠損したニューロンにおける血清 β -VLDLの取り込みを解析したところ、VLDLR欠損ニューロンにおける β -VLDLの取り込みは、コントロールと比較して変化はなく、むしろLDLR欠損ニューロンで著しく減弱していた。(3) ヒトapoE2、E3又はE4のcDNAを組み込んだアデノウイルスを作製し、アストロサイト初代培養系及びグリオーマ細胞系においてapoEの大量発現系を確立した。本培養上清中のapoEは脳内のものと同様に一部がシアル酸による修飾を受けていた。また、肝臓で合成されるapoEとは異なり2つの分子種として分泌されることが明らかとなった。

B. 研究方法

(道川 誠)

(1) アストロサイト培養は、生後1日目のapoE^{-/-}, 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 [¹⁴C]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。

(2) ヒト apoE3, apoE4, 変異 apoE4、22 kDa apoE3断片、22 kDa apoE4断片のリコンビナント蛋白は、米国ペンシルバニア大学のフィリップ教授より供与を受けた。ラット神経細胞を準備し、DMEM/F12にN2サプリメントを含む無血清培地で培養した。神経細胞は、アイソトープラベルし、上記apoE蛋白を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）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。

(3) NPC1及び野生型マウス脳およびそれらから培養した神経細胞およびアストロサイトを解析に用いた。これら検体について電子顕微鏡解析、ミトコンドリア機能評価では膜電位依存的な発色をするdyeを用いた。またATPの定量、ATP合成酵素活性を定量した。さらにミトコンドリア膜における脂質解析およびミトコンドリアにおける脂質代謝のバルスチェイス解析を行った。

(伊藤仁一)

(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、ピペッティング後 6-well multitray 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) 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ラジオアイソトープ 標識した。細胞を洗浄して、5 ug/ml の apoA1 を一定時間作用させ、低張液 (0.02M Tris) 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 フラクションに分け、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分間インクベートした。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。

(藤野貴広)

マウスApoE受容体2 (ApoER2) 及びLDL受容

体関連タンパク5 (LRP5) 遺伝子をジーンターゲット法により破壊し、ApoER2及びLRP5欠損マウスを作製した。また、ApoE/LRP5遺伝子、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。これらのKO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。また、各受容体KOマウスより初代培養・海馬ニューロンを調製し、ウサギ抹消血より調製した β -VLDLの取り込みを蛍光法により観察した。

ヒトApoE2、E3、E4 cDNAをアデノウィルスベクターに組み込み、マウス・初代培養アストロサイト及びヒト・グリオーマ細胞に感染させる事により、ヒトApoEの大量発現系を確立した。この培養上清から一連のクロマトグラフィー操作により、各ApoEを均一にまで精製した。これら精製標品を用い、初代培養・海馬ニューロンに対する毒性及び取り込みなどを解析した。

一方、HDL結合能を指標にした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)

当研究班におけるすべての研究は、それぞれが所属する大学・研究所の動物実験倫理委員会の承認のもとに、それぞれの動物実験委員会の規則に則って行われた。

C. 研究結果

(道川 誠)

(1) 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。

(2) apoE2, apoE3およびapoE4びよる神経細胞からのコレステロール搬出(引き抜き)作用を解析したところ、その作用の強さは、apoE2>apoE3>apoE4であり、我々がすでに報告したとおりであった(Michikawa M et al, J Neurochem, 2000)。この実験系で変異apoE4の作用を検討した。その結果、変異apoE4による神経細胞からのコレステロール搬出作用は、apoE3のそれと同レベルに回復していた。このことから、apoE3とapoE4との作用の違いは、domain interactionの有無により説明可能と考えられた。(2)さらにintact apoEのようにC端側ドメインを持たないapoEの22kDa断片の作用についても検討した。その結果22kDa断片による神経細胞からのコレステロール搬出作用はapoE3>apoE4であった。また、apoEによるコレステロール搬出作用においてはintact apoE3と22kDa apoE3間で有意差は無かった。22kDa断片はC端側ドメインを持たないから、domain interactionは起こらない。従って、何がこのアイソフォーム特異性を生じているかは不明である。分子内構造変化でないとすればシステインによる分子間結合による構造変化の可能性はある。

(3) NPC1マウス脳の解析からは、NPC1病の神経細胞・アストロサイトにおいては、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP量の減少、ATP

産生能の低下が明らかになった。また、NPC1病脳のマイトコンドリアにおけるコレステロール濃度の上昇が認められたが、リン脂質濃度は野生型と変わりは無かった。マイトコンドリアを抽出し、マイトコンドリア膜のコレステロールを薬剤で減少させると、ATP合成能は回復したが、野生型にコレステロールを添加するとATP合成能は低下した。

(伊藤仁一)

(1) アストロサイトを apoA-I で刺激すると5分後に diacylglyceride (DG) の合成が CLPP 画分で特異的に上昇した。U73122 によって DG 産生は抑制され、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 刺激後の細胞内 PK-C α および PL-C γ の分布を調べてみると、刺激後5分以内に、ともに CLPP 画分に移行していることがわかった。

(2) アストロサイトの apoA-I による5分間刺激は、脱重合条件下で調製された細胞質における caveolin-1 と PK-C α 、 α -tubulin、 β -actin との結合を増加した。これらの結合は caveolin-1 の scaffolding domain peptide により抑制された。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微小管様フィラメントを再構成すると、caveolin-1 や PK-C α は再構成フィラメントからも回収された。これらの結果から、CLPP 画分における caveolin-1 と protein kinase C α は caveolin-1

の scaffolding domain を介して、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。

(3) アストロサイトの再構成微小管様フィラメントにおけるリン酸化反応を検討した結果、apoA-I での5分間刺激により再構成フィラメントと結合した種々のタンパク質のリン酸化反応が増加した。特に、52 kDa タンパク質のリン酸化が著しく促進された。これらのリン酸化反応は、PK-C 阻害剤である bisindolylmaleimide 1 (BIM) により著しく抑制された。anti- β -tubulin antibody を用いた western blotting により 52 kDa タンパク質が β -tubulin と同移動度を示した。さらに human tubulin-immobilized BioGel-10 を作成し、これと apoA-I で5分間刺激されたラットアストロサイトの細胞質とを反応させて再構成された BioGel-10 結合型再構成フィラメントにも 52 kDa タンパク質のリン酸化が認められた。また、外来性 human tubulin もリン酸化された。このことから 52 kDa タンパク質が tubulin であることがわかった。CLPP-related lipid と再構成フィラメントとの結合は、apoA-I で刺激されたアストロサイトでは促進され、また BIM 処理により抑制された。一方、予めリン酸化された細胞質タンパク質は、もはや anti-caveolin-1 antibody-bound Protein G-Sepharose には結合しなかった。

(4) BIM は apoA-I で誘導されるコレステロールの合成、細胞質へのコレステロール輸送および細胞外への搬出のすべての反応を抑制した。apoA-I 誘導性コレステロール搬出に関わる細胞内コレステロール輸送反応が PK-C の機能に依存したものであることが示唆された。

(藤野貴広)

LRP5KO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。ApoE/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。

TKO (ApoE/VLDLR/ApoER2) 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。一方、DKOマウスでは約20%が3ヶ月以上生存することを見いだした。これらマウスの直腸温の解析から、TKOマウスに見られる低生存率は著しい体温の低下によるものであることが明らかとなった。

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。これら結果は、ApoEがCA1領域及びCA3領域におい

てVLDLRとreelinに結合をApoEが競合的に阻害していることを示した。そこで、海馬ニューロンの初代培養系を用い、リポタンパク受容体を欠損したニューロンにおける血清 β -VLDLの取り込みを解析した。VLDLR欠損ニューロンにおける β -VLDLの取り込みは、コントロールと比較して変化はなく、むしろLDLR欠損ニューロンで著しく減弱していた。

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。

各KO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。

ヒト・ApoE2、E3又はE4のcDNAを組み込んだアデノウイルスを作製し、アストロサイト初代培養系及びグリオーマ細胞系においてApoEの大量発現系を確立した。本培養上清中のApoEは脳内のものと同様に一部がシアル酸による修飾を受けていた。また、興味深いことに、肝臓で合成されるApoEとは異なり2つの分子種として分泌されることが明らかとなった。この培養上清から各ApoEをヘパリン、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムにより精製した。

D. 考察
(道川 誠)

(I) ApoE3とapoE4の生物活性の違いは、両者の構上の違いで説明可能であるとする仮説がある（ドメイン相互作用仮説）。本年度は、この仮説によって、脂質搬出作用におけるapoEアイソフォーム特異性も説明可能かどうかを検証した。用いた変異apoE4はドメイン相互作用を持たない点ではapoE3と類似しているが、112番目のアミノ酸はアルギニンでありapoE4型である。通常のapoE4では、N端側ドメインにある112番目のアルギニンは61番目のアルギニンの位置に影響し、それがC端側ドメイン上にあるグルタミン酸(255)とsalt-bridgeを形成することでapoE分子をコンパクトにしている。ところが今回用いた変異apoE4では、グルタミン酸255がアラニンに置換されているために、この相互作用は起こらずに、N端側ドメインとC端側ドメイン間の角度が保たれていると考えられる。この結果から、apoE3とapoE4間におけるアイソフォームの違いは、ドメイン相互作用の有無によると考えられた。ただし、まだよくわからない点もある。それは22kDa apoE断片を用いてもapoE3、apoE4の違いが見られたことである。この22kDa apoE3断片による脂質搬出効果は、intact apoE3とほぼ同様の強さを持つのであるが、当然C端側ドメインを持たない。この場合の22kDa apoE4断片は、intact apoE4と同様に脂質搬出作用が弱い。このアイソフォームの違いはドメイン相互作用仮説では説明ができない。ApoE3とapoE4の22kDa断片は、分子内構造は大きな違いがないと考えられることから、apoE3の持つシステインによる分子間相互作用の有無による可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

(II) 野生型マウス脳のミトコンドリア膜を抽出し、それにおけるコレステロール濃度を増

加、あるいは減少させると、いずれもミトコンドリア機能が低下することから、コレステロール濃度には至適濃度が存在すると考えられ、ミトコンドリア機能はコレステロールによって調節されていると考えられた。NPC1病の場合は、ミトコンドリア膜コレステロール濃度が野生型に比べて高いために機能低下が起こっていると考えられた。ミトコンドリアへの輸送およびミトコンドリアからの搬出を司る分子機構については未だに良くわかっていないため、その責任分子の同定とその制御法の開発は今後に残された課題である。アルツハイマー病でもコレステロール代謝変動とミトコンドリア機能障害が指摘されており、NPC1病とは共通のカスケードを介して神経細胞変性（タウオパチー）を惹起している可能性があり、この発見によって提示された考え方は、今後のアルツハイマー病の神経変性過程の解析とその抑制法の開発に重要な視点を提供すると考えられる。

(伊藤仁一)

本実験で、apoA-I作用後5分でCLPP画分にPL-C α 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、PL-C α のCLPP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PL-C α 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PK-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CLPP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

回見い出されたCLPP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。CLPP画分におけるDG産生の上昇は、予想通りprotein kinase C γ のこの画分への移行を誘導し、セリン残基のリン酸化を促進した。apoA-I刺激後、アストロサイトのCLPP画分におけるDG産生をU73122で阻害すると、コレステロール低下や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、PK-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PK-C α 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。

今回の実験によりapoA-Iで刺激されたアストロサイト細胞質より再構成されたフィラメントでは、52 kDa tubulinのリン酸化が亢進され、BIMにより抑制された。このことから、apoA-I刺激によりCLPP上でのcaveolin-1とPKC α との結合が促進され、活性化されたPKCが微小管の主要構成タンパク質であるtubulinを特異的にリン酸化することが示唆された。今回の実験結果はtubulinリン酸化により微小管の脱重合を見かけ上、誘導しないことを示した。PKCによる微小管tubulinのリン酸化の意義は今のところ不明であるが、CLPPと微小管との解離会合に寄与することが考えられる。

(藤野貴広)

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可能性を示唆した。

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され、神経細胞に発現するリポタンパク受容体によって取り込まれると考えられている。一方、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、リーリンの受容体としても機能している。また、これらの受容体へのリーリンの結合は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によるリーリン結合の競合阻害は海馬領域のVLDLRのみに観察された。しかし、海馬ニューロンを用いた血清 β -VLDLの取り込み実験では、VLDLR欠損ニューロンではコントロールと比較して変化はなく、むしろLDLR欠損ニューロンで著しく減弱していた。すなわち、ニューロンにおけるVLDLR及びApoER2はApoE受容体としてほとんど機能していない事が示唆されてきた。一方、LDLRを欠損したニューロンではApoEを含むリポタンパク質の取り込み活性がほとんど見られなくなる事から、LDLRがニューロンに於ける主要なApoE受容体であると考えられた。

脳のタウ蛋白はグルコース飢餓やヒートシ

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。一方、DKO (VLDLR/ApoER2) 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。近年、マクロファージで合成・分泌されたApoEを含むリポ蛋白質は肝臓には取り込まれないことが示され、マクロファージの産生するApoEが肝臓のリポタンパク受容体に結合できない事が示された。すなわち、肝臓以外の細胞から産生されるApoEは異なった修飾を受けている可能性が考えられる。事実、アデノウイルスを用いたアストロサイト初代培養系によるApoE発現系では、産生されたApoEは脳内のものと同様に一部がシアル酸による修飾を受けていると共に、肝臓で合成されるApoEとは異なり2つの分子種として分泌されることが明らかとなった。これらの結果は、アストロサイトで産生されたApoE・コレステロール複合体のリポタンパク受容体に対する結合特異性が血清リポ蛋白のものとは異なる可能性を示唆した。

E. 結論

(道川 誠)

(1)ApoE3はapoE4に比べて、より多くの脂質搬出作用を持ち、HDL様粒子を新生する能力が高いが、その理由としてapoE4はN端側およびC端側ドメイン間の相互作用によって分子が小さくコンパクトな構造に変化しているた

めと考えられた。(2)ApoEの22 kDa断片 (N端側ドメイン) によってもintact apoEと同様な脂質搬出作用を持ち、そこにアイソフォーム特異性を認めたが、そのメカニズムは不明で今後の検討が必要である。

(3)ミトコンドリア膜におけるコレステロール代謝変動がミトコンドリア機能障害を引き起こし、それが神経細胞変性を引き起こしていることが明らかになった。このカスケードは、NPC1病とアルツハイマー病で共通している可能性があり、治療や予防法の開発に新たな視点を提供すると考えられる。

(伊藤仁一)

apoA-I 作用後のアストロサイトにおいて、cytosolic lipid-protein particle (CLPP) が apoA-I 依存性コレステロールの搬出とコレステロール細胞内輸送に大きく関わることを示した。apoAI は特異的にCLPP画分へのPL-C γ 移行とdiacylglyceride 産生を促進した。また、PK- C α もこの画分に移行し、セリンリン酸化された。また、apoAI は細胞骨格とcaveolin-1、protein kinase C およびCLPPの結合を高め、微小管tubulinのリン酸化を特異的に促進した。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。

(藤野貴広)

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いる。海馬ニューロンを用いた血清 β -VLDLの取り込み実験から、LDL受容体がニューロンに於ける主要なApoE受容体であると考えられた。一方、アストロサイト初代培養系によるApoE発現では、産生されたApoEはシアル酸による修飾を受けていると

共に、2つの分子種として分泌されることが明らかとなった。これらの結果は、アストロサイトから分泌されるApoE・コレステロール複合体は血清リポ蛋白のものとはリポタンパク受容体に対する結合特異性が異なる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

1. 学会発表

- (1) Yu W, Gong J-S, Ko M, Garver W. S, Yanagisawa K, and Michikawa M. Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick Type C1 mouse brain affects mitochondria function. *J Biol Chem*, in press.
- (2) Yu W, Zou K, Gong JS, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M. Oligomerization of amyloid β -protein occurs during the isolation of lipid rafts. *J. Neurosci. Res.*, in press.
- (3) Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lermere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci.*, 24:4894-4902, 2004.
- (4) Kamata T, Katsube K, Michikawa M, Yamada M, Takada S, Mizusawa H. R-spondin, a novel gene with thrombospondin type I domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1676(1): 51-62, 2004.
- (5) Sawamura N, Ko M, Yu W, Zou K, Hanada K, Suzuki T, Gong JS, Yanagisawa K, and Michikawa M. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, 279(12):11984-11991, 2004.
- (6) Michikawa M. Neurodegenerative disorders and cholesterol. Review. *Curr Alzheimer Res*, 4; 271-

276,2004.

- (15) Tada T, Ito J, Asai M. and Yokoyama S. Fibroblast growth factor 1 is produced prior to apolipoprotein E in the astrocytes after cryo-injury of mouse brain. *Neurochem. Int.*, 45, 23-30, 2004
- (16) Yamagata H, Chen Y, Akatsu H, Kamino K, Ito J, Yokoyama S, Yamagata T, Kosaka K, Miki T, Kondo I. Promoter polymorphism in fibroblast growth factor 1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 321, 320-323, 2004
- (17) Ito J, Nagayasu Y, Kheirollah A, Yokoyama S. Apolipoprotein A-I induces translocation of protein kinase C α to a cytosolic lipid-protein particle in astrocytes. *J. Lipid Res* 45: 2269-2276. 2004
- (18) Ito J, Nagayasu Y, Lu R, Kheirollah A, Hayashi M, Yokoyama S. Astrocytes produce and secrete FGF-1, which promotes the production of apoE-HDL in a manner of autocrine action. *J. Lipid Res.*, in press.
- (20) Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I and Yamamoto T.T. The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J. Atheroscler. Thromb.* 11: 200-208, 2004.
- (21) Yamamoto J, Ikeda Y, Iguchi H, Fujino T, Tanaka T, Asaba H, Ioka R. X., Iwasaki S, Kaneko I, Takahashi S, Sakaue H, Kodama T, Yanagisawa M, Yamamoto T.T., Ito S and Sakai J. A krüppel-like factor KLF 15 mediates fasting-Induced transcriptional activation of mitochondrial acetyl-CoA synthetase gene, AceCS2. *J. Biol. Chem.* 279: 16954-16962, 2004.
- (22) Iwasaki T, Takahashi S, Ishihara M, Takahashi M, Ikeda U, Shimada K, Fujino T, Yamamoto T.T., Hattori H and Emi M. The important role for beta-VLDLs binding at the fourth cysteine of first ligand-binding domain in the low-density lipoprotein receptor. *J. Hum. Genet.* 49: 622-628, 2004

総説

- (1) 道川 誠, コレステロールとスタチンの作用, *Medical Science Digest* 30(6): 206-211, 2004.
- (2) 道川 誠, アルツハイマー病、タウ蛋白とコレステロール, *The Lipid* 15(5): 62-67, 2004.
- (3) 道川 誠, 高脂血症と痴呆 スタチン療法, 臨床と研究 印刷中、2005年
- (4) 道川 誠, アルツハイマー病とアポリポ蛋白E 神経研究の進歩 印刷中、2005年
- 著書
- (1) 道川 誠
脳と栄養、小田裕昭・加藤久典・関泰一郎編集、「健康栄養学-健康科学としての栄養生理化学-」共立出版社、印刷中
- (2) 道川 誠, アルツハイマー病と栄養、小田裕昭・加藤久典・関泰一郎編集、「健康栄養学-健康科学としての栄養生理化学----」共立出版社、印刷中
2. 学会発表
- (1) Michikawa M Neurodegenerative disease and cholesterol. Asian-Pacific Society for neurochemistry. 2004年2月4-7日、香港、中国
- (2) 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
- (3) Makoto Michikawa ApoE-isoform-specific cholesterol transport in the central nervous system. 神経化学会大会、シンポジウム、2004年9月22日、大阪
- (4) きょう建生、森田真也、服部俊秀、高美姫、ウ 文新、ゾウクン、半田哲郎、柳澤勝彦、道川 誠、中枢神経系におけるアポリポ蛋白Eアイソフォーム特異的コレステロール輸送機構の検討、神経化学会大会、2004年9月22日、大阪
- (5) きょう建生、森田真也、服部俊秀、高美姫、ウ 文新、ゾウクン、半田哲郎、柳澤勝彦、道川 誠、中枢神経系におけるアポリポ蛋白Eアイソフォーム特異的コレステロール輸送機構の検討、日本痴呆学会、2004年9月29日、東京
- (6) Ito J, Nagayasu Y and Yokoyama S. FGF-1 production by astrocytes under long-term primary culture. The 15th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. 2004, (8/4 – 8/7) Edinburgh, Scotland
- (7) 伊藤仁一、長安祐子、奥村-野路久仁子、呂鋭、ケイロラ アリレザ、横山信治 アストロサイトの apoE とコレステロール分泌に及ぼす fibroblast growth factor-1 の作用 日本生化学会 77 回大会, 2004, (10/13 – 10/16) 横浜
- (8) Fujino T. Roles of LDL-receptor related protein 5 (LRP5) in glucose and lipoprotein metabolism. Korean Society of Endocrinology Symposium 2004年4月29-30日 ソウル、韓国
- (9) Fujino T. Roles of apoE and it' receptors in the central nervous system. "Neuro 2004" Joint meeting of the 27th annual meeting of the Japan Neuroscience Society and the 47th annual meeting of the Japanese Society for Neurochemistry. 2004年9月21-23日大阪
- (10) 藤野貴広、生体エネルギー恒常性の維持におけるアシルCoAシンテターゼの機能 日本農芸化学会2005年度大会シンポジウム、

2005年3月28-30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

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

(I)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を用いて、これらの培養細胞から産生される apoE-HDL 量にアイソフォーム特異性があることを明らかにした。ApoE3 と apoE4 の違いは、112 番目のアミノ酸がシステイン (apoE3)かアルギニン (apoE4)かの違いによる。ApoE4 は、112 番目がアルギニンであるために、N 端側ドメインと C 端側ドメイン (255 グルタミン酸) 間の相互作用を生み出し apoE 構造をコンパクトにしていると考えられる。この構造上の違いが脂質搬出作用の違いを生み出していることを検証するため、112 番目はアルギニンのまま (apoE4 タイプ) で 255 番目のグルタミン酸をアラニンに置換させ構造は apoE3 と同様の変異 apoE4 を用いて解析した。その結果、変異 apoE4 は apoE3 と同程度の脂質搬出作用を示した。また、N 端側ドメインのみの apoE3 及び apoE4 断片の脂質搬出作用を解析した。その作用は apoE3 > apoE4 であり、それぞれ intact apoE3, intact apoE4 とほぼ同様の作用を持つことが明らかになった。apoE3 および apoE4 断片には C 端側ドメインがないことから、このアイソフォームの違いはドメイン間相互作用では説明がつかない。このメカニズムの解明は今後の課題であるが、たとえば遺伝子導入による脳内脂質代謝能力の回復には apoE 断片をコードする遺伝子でも十分である可能性を示唆している。(II)一方、コレステロール代謝障害をもつ Niemann-Pick C1(NPC1) 病マウス脳の解析から、ミトコンドリア膜におけるコレステロール濃度の上昇がミトコンドリア機能障害を誘導し、それに起因する ATP 産生量の低下が神経細胞変性を起こしている可能性が明らかになった。ミトコンドリアを抽出し薬剤によってコレステロールを低下させると ATP 合成能が回復したこと、コレステロール添加によってミトコンドリアのコレステロール濃度を上昇させると ATP 合成能は低下することから、ミトコンドリア機能はコレステロールによって背調節されていること、が明らかになった。アルツハイマー病においてもコレステロール代謝変動とミトコンドリア機能障害が指摘されており、同様のメカニズムの存在が考えられ、今後の研究の新たな展開が示された。

A. 研究目的

痴呆老人の増加は我が国をはじめとして先進国の抱える深刻な問題である。なかでもアルツハイマー病は脳血管性痴呆と並んで痴呆性疾患患者数の大きな割合を占めるにも関わらずその原因は不明であることから、その病因解明は予防法、治療法の開発に重要であると考えられる。最近

apolipoprotein E (apoE)のアイソフォームの一つである apoE4 がアルツハイマー病の強力な危険因子であることが明らかとなったが、apoE のアルツハイマー病発症に関与する分子機構についての詳細は明らかではない。apoE4 が如何にアルツハイマー病発症機構に関わるかを明らかにするために、我々は apoE のコレステロール代謝調節作用に着

目し、(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Aβ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 Aβ 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(ii)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。

また、コレステロール代謝変動がどのようなメカニズムで神経細胞変性を誘導するかについては不明である。今回、コレステロール代謝変動に起因するタウオパチーを来たす NPC1 モデルマウス脳を解析して、そのメカニズムについて検討した。

B. 研究方法

ヒト apoE3, apoE4, 変異 apoE4, 22 kDa apoE3 断片, 22 kDa apoE4 断片のリコンビナント蛋白は、米国ペンシルバニア大学のフィリップ教授より供与を受けた。ラット神経細胞を準備し、DMEM/F12 に N2 サプリメントを含む無血清培地で培養した。神経細胞は、アイソトープラベルし、上記 apoE 蛋白を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)は、クロロフォルム:メタノール法により抽出し、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。

NPC1 及び野生型マウス脳およびそれらから培養した神経細胞およびアストロサイトを解析に用いた。これら検体について電子顕微鏡解析、ミトコンドリア機能評価では膜電位依存的な発色をする dye を用いた。また ATP の定量、ATP 合成酵素活性を定量した。さらにミトコンドリア膜における脂質解析およびミトコンドリアにおける脂質代謝のパルスチェイス解析を行った。

C. 研究結果

(1) apoE2, apoE3 および apoE4 による神経細胞からのコレステロール搬出(引き抜き)作用を解析したところ、その作用の強さは、apoE2>apoE3>apoE4 であり、我々がすでに報告したとおりであった(Michikawa M et al, *J Neurochem*, 2000)。この実験系で変異 apoE4 の作用を検討した。その結果、変異 apoE4 による神経細胞からのコレステロール搬出作用は、apoE3 のそれと同レベルに回復してい

た。このことから、apoE3 と apoE4 との作用の違いは、domain interaction の有無により説明可能と考えられた。(2)さらに intact apoE のように C 端側ドメインを持たない apoE の 22kDa 断片の作用についても検討した。その結果 22kDa 断片による神経細胞からのコレステロール搬出作用は apoE3>apoE4 であった。また、apoE によるコレステロール搬出作用においては intact apoE3 と 22kDa apoE3 間で有意差は無かった。22kDa 断片は C 端側ドメインを持たないから、domain interaction は起こらない。従って、何がこのアイソフォーム特異性を生じているかは不明である。分子内構造変化でないとすればシステインによる分子間結合による構造変化の可能性がある。

(3)NPC1 マウス脳の解析からは、NPC1 病の神経細胞・アストロサイトにおいては、ミトコンドリア膜電位の低下、ATP 量の減少、ATP 産生能の低下が明らかになった。また、NPC1 病脳のミトコンドリアにおけるコレステロール濃度の上昇が認められたが、リン脂質濃度は野生型と変わりは無かった。ミトコンドリアを抽出し、ミトコンドリア膜のコレステロールを薬剤で減少させると、ATP 合成能は回復したが、野生型にコレステロールを添加すると ATP 合成能は低下した。

D. 考察

(I) ApoE3 と apoE4 の生物活性の違いは、両者の構造上の違いで説明可能であるとする仮説がある(ドメイン相互作用仮説)。本年度は、この仮説によって、脂質搬出作用における apoE アイソフォーム特異性も説明可能かどうかを検証した。用いた変異 apoE4 はドメイン相互作用を持たない点では apoE3 と類似しているが、112 番目のアミノ酸はアルギニンであり apoE4 型である。通常の apoE4 では、N 端側ドメインにある 112 番目のアルギニンは 61 番目のアルギニンの位置に影響し、それが C 端側ドメイン上にあるグルタミン酸(255) と salt-bridge を形成することで apoE 分子をコンパ

クトにしている。ところが今回用いた変異 apoE4 では、グルタミン酸 255 がアラニンに置換されているために、この相互作用は起こらずに、N 端側ドメインと C 端側ドメイン間の角度が保たれていると考えられる。この結果から、apoE3 と apoE4 間におけるアイソフォームの違いは、ドメイン相互作用の有無によると考えられた。ただし、まだよくわからない点もある。それは 22kDa apoE 断片を用いても apoE3, apoE4 の違いが見られたことである。この 22kDa apoE3 断片による脂質搬出効果は、intact apoE3 とほぼ同様の強さを持つのであるが、当然 C 端側ドメインを持たない。この場合の 22kDa apoE4 断片は、intact apoE4 と同様に脂質搬出作用が弱い。このアイソフォームの違いはドメイン相互作用仮説では説明ができない。ApoE3 と apoE4 の 22kDa 断片は、分子内構造は大きな違いがないと考えられることから、apoE3 の持つシステインによる分子間相互作用の有無による可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

(II) 野生型マウス脳のミトコンドリア膜を抽出し、それにおけるコレステロール濃度を増加、あるいは減少させると、いずれもミトコンドリア機能が低下することから、コレステロール濃度には至適濃度が存在すると考えられ、ミトコンドリア機能はコレステロールによって調節されていると考えられた。NPC1 病の場合は、ミトコンドリア膜コレステロール濃度が野生型に比べて高いために機能低下が起こっていると考えられた。ミトコンドリアへの輸送およびミトコンドリアからの搬出を司る分子機構については未だに良くわかっていないため、その責任分子の同定とその制御法の開発は今後に残された課題である。アルツハイマー病でもコレステロール代謝変動とミトコンドリア機能障害が指摘されており、NPC1 病とは共通のカスケードを介して神経細胞変性(タウオパチー)を惹起している可能性があり、この発見によって提示された考え方は、今後のアルツハイマー病の神経変性過程の解析とその抑制法の開発に重

要な視点を提供すると考えられる。

E. 結論

(1) ApoE3 は apoE4 に比べて、より多くの脂質搬出作用を持ち、HDL 様粒子を新生する能力が高いが、その理由として apoE4 は N 端側および C 端側ドメイン間の相互作用によって分子が小さくコンパクトな構造に変化しているためと考えられた。

(2) ApoE の 22 kDa 断片 (N 端側ドメイン) によっても intact apoE と同様な脂質搬出作用を持ち、そこにアイソフォーム特異性を認めたが、そのメカニズムは不明で今後の検討が必要である。

(3) ミトコンドリア膜におけるコレステロール代謝変動がミトコンドリア機能障害を引き起こし、それが神経細胞変性を引き起こしていることが明らかになった。このカスケードは、NPC1 病とアルツハイマー病で共通している可能性があり、治療や予防法の開発に新たな視点を提供すると考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Yu W, Gong J-S, Ko M, Garver W. S., Yanagisawa K, and Michikawa M. Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick Type C1 mouse brain affects mitochondria function. *J Biol Chem*, *in press*.

(2) Yu W, Zou K, Gong JS, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M. Oligomerization of amyloid β -protein occurs during the isolation of lipid rafts. *J. Neurosci. Res.*, *in press*.

(3) Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, Hasegawa K, Yokoseki T, Shibata M, Yamamoto N, Michikawa M, Yoshikawa Y, Terao K, Matsuzaki K, Lermere CA, Selkoe DJ, Naiki H, Yanagisawa K. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J Neurosci.*, *24:4894-4902, 2004*.

(4) 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*.

(5) awamura N, Ko M, Yu W, Zou K, Hanada K, Suzuki T, Gong JS, Yanagisawa K, and Michikawa M. Modulation of amyloid precursor protein cleavage by cellular sphingolipids. *J. Biol. Chem.*, *279(12):11984-11991, 2004*.

(6) Michikawa M. Neurodegenerative disorders and cholesterol. **Review.** *Curr Alzheimer Res*, *4; 271-276, 2004*.

総説

(1) 道川 誠
コレステロールとスタチンの作用
Medical Science Digest 30(6): 206-211, 2004

(2) 道川 誠
アルツハイマー病、タウ蛋白とコレステロール、
The Lipid 15(5): 62-67, 2004

(3) 道川 誠
高脂血症と痴呆_スタチン療法
臨床と研究 印刷中、2005

(4) 道川 誠
アルツハイマー病とアポリポ蛋白 E
神経研究の進歩 印刷中、2005

著書

(1) 道川 誠
脳と栄養、小田裕昭・加藤久典・関泰一郎編集、
「健康栄養学-健康科学としての栄養生理化学-」
共立出版社、印刷中

(2) 道川 誠
アルツハイマー病と栄養、小田裕昭・加藤久典・関泰一郎編集、「健康栄養学-健康科学としての栄養生理化学-」共立出版社、印刷中

2. 学会発表

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

(2) 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

(3) Makoto Michikawa

ApoE-isoform-specific cholesterol transport in the central nervous system.

神経化学学会大会、シンポジウム、

2004年9月22日、大阪

(4) きょう建生、森田真也、服部俊秀、高 美姫、ウ 文新、ゾウクン、半田哲郎、柳澤勝彦、道川 誠、中枢神経系におけるアポリポ蛋白 E アイソフォーム特異的コレステロール輸送機構の検討、

神経化学学会大会、2004年9月22日、大阪

(5) きょう建生、森田真也、服部俊秀、高 美姫、ウ 文新、ゾウクン、半田哲郎、柳澤勝彦、道川 誠、中枢神経系におけるアポリポ蛋白 E アイソフォーム特異的コレステロール輸送機構の検討、

日本痴呆学会、2004年9月29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ipoprotein A-I (apoA-I) 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) を形成することを見出した。また、phospholipase C の活性化を伴うapoA-I 誘導性シグナル伝達によりCLPPが微小管と相互作用し、コレステロールの細胞内輸送に強く関与することが示唆された。今回の研究では、CLPP と微小管との相互作用におけるCLPP 結合性 protein kinase C の役割を検討したApoA-I で5分間刺激されたラットアストロサイトの細胞質画分から調製された reconstituted microtubule-like filaments (rMT) では、コントロール細胞から調製されたそれに比べ、52 kDa タンパク質のリン酸化が著しく亢進された。SDS-PAGE 上での 52 kDa タンパク質の移動度は α -tubulin のそれと同じで、さらに rMT は外来性 human tubulin もリン酸化することから、52 kDa タンパク質は tubulin であることがわかった。微小管脱重合条件下で調製された細胞質画分を anti-caveolin-1 antibody-bound Protein G-Sepharose で免疫沈降すると、caveolin-1 以外に protein kinase C α , α -tubulin, β -actin などのタンパク質も共沈し、apoA-I 刺激されたアストロサイト細胞質では、52 kDa tubulin のリン酸化が顕著に上昇し、リン酸化による CLPP 細胞内移動の制御が示唆された。

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あるにもかかわらず、血液脳関門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、脳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系組織には備わっていると考えられる。我々は中枢神経系組織のコレステロールホメオスタシスに重要な役割をもつと考えられるアストロサイトの HDL 新生機構を研究してきた。アストロサイトは apoE を産生・分泌し、

cholesterol-rich HDL を産生する。一方、外来性 apoA-I にも反応してphospholipid-rich HDL を新生する。これまでに我々は、apoA-I で5分間刺激されたアストロサイトでは、phospholipase C γ が cytosolic lipid-protein particle (CLPP) へと移行し、CLPP での diacylglyceride の産生と、protein kinase C α の CLPP への移行が促進されることを見出した。さらに、CLPP と微小管細胞骨格との結合が上昇することを微小管の再構成系を用いて明らかにした。一方、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、