

### III. APOLIPOPROTEIN E-ISOFORM-SPECIFIC MODULATION OF CHOLESTEROL IN CNS

How is apoE involved in this cascade? Our previous study showed that the amount of cholesterol released as HDL particles from apoE3-expressing astrocytes was ~2.5-fold greater than that from apoE4-expressing astrocytes with a similar number of molecules of each apoE, indicating that the ability of apoE to generate HDL particles is isoform-dependent [16]. In this context, it is possible that the apoE dependent promotion (apoE4) or prevention (apoE3) of AD pathologies can be explained by the isoform-dependent ability of apoE (apoE3>apoE4) to generate HDL-like particles, which can supply cholesterol to neurons [16, 30]. It was demonstrated that the level of oligomeric Aβ increases with age, which may affect brain cholesterol homeostasis, leading to tauopathy. The brain cholesterol homeostasis is maintained mainly by the HDL cholesterol supply from astrocytes, but the lower ability of apoE4 than apoE3 to generate HDL results in the decreased cholesterol supply to neurons, leading to the subsequent earlier disruption in cholesterol homeostasis in neurons. This may cause an earlier development of AD in those possessing apoE4.

In this context, it may also be possible that a decreased level of HDL in the CNS associated with a decreased level of serum HDL cholesterol is a risk factor for the development of AD. Statin treatment may contribute to the reduction in AD frequency by increasing serum HDL level [3,6] and subsequently, CSF HDL cholesterol level.

BLACK

Interestingly, recent studies showing that the cholesterol-lowering effect of statin depends on the presence of a functional apoE [8, 51], may support this notion with an implication of a role of HDL generation by apoE in the inhibitory effect of statin on AD development. Further studies are required to determine cholesterol metabolism in CSF and brains of humans or animals with or without statin treatment, and to clarify in more detail the relationship between cholesterol and AD pathogenesis. The different viewpoints presented here can provide new insights into the strategy for elucidating mechanisms underlying the association between cholesterol and AD. Another notion that integrates these two ideas is as follows. A high serum cholesterol level associated with high cellular cholesterol level enhances Aβ generation at a very early stage of AD. As aging and the AD process progress, the amount of released Aβ increases and Aβ aggregation occurs. The accumulation of Aβ aggregates (oligomers) affects cellular cholesterol metabolism by releasing cellular cholesterol to generate abnormal lipid particles [31] and reducing cholesterol level [17] (Fig. 1). Moreover, oxysterols, the synthesis of which increases with aging, strongly inhibits cholesterol synthesis. The altered cellular cholesterol metabolism in neurons, in turn lead to tauopathy [11, 23, 40, 41]. ApoE compensates cholesterol homeostasis; however, the lower ability of apoE4 to generate HDL particles may result in the earlier disruption of cellular cholesterol homeostasis than apoE3, leading to tauopathy in AD.

Putative Role of Cholesterol in Neurodegeneration

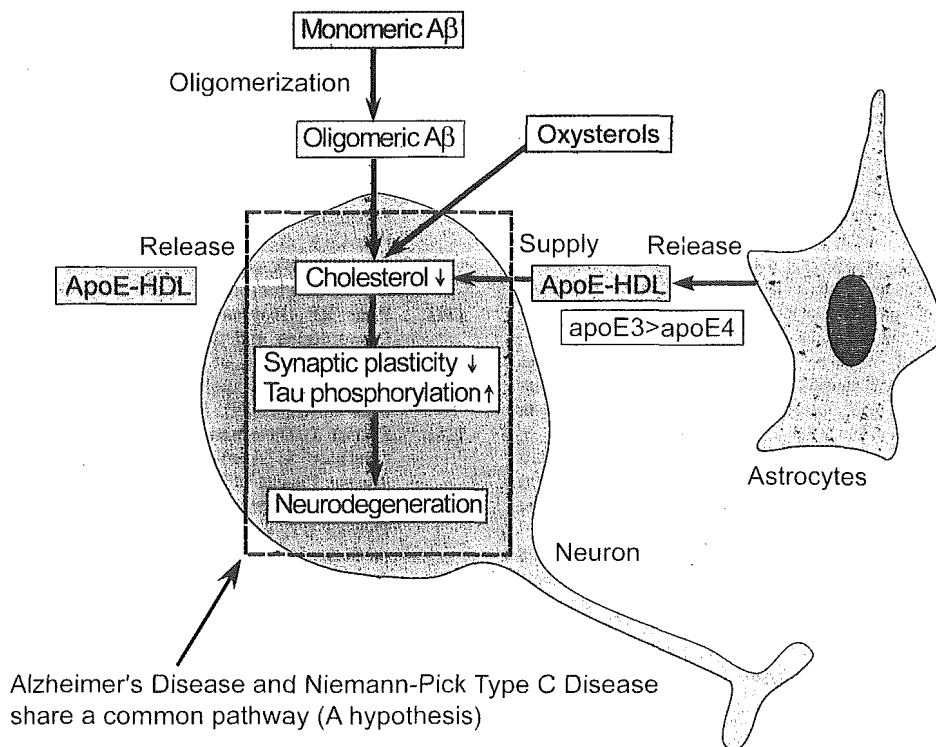


Fig. (1). A hypothetical schema showing a putative role of cholesterol in the amyloid cascade, a part of which may be shared by Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease.

## REFERENCES

- [1] Adair J. Cholesterol and neuropathologic markers of AD: a population-based autopsy study. *Neurology* 59(5): 788-9; author reply 789 (2002).
- [2] Auer IA, Schmidt ML, Lee VM, Curry B, Suzuki K, Shin RW, et al. Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 90(6): 547-51 (1995).
- [3] Bonn V, Cheung RC, Chen B, Taghibiglou C, Van Iderstine SC and Adeli K. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis* 163(1): 59-68 (2002).
- [4] Bouthillier D, Sing CF and Davignon J. Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method: application to the study of informative matings. *J Lipid Res* 24(8): 1060-9(1983).
- [5] Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M and De Backer G. Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis* 120(1-2): 67-73(1996).
- [6] Chong PH, Kezele R and Franklin C. High-density lipoprotein cholesterol and the role of statins. *Circ J* 66(11): 1037-44(2002).
- [7] Davignon J, Gregg RE and Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 8(1): 1-21(1988).
- [8] Eckert GP, Kirsch C and Muller WE. Differential effects of lovastatin treatment on brain cholesterol levels in normal and ApoE-deficient mice. *Neuroreport* 12(5): 883-887(2001).
- [9] Fagan AM, Younkin LH, Morris JC, Fryer JD, Cole TG, Younkin SG, et al. Differences in the A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 48(2): 201-210(2000).
- [10] Fan QW, Isobe I, Asou H, Yanagisawa K and Michikawa M. Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review. *J Am Aging Assoc* 24(1): 1-10(2001).
- [11] Fan QW, Wei Y, Senda T, Yanagisawa K and Michikawa M. Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 76: 391-400(2001).
- [12] Fan QW, Yu W, Gong JS, Zou K, Sawamura N, Senda T, et al. Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* 80(1): 178-190(2002).
- [13] Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, et al. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides A $\beta$ 24 and A $\beta$ 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(10): 5856-5861(2001).
- [14] Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, Ragoeschke A, Kuehl S, Walter S, et al. Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 59(8): 1257-8(2002).
- [15] Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B, Schnohr P and Tybjaerg-Hansen A. Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res* 41(11): 1812-22(2000).
- [16] Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, Zou K, Sawamura N, Fujita SC, et al. 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).
- [17] Gong JS, Sawamura N, Zou K, Sakai J, Yanagisawa K and 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).
- [18] Hoshino T, Kamino K and Matsumoto M. Gene dose effect of the APOE-epsilon4 allele on plasma HDL cholesterol level in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23(1): 41-5(2002).
- [19] Jurevics H, Hostettler J, Barrett C, Morell P and Toews AD. Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *J Lipid Res* 41(7): 1048-54(2000).
- [20] Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T, Laakso MP, Hallikainen M, Alhainen K, et al. Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 56(12): 1683-1989(2001).
- [21] Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W and Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(10): 5815-5820(2001).
- [22] Kolsch H, Lutjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptok U, Jessen F, et al. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 7(8): 899-902(2002).
- [23] Koudinov AR and Koudinova NV. Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J* 15(10): 1858-1860(2001).
- [24] Lehtinen S, Lehtimaki T, Sisto T, Salenius JP, Nikkila M, Jokela H, et al. Apolipoprotein E polymorphism, serum lipids, myocardial infarction and severity of angiographically verified coronary artery disease in men and women. *Atherosclerosis* 114(1): 83-91(1995).
- [25] Liu Y, Peterson DA and Schubert D. Amyloid  $\beta$  peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(22): 13266-13271(1998).
- [26] Love S, Bridges LR and Case CP. Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain* 118 (Pt. 1): 119-29(1995).
- [27] Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294(5545): 1354-1357 (2001).
- [28] Merched A, Xia Y, Visvikis S, Serot JM and Siest G. Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21(1): 27-30(2000).
- [29] Michikawa M. Cholesterol paradox: is high total or low HDL cholesterol level a risk for Alzheimer's disease? *J Neurosci Res* 72(2): 141-6(2003).
- [30] Michikawa M, Fan QW, Isobe I and Yanagisawa K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74(3): 1008-1016(2000).
- [31] Michikawa M, Gong JS, Fan QW, Sawamura N and Yanagisawa K. A novel action of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ): oligomeric A $\beta$  promotes lipid release. *J Neurosci* 21(18): 7226-7235(2001).
- [32] Michikawa M and Yanagisawa K. Inhibition of cholesterol production but not of nonsteroid isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem* 72: 2278-2285(1999).
- [33] Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17(1): 14-20(1998).
- [34] Okabe S, Kim HD, Miwa A, Kuriu T and Okado H. Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2(9): 804-11(1999).
- [35] Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, et al. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J Psychiatr Res* 36(1): 27-32(2002).
- [36] Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tzolaki M, Schmid S, Thal D, Nicosia F, et al. Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol* 60(1): 29-35(2003).
- [37] Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D and Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B(E/LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262(29): 14352-60(1987).
- [38] Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P and Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet* 342(8873): 697-699(1993).
- [39] Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, Ingano LA, Beregovska O, Hyman BT, et al. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase modulates the generation of the amyloid beta-peptide. *Nat Cell Biol* 3(10): 905-12(2001).
- [40] 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).
- [41] Sawamura N, Gong JS, Garver WS, Heidenreich RA, Ninomiya H, Ohno K, et al. Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* 276(13): 10314-10319(2001).

- [42] Schonknecht P, Lutjohann D, Pantel J, Bardenheuer H, Hartmann T, von Bergmann K et al. Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls. *Neurosci Lett* 324(1): 83-5(2002).
- [43] Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG and Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of  $\beta$ -amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(11): 6460-6464.(1998).
- [44] Sparks DL, Connor DJ, Browne PJ, Lopez JE and Sabbagh MN. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) in the treatment of Alzheimer's disease and why it would be ill-advised to use one that crosses the blood-brain barrier. *J Nutr Health Aging* 6(5): 324-31(2002).
- [45] Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to  $\beta$ amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(5): 1977-1981(1993).
- [46] Suzuki K, Parker CC, Pentchev PG, Katz D, Ghetti B, D'Agostino AN, et al. Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol (Berl.)* 89(3): 227-38(1995).
- [47] Tan ZS, Seshadri S, Beiser A, Wilson PW, Kiel DP, Tocco M, et al. Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch Intern Med* 163(9): 1053-7(2003).
- [48] Vega GL, Weiner MF, Lipton AM, Von Bergmann K, Lutjohann D, Moore C, et al. Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 60(4): 510-5(2003).
- [49] Wada S, Morishima-Kawashima M, Qi Y, Misono H, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, et al. Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry* 42(47): 13977-86(2003).
- [50] Wang PY, Liu P, Weng J, Sontag E and Anderson RG. A cholesterol-regulated PP2A/HePTP complex with dual specificity ERK1/2 phosphatase activity. *EMBO J* 22(11): 2658-67(2003).
- [51] Wang YX, Martin-McNulty B, Huw LY, da Cunha V, Post J, Hinchman J, et al. Anti-atherosclerotic effect of simvastatin depends on the presence of apolipoprotein E. *Atherosclerosis* 162(1): 23-31(2002).
- [52] Wollmer MA, Streffer JR, Lutjohann D, Tsolaki M, Iakovidou V, Hegi T, et al. ABCA1 modulates CSF cholesterol levels and influences the age at onset of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 24(3): 421-6(2003).

# コレステロールと スタチンの作用

Roles of cholesterol and statins

道川 誠

国立長寿医療センター アルツハイマー病研究部・発症機序研究室長



道川 誠 (みちかわ まこと)  
1985年東京医科歯科大学医学部卒業。  
1990年ブリティッシュコロンビア大学  
留学。1994年東京医科歯科大学医学部  
神経内科助手。1996年現職。  
研究テーマ:アルツハイマー病発症機  
構をapolipoprotein Eの作用、コレステロ  
ール代謝変動の観点から研究している。

⇒Key Words:

Cholesterol, Apolipoprotein E,  
Microdomain, Tau

## ■ Abstract ■

コレステロールを含む脂質代謝研究は主に、血管内皮細胞、線維芽細胞、肝細胞、各種細胞株など非神経系細胞を用いて行われてきた。こうした研究の歴史は長く、その知見の集積は膨大である。しかし、最もコレステロールに富む臓器である脳(中枢神経系)におけるコレステロール代謝についての知見は極めて少ない。中枢神経系は、血液脳関門によって体循環系から隔てられているために独立したコレステロール代謝系が存在するが、その詳細に関する研究が十分になされなかったのである。また神経細胞におけるコレステロール代謝の重要性は、その形態が他の細胞と全く異なる点でも特異的である。神経突起の膜の表面積は細胞体のその数十倍から数百倍に及ぶため、すべてのコレステロールを細胞体から末端まで運んでいたのでは早い変化(例えばシナプス可塑性の維持や外傷後の修復など)に対応できない。突起末端こそ、まさにシナプス可塑性を維持する場所であり、24時間以内に全シナプスの20%以上がturn overするほど激しく変化するとされるからである。従って、神経突起末端での膜の変化の維持には、細胞体からのコレステロール供給以外に、末端局所でのコレステロール代謝機構の果たす役割が大きいと考えられる。実際、細胞外液中のHDL-コレステロールがシナプス可塑性維持に重要な役割を果たすことが示されている<sup>1)</sup>。さらに、神経細胞体に取り込まれたHDL-コレステロールは軸索伸長に影響を与えないが、軸索遠位部で取り込まれたHDLに軸索伸長作用があることが示されている<sup>2)</sup>。これらの結果は、神経突起末端における細胞膜の形態・機能維持は、細胞体からのコレステロール輸送に依存せず、末端局所でのコレステロール代謝機構によって行われていることを示している。本稿では、このような神経系の特殊性をふまえた上で、現在なされている議論を整理し、アルツハイマー病発症機構とコレステロールの関係について新しい考え方を提示したい。

## ■ 1. コレステロール代謝とアルツハイマー病

### 血清コレステロール値とアルツハイマー病 及び apoE遺伝子多型

アルツハイマー病発症あるいはmild cognitive impairment (MCI)発症と発症前の高コレステロール血症との間に有意な相関が存在すること<sup>3,4)</sup>が報告されている。一方、血清コレステロール値とapoEの遺伝子多形との関係については、すでに動脈硬化との関連からなされた多くの研究があり、血清コレステロール値はapoE2<apoE3<apoE4の順に高くなることが示されている<sup>5,6)</sup>。こうした結果は、アルツハイマー病発症とapoE4型とが、血清コレステロール高値という点で結びつくことを示す。すなわち、apoE4型の人ではapoE2型やapoE3型に比べて血清コレステロール値が高く、それがアルツハイマー病発症促進に関わっていると考えることが可能かもしれない。

では、この考え方(血清コレステロール高値=(おそらく)中枢神経系細胞でのコレステロール高値=アルツハイマー病病理発現促進)ですべてが矛盾なく説明できるのだろうか? 実は、そう単純ではない。なぜなら、血清中の高コレステロー

■ Makoto Michikawa  
National Institute for Longevity Sciences

ル値あるいは高コレステロール血症は、髄液中のコレステロール濃度に影響しない<sup>8,9)</sup>とされるからである。つまり、「先行する高コレステロール血症がアルツハイマー病発症の危険因子である」という命題を支える分子メカニズムを、髄液（または脳内）コレステロール濃度変化からは説明できない可能性がでてくるのである。（もちろん、アルツハイマー病病理変化を脳内ではなく血管性の要因で説明できれば話は別であるが。）更に、最近の大規模な縦断疫学調査(Framingham study)によれば、発症前の高コレステロール血症とその後のアルツハイマー病発症とは相関がないことが示されている<sup>10)</sup>。これらの結果は、血清コレステロール値とアルツハイマー病発症との関連は、疫学研究レベルにおいてさえ、なお慎重に検討する必要があることを示唆している。

なお、血清コレステロール値とアルツハイマー病に関して筆者は、以下のような視点も考慮に値すると考えている。確かに、血清中の総コレステロール値（あるいはLDLコレステロール値）は、apoE4>apoE3>apoE2の順に高い<sup>6,7)</sup>が、血清HDLコレステロール値は、全く逆である（高い順にapoE2>apoE3>apoE4）<sup>6,7)</sup>。このHDLコレステロール値におけるapoEのアイソフォーム依存性は、筆者らが報告したapoEのコレステロールの逆転送（細胞からのコレステロール引抜きによるHDL新生）におけるapoEのアイソフォーム依存性で説明できるだろう<sup>11,12)</sup>。加えて、血清HDLのレベルは髄液コレステロールレベルと相関するとされる<sup>8)</sup>。髄液コレステロール値は、そのままHDLコレステロール値であることを考えれば、これは血清HDL値と髄液HDL値が正相関することを示す。すなわち高コレステロール血症＝低HDL血症＝低髄液HDL＝低髄液コレステロールを示唆している可能性がある（もちろん髄液の脂質解析によって検証する必要である）。

いずれにしても、コレステロール値とapoEのアイソフォーム依存性を論じる際には、着目すべきリポタンパクの種類（LDLかHDLか）によって全

く逆の順番になるのであり、理論上、「先行する高コレステロール血症がアルツハイマー病の危険因子である」とする仮説は、「低HDLコレステロール値がアルツハイマー病の危険因子である」に置き換え可能なのである。

この他にもコレステロールそのものの量ではなく、細胞内コレステロールエステル量がAPP代謝やAβ産生を調節し、エステル化を担うACATの阻害剤投与によってAβ産生を抑制するとする論文がある<sup>13)</sup>。この考え方によればACATの阻害剤投与によってfreeのコレステロールは当然増加するはずであり、単純に言えば他の研究結果と一見矛盾するようにも思われる。したがって、疫学研究においても、また分子生物学的・生化学的解析においても、今後の検討の余地を残しているといえるだろう。

さて、最近、apoE以外にもアルツハイマー病発症と関連するいくつかの遺伝子多型が報告されている。例えば、HDL新生に重要な役割を果たすABCA1をコードする遺伝子ABCA1の遺伝子多型<sup>14)</sup>、脳内コレステロールが排出される際には24S-hydroxycholesterolに代謝されるが、その代謝酵素をコードする遺伝子であるCYP46の遺伝子多型<sup>15)</sup>、ACATをコードする遺伝子ACATの遺伝子多型<sup>16)</sup>などとアルツハイマー病発症頻度、脳内Aβ沈着あるいは髄液のコレステロールレベルとの相関を検討した報告がある。これらの研究は、脳内コレステロール代謝変動とアルツハイマー病発症との関連を強く支持している点では共通している。今後の問題は、どのような脳内コレステロール代謝変動が如何にアルツハイマー病発症と関連するかについて断片的にはではなく、その全体像を明らかにすることにある。

## ■ 2. スタチンの疾患発症抑制効果

さて、最初の話に戻す。長期に先行する高コレステロール血症（あるいは低HDL血症）がアルツハイマー病あるいは軽度認知障害(MCI)の発症と正の相関があるならば、コレステロール降下剤であるスタチン（同時にHDL増加作用を持つ）服用は、

アルツハイマー病予防に効果があるかも知れないと考えるのは自然である。スタチン服用とアルツハイマー病との関連については、スタチンの服用者では、非服用者あるいは他の薬剤の服用者に比べてアルツハイマー病発症率の有意な低下が見られるという報告<sup>17)</sup>がある。高コレステロール血症が、なぜアルツハイマー病の危険因子であるかが不明である現在、スタチンによるアルツハイマー病発症抑制の機序についても不明であるのは当然である。

しかし、いくつかの研究によって細胞内コレステロール量を低下させるとAPP産生レベルには影響を与えずにAβ産生を下げ<sup>18)</sup>、またα-セクレターゼ活性を増強しsAPPα量を増加させること<sup>19)</sup>が報告されている。また、大量のスタチン服用で髄液中のAβ量が減少するとする報告<sup>20)</sup>もある。これらはいずれも疫学研究の結果を受けてその分子メカニズムを明らかにしているように見える。しかし、前者が「高い血清コレステロール値がアルツハイマー病発症頻度を上げる」ことを示しているのに対し、後者の研究は「細胞内の著しい低コレステロール状態は正常の細胞内コレステロール状態に比べてAβ産生を低下させる」ことを示しているわけであり、実際は両者の間に論理的整合性はない。

そもそも血液中のコレステロール代謝と脳内のそれとの間の相関関係さえ未確定であるため、論理の体さえ成していない、といったら言い過ぎであろうか。これらの研究は、新たにスタチンの作用機序としての議論を呼び起こした点では意義があると思われるが、実際の髄液移行濃度とその作用効果との観点からは今後の検討が必要になる。一般に、細胞内のfreeコレステロール量は厳密に制御され余剰分はエステル化されてしまうため、その量を増やすことは容易ではない。その点では、「高い血清コレステロール値がアルツハイマー病発症頻度を上げる」ことのメカニズムに対するアプローチとしては、「コレステロールエステル量との関連」を論じた研究<sup>13)</sup>の方が、道理に合っているといえるだろう。

ところで、lovastatin, simvastatin, pravastatinなど臨床で使われるスタチンは一般に血液脳関門を通過しにくいと考えられているが、スタチンがアルツハイマー病発症を抑制するとした場合、そのメカニズムは少なくとも以下の4つの可能性が考えられる。(i)血液脳関門を通過したスタチンが低濃度ながら脳神経系に直接働いてコレステロール合成を抑制し、Aβ産生を抑制する、(ii)血液脳関門を通過したスタチンが低濃度ながら脳神経系で働いて抗炎症作用等のコレステロール合成抑制以外の作用を発揮する、(iii)スタチンが血清コレステロールを低下させ、それが間接的に脳内または髄液中のコレステロール濃度を低下させ、Aβ産生を抑制する、(iv)スタチンの抗動脈硬化作用(抗炎症作用)によって血管性要素を改善し、それがアルツハイマー病発症の抑制に寄与する、等である。

これらの可能性についてはやはり今後の検討を待つ他はないが、示唆的な研究結果は散見される。例えば、スタチンのアルツハイマー病抑制効果に関しては、コレステロール値とAβ産生との関連で説明ができるのかという疑問が提起されている。確かに、simvastatinを服用したヒトでは、血清コレステロール値の低下に伴って脳内のコレステロール量の低下をきたすことが示されている<sup>21)</sup>。しかし、一方、スタチンの常用量では髄液コレステロール値を下げるもののAβ産生には影響しない<sup>22)</sup>とされ、スタチンのアルツハイマー病抑制効果とAβ産生との関連には否定的な見方もある。スタチンによって髄液中のAβ量の低下を招いたとする研究<sup>20)</sup>は、通常服用量の100倍も高いスタチン量を投与したためであり、疫学研究で見られた抑制効果がAβ量の低下によるものとは考えられないと考えることができる。

こうした混乱はvivoマウス実験でも見られる。すなわち、高コレステロール食により脳内Aβ沈着が亢進し、亢進の程度は血清および髄液コレステロール濃度に比例する<sup>23)</sup>という報告がある一方、高コレステロール食により脳内Aβ量が低下するとする報告<sup>24)</sup>もあり、現状ではこれら相反する事実

を巧く説明できていない。

スタチンの持つコレステロール合成抑制作用以外の作用による可能性も当然検討されなければならない。実際、スタチンは、細胞内シグナル伝達や細胞増殖に関与するG蛋白の修飾に必要な中間産物であるfarnesyl pyrophosphateやgeranylgeranyl pyrophosphateなどの産生を阻害する他、endothelial nitric oxide synthase(eNOS), inducible NOS(iNOS)やサイトカインなどの産生を抑制し、脳内炎症を抑制することが知られている<sup>24)</sup>。また、動脈硬化がアルツハイマー病および血管性痴呆両者の危険因子である<sup>25)</sup>とされることから、高コレステロール

血症は直接的には動脈硬化促進を介してアルツハイマー病の危険因子となっている可能性、そしてスタチンは炎症性疾患でもある動脈硬化を抑制すること<sup>26)</sup>でアルツハイマー病発症を抑制している可能性がある。

### ■ 3. コレステロールとアミロイドカスケード

筆者らは、アルツハイマー病とコレステロールの関連に関しては、独自の考え方およびそれを支える実験データを持っているので若干述べさせていただきます(図)。いままでのアルツハイマー病とコレステロールに関する議論の中で、メカニズムに

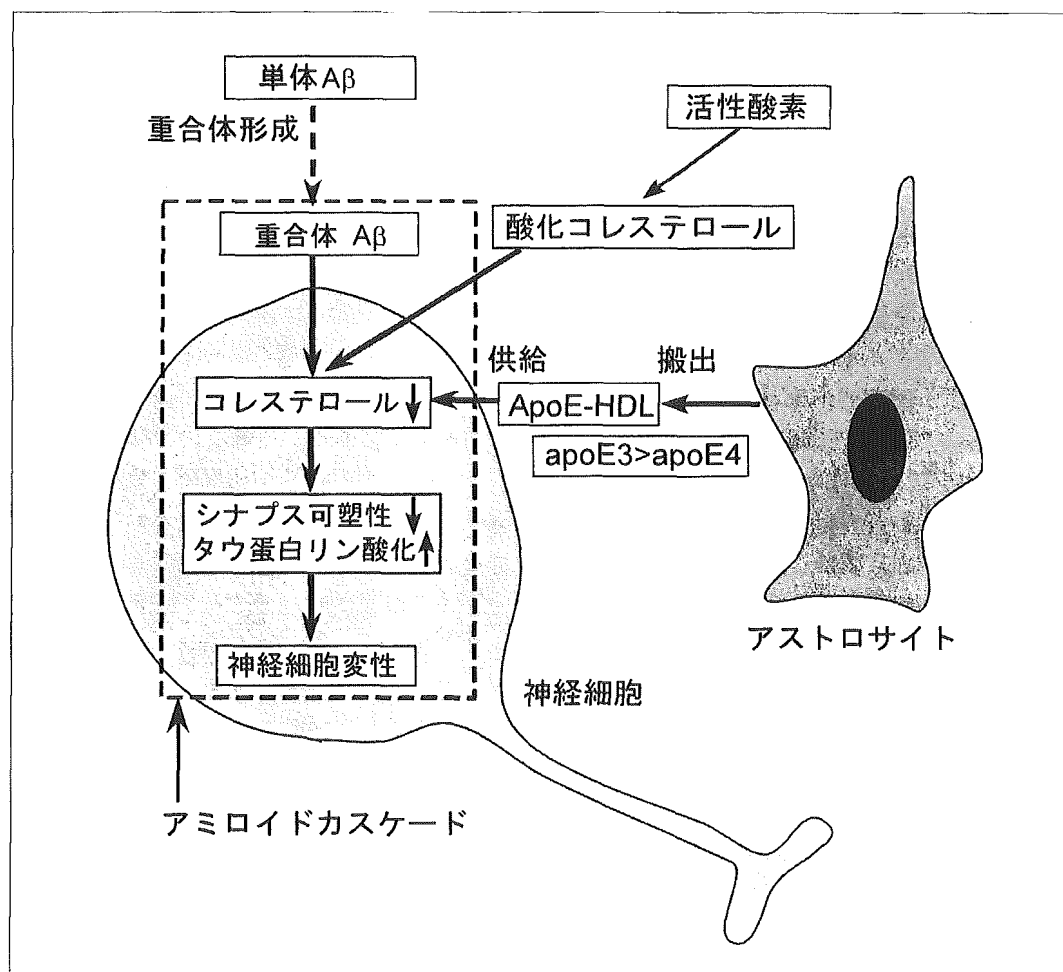


図 アミロイドカスケードに於けるコレステロールの役割 (仮説)

関しては細胞内コレステロールあるいはマイクロドメインのコレステロール量がAβの産生に影響を与えるという議論が主流であった。これに対して我々は、Aβ産生—重合体形成より下流の問題、すなわちアミロイドカスケードにおいてコレステロールが決定的な役割を果たすと考えている。筆者らは、Aβの神経細胞内コレステロール代謝に対する影響の解析を通して、HDL複合体形成過程を明らかにした。

すなわち、(i)オリゴマーAβが神経細胞膜よりコレステロール、リン脂質およびGM1ガングリオシド等を引き抜き（搬出し）HDL様粒子を形成するが、この脂質-Aβ複合体はapoEによって産生させるHDL様粒子と異なり、細胞に取り込まれないこと<sup>27)</sup>、(ii)オリゴマーAβは神経細胞内コレステロール合成を抑制し、最終的にその量を減少させる働きがあること<sup>28)</sup>である。こうした作用は単体Aβには見られず、単体Aβはむしろ抗活性酸素作用を発揮し細胞保護的に働いた<sup>29)</sup>。アルツハイマー病脳ではオリゴマーAβ量が増加すると考えられることから、アルツハイマー病では、増加したオリゴマーAβが神経細胞内コレステロール代謝を変動させている可能性が示唆される。また、筆者らをはじめとするいくつかのグループの研究結果を総合すると、神経細胞内コレステロール量の減少がτのリン酸化亢進<sup>30,31)</sup>、シナプス可塑性および機能の低下<sup>1,31,32)</sup>、そして神経細胞に特異的な細胞死の誘導<sup>33)</sup>等のアルツハイマー病病理に類似した諸現象を招くということが明らかになった。こうしたオリゴマーAβによって影響される細胞内コレステロール代謝の恒常性をapoEはHDLの取り込み及び搬出作用によって維持していると考えられる。

筆者らは、apoEのHDL形成作用がアイソフォーム依存的であり(apoE3>apoE4)<sup>11,12)</sup>、コレステロール供給能がapoE3>apoE4であることを明らかにした。(図参照)神経細胞のコレステロール代謝は、Aβオリゴマーや活性酸素によって増加する酸化コレステロール（酸化ステロールのいくつかは、強いコレステロール合成抑制作用がある）によって代謝

変動の圧力がかかると考えられるが、apoE3はコレステロール代謝の恒常性維持能力が高いために、アルツハイマー病発症の抑制に効果的であると考えられることができる。コレステロール欠乏とタウ蛋白のリン酸化亢進との関連については、更にコレステロール代謝異常を中核病態とするNiemann-Pick disease, type C(NPC)のモデルマウス脳で解析され、MAPK活性の上昇およびタウ蛋白のリン酸化亢進<sup>34)</sup>、cdk5の活性化亢進や他の細胞骨格蛋白のリン酸化亢進が確かめられている<sup>35)</sup>。

これらの機序として、NPC1欠損細胞では、マイクロドメインを含むdetergent-insoluble membrane fraction中のコレステロールの低下が、マイクロドメインの構造および機能の障害を招き、それが細胞内シグナルの異常を招くこと<sup>36)</sup>、さらにマイクロドメイン機能がAPP代謝にも重要であることを明らかにした<sup>37)</sup>。すでに述べたように、細胞内高コレステロール値は、Aβ産生を促進しアルツハイマー病の病的過程のスイッチを入れるのかもしれない。しかし、その過程が進み細胞外へ分泌されたAβが重合体を形成し凝集状態が進んだ状態になると、今度は逆に神経細胞のコレステロール代謝に悪影響を与え始めるのではないだろうか。すなわち、アミロイドカスケードとの関係から言えば、コレステロール量はむしろ低く過ぎないことが大事である<sup>28)</sup>と言えるかもしれない。もちろん、これらは*in vitro*または動物モデル上での知見であり、当然ながらただちにヒトに適用できる訳ではないが、少なくともアルツハイマー病発症後においては、スタチン服用には注意が必要かもしれない。

#### 文 献

- 1) Mauch D. H, Nagler K, Schumacher S, *et al.*: Science. 294: 1354-1357, 2001.
- 2) Hayashi H, Campenot R B, Vance D, *et al.*: J Biol Chem. 2004.
- 3) Jarvik G P, Wijsman E M, Kukull W A, *et al.*: Neurology. 45: 1092-1096, 1995.
- 4) Notkola I L, Sulkava R, Pekkanen J, *et al.*: Neuroepidemiology. 17: 14-20, 1998.
- 5) Kallio M J, Salmenpera L, Siimes M A, *et al.*: J Lipid Res. 38: 759-764, 1997.
- 6) Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M, *et al.*:



- Atherosclerosis. 120: 67-73, 1996.
- 7) Frikke-Schmidt R, Nordestgaard B G, Agerholm-Larsen B, *et al.*: *J Lipid Res.* 41: 1812-1822, 2000.
  - 8) Fagan A M, Younkin L H, Morris J C, *et al.*: *Ann Neurol.* 48: 201-210, 2000.
  - 9) Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, *et al.*: *Neurology.* 59: 1257-1258, 2002.
  - 10) Tan Z S, Seshadri S, Beiser A, *et al.*: *Arch Intern Med.* 163: 1053-1057, 2003.
  - 11) Michikawa M, Fan Q W, Isobe I, *et al.*: *J Neurochem.* 74: 1008-1016, 2000.
  - 12) Gong J S, Kobayashi M, Hayashi H, *et al.*: *J Biol Chem.* 277: 29919-29926, 2002.
  - 13) Puglielli L, Konopka G, Pack-Chung E, *et al.*: *Nat Cell Biol.* 3: 905-912, 2001.
  - 14) Wollmer M A, Streffer J R, Lutjohann D, *et al.*: *Neurobiol Aging.* 24: 421-426, 2003.
  - 15) Papassotiropoulos A, Streffer J R, Tsolaki M, *et al.*: *Arch Neurol.* 60: 29-35, 2003.
  - 16) Wollmer M A, Streffer J R, Tsolaki M, *et al.*: *Mol Psychiatry.* 8: 635-638, 2003.
  - 17) Wolozin B, Kellman W, Ruosseau P, *et al.*: *Arch Neurol.* 57: 1439-1443, 2000.
  - 18) Simons M, Keller P, De Strooper B, *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 6460-6464, 1998.
  - 19) Kojro E, Gimpl G, Lammich S, *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 5815-5820, 2001.
  - 20) Fassbender K, Simons M, Bergmann C, *et al.*: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 5856-5861, 2001.
  - 21) Locatelli S, Lutjohann D, Schmidt H H, *et al.*: *Arch Neurol.* 59: 213-216, 2002.
  - 22) Sparks D L, *Neurobiol Aging.* 17: 291-299, 1996.
  - 23) Howland D S, Trusko S P, Savage M J, *et al.*: *J Biol Chem.* 273: 16576-16582, 1998.
  - 24) Hess D C, Demchuk A M, Brass L M, *et al.*: *Neurology.* 54: 790-796, 2000.
  - 25) Hofman A, Ott A, Breteler M M, *et al.*: *Lancet.* 349: 151-154, 1997.
  - 26) Ross R, *N Engl J Med.* 340: 115-126, 1999.
  - 27) Michikawa M, Gong J S, Fan Q W, *et al.*: *J Neurosci.* 21: 7226-7235, 2001.
  - 28) Gong J S, Sawamura N, Zou K, *et al.*: *J Neurosci Res.* 69: 2002.
  - 29) Zou K, Gong J S, Yanagisawa K, *et al.*: *J Neurosci.* 22: 4833-4841, 2002.
  - 30) Fan Q W, Yu W, Senda T, *et al.*: *J Neurochem.* 76: 391-400, 2001.
  - 31) Koudinov A R, Koudinova N V, FASEB J. 15: 1858-1860, 2001.
  - 32) Fan Q W, Yu W, Gong J S, *et al.*: *J Neurochem.* 80: 178-190, 2002.
  - 33) Michikawa M, Yanagisawa K, *J Neurochem.* 72: 2278-2285, 1999.
  - 34) Sawamura N, Gong J S, Garver W S, *et al.*: *J Biol Chem.* 276: 10314-10319, 2001.
  - 35) Bu B, Li J, Davies P, *et al.*: *J Neurosci.* 22: 6515-6525, 2002.
  - 36) Sawamura N, Gong J S, Chang T Y, *et al.*: *J Neurochem.* 84: 1086-1096, 2003.
  - 37) Sawamura N, Ko M, Yu W, *et al.*: *J Biol Chem.* 2004.

第47回日本腎臓学会学術総会のお知らせ

日本腎臓学会では、下記の日程にて第47回学術総会を開催いたします。

会期：2004年5月27日（木）～29日（土）

会場：栃木県総合文化センター、宇都宮東武ホテルグランデ

大会長：浅野 泰（自治医科大学 腎臓内科）

お問い合わせ先：〒329-0498 栃木県河内郡南河内町薬師寺3311-1 自治医科大学 腎臓内科

事務局長 武藤 重明

TEL 0285(58)7346/FAX 0285(44)4869

主なプログラム：招請講演 Growing new organs in situ/Mechanisms of immune deposit formation and the mediation of immune injury

特別講演 「日本の挑戦：21世紀の課題」黒川 清（東海大学総合医学研究所）

「塩分摂取行動制御の脳内機構」野田昌晴（岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所感覚情報処理研究部門）

シンポジウム 糸球体腎炎の発症進展機序と治療戦略/尿路結石治療：内科医と泌尿器科医の役割は？/臓器再生のメカニズム/アルドステロンと臓器障害

ワークショップ 腎硬化の指標と治療戦略/腎不全保存期から腎移植までー慢性腎不全の生涯治療（ゆりかごから墓場まで）ー/腎臓病学と地域医療/腎生検診断における組織像の見方、考え方(日本語CME)

English session Clinical science workshop/Basic science workshop Membrane transporters and regulation in the kidney/Lecture in renal physiology Physiological significance of the nephron heterogeneity/Lecture in molecular physiology and medicine Ion channels and the genetic basis of hypertensive disease

教育講演 心腎相関/薬剤性尿管・間質障害/医学統計学の考え方と活用/糸球体腎炎の最新の治療/糖尿病性腎症の成因に基づいた最新の治療/臨床現場におけるEBMの実践と教育/植物の水電解質輸送(仮題)

# *The Lipid*

---

別刷

**(株)メディカルレビュー社**

〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11  
イトーピア湯島ビル TEL (03)3835-3041

# アルツハイマー病，タウ蛋白とコレステロール

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  
道川 誠

## [Summary]

コレステロール代謝変動とアルツハイマー病発症との関連が注目されているにもかかわらず，これらの議論が必ずしも中枢神経系のコレステロール代謝とアルツハイマー病病理との関連でなされていない．血液と中枢神経系は脳関門によって隔絶されており，それぞれ独自の代謝系の存在が想定される．両者におけるコレステロール代謝の相互の関連性も未確定である．しかし，ほとんどの疫学研究は血清総コレステロール値の議論に終始しており，分子・細胞レベルでの研究もこれらを論拠にした研究が多い．本稿では，コレステロールとアルツハイマー病研究の問題点を整理し，タウのリン酸化など amyloid cascade におけるコレステロールの役割に焦点を当てながら解説する．

## Key Words :

コレステロール、アルツハイマー病、タウ、  
神経原線維変化、ノーマンピック病、  
マイクロドメイン、アポリポ蛋白 E

## はじめに

近年の臨床疫学研究の結果から，アルツハイマー病発症機構とコレステロールの代謝の関心に関心が寄せられているが，最もコレステロールに富む臓器である脳(中枢神経系)におけるコレステロール代謝についての知見はきわめて少ない．中枢神経系は，血液脳関門により体循環系とは隔絶されているために，独自のコレステロール代謝系の存在が想定される．たとえば，血液中には LDL, VLDL, IDL, HDL, カイロミクロンなどのリポ蛋白が存在するが，中枢神経系(脳脊髄液中)には HDL のみが存在する．したがって，体循環系におけるコレステロール代謝の知見を，そのまま中枢神経系に用いることは原則としてできない．しかし，言うまでもなくアルツハイマー病は中枢神経系における病理現象である．故にアルツハイマー病発症機構とコレステロールの関係を検討するためには，神経系独自の脂質代謝系を明らかにし，さらに「コレステロール」と「アルツハイマー病理」発現との関連を議論する必要がある．信じられないことだが，このきわめて単純で明瞭なことが十分に行われないうまま，「コレステロールとアルツハイマー病」研究が推し進められてきたところに，現在の「コレステロールとアルツハイマー病」研究の混乱があるといつてよい．

さらに中枢神経系でのコレステロール研究を困難にしているのは、おそらく神経細胞の形態および機能が他の細胞と大きく異なる点にあるだろう。たとえば、神経細胞は、莫大な膜面積を有する神経突起を有する。神経突起の膜の表面積は細胞体のその数十倍から数百倍に及ぶこと<sup>2)</sup>が知られており、すべてのコレステロールを細胞体から末端まで運んでいたのでは、たとえばシナプス可塑性の維持や外傷後の修復などに十分に対応できない。実際、シナプス可塑性が起こっている突起末端では、24時間以内に全シナプスの20%以上がturn overするほど激しく変化するとされる。おそらく、神経突起末端での膜の変化の維持には、細胞体からのコレステロール供給(輸送)以外に、末端局所でのコレステロール代謝機構の果たす役割が大きいと考えられる。そもそも非神経細胞に“末端”はありえないから、こうした意味でも神経細胞におけるコレステロールの意義は特異的である。神経突起末端での膜の変化の維持に、末端局所でのコレステロール代謝機構の果たす役割が大きいことを示す研究として、細胞外液中のHDLコレステロールがシナプス可塑性維持に重要な役割を果たすことが示された<sup>15)</sup>。本稿では、このような神経系の特殊性を踏まえたうえで、現在なされている議論の盲点を明らかにし、アルツハイマー病発症機構とコレステロール研究の論点を整理し、タウ蛋白のリン酸化を含む神経細胞変性とコレステロールとの関連について、より具体的な議論を展開したい。

## コレステロール代謝とアルツハイマー病

### 1. 血清コレステロール値とアルツハイマー病および apoE 遺伝子多型

アルツハイマー病発症と発症前の高コレステロール血症との間に、有意な相関が存在すること<sup>18)</sup>が報告されている。先行する高コレステロール血症の存在は、アルツハイマー病のみならず、mild cognitive impairment

(MCI)発症との間にも有意な相関があることが報告された<sup>12)</sup>。血清コレステロール値とアポリポ蛋白E (apoE)の遺伝子多形との関係については、すでに多くの論文があり、血清コレステロール値は apoE 2 < apoE 3 < apoE 4 の順に高くなることが示されている<sup>1,8,12)</sup>。以上の結果は、apoE 4型がアルツハイマー病の危険因子であることが、血清コレステロール値の高値という点で結びつけられることを示している。すなわち、apoE 4は apoE 2や apoE 3に比べて、血清コレステロール値を上昇させることで、アルツハイマー病発症促進にかかわっているとの考え方が妥当であるようにみえる。

では、血清コレステロール高値は、如何に中枢神経系のコレステロール値と相関するのであろうか？ 実は、複数の研究により、高コレステロール血症は、髄液中のコレステロール濃度に影響しないとされている<sup>3,7,10)</sup>。これらの結果が事実ならば、「先行する高コレステロール血症」は、髄液(または脳内)コレステロール代謝には関係ないメカニズム(たとえば血管性の要素などを介して)で、アルツハイマー病を引き起こしている可能性がある。これに対して別の解釈がありうる。すなわち、血清HDLコレステロール値に着目すると、その値は高い順に apoE 2 > apoE 3 > apoE 4 になるのである<sup>1,8)</sup>。このHDLコレステロール値における apoE のアイソフォーム依存性は、筆者らが報告したように apoE のコレステロール逆転送作用(HDL新生作用)における apoE のアイソフォーム依存性で説明できるだろう<sup>9,16)</sup>。アルツハイマー病患者血清では、LDLコレステロールは高値だが、HDLコレステロールは低値である<sup>13)</sup>、あるいは髄液中のHDLコレステロール値はアルツハイマー病患者で低値である<sup>3,17)</sup>とする研究が上記考え方を支持している。いずれにしても、コレステロール値と apoE のアイソフォーム依存性を論じる場合には、着目すべきリポ蛋白の種類(LDLかHDLか)によって異なる結果となるわけである。以上から、「先行する高コレステロール血症がアルツハイマー病の危険因子である」とする仮説は、

「血清の低 HDL コレステロール値 = 髄液の低 HDL コレステロールがアルツハイマー病の危険因子である」とする考え方に理論上置き換えが可能かもしれない。

さて、血清コレステロール高値がアルツハイマー病の危険因子であることそのものを否定するデータがいくつか発表されていることも付け加えておきたい。たとえば、Reitz らは、高コレステロール血症はむしろアルツハイマー病発症を抑制し<sup>11, 19, 23)</sup>、スタチン服用でアルツハイマー病発症頻度を下げることにはできないとしている<sup>19)</sup>。このような乖離がなぜ起こるのかは、今後の検討に待つほかないが、筆者は中枢神経系の疾患であるアルツハイマー病を血清コレステロール値で議論すること自体に、そもそも限界があるためではないかと考えている。

## 2. 中枢神経系でのコレステロール代謝

では、なぜ HDL コレステロールに着目するのか。それは、中枢神経系(髄液中)には、HDL コレステロールしか存在しない<sup>5)</sup>からである。中枢神経系と体循環系は血液脳関門によって隔絶されており、中枢神経系(髄液中)には HDL のみが存在し、LDL, VLDL などのリポ蛋白質とそれらに関連する多くのアポリポ蛋白質は存在しない。故に、中枢神経系のコレステロール代謝の議論は、HDL 代謝の議論となる。血液中ではアポリポ蛋白 AI (apoAI) が HDL 形成に主要な役割を果たすため、末梢細胞が apoAI-HDL を取り込み、LDL のようにコレステロール供給源として利用することはなく、いくつかのステップを介して肝細胞へと逆転送される(もし途中で取り込まれれば、いわゆる動脈硬化に対する“善玉コレステロール”としての HDL の役割は意味を失う)。しかし、中枢神経系に存在する apoE-HDL の場合は話が違う。筆者らも確認したように、神経細胞、アストロサイト、ミクログリアおよびオリゴデンドログリアには、いずれも複数の apoE 受容体が存在し、それら受容体を通して apoE-HDL は取り込まれ再利用されるため、apoE-HDL 複合体は体循環系の LDL のように、脂質供

給作用をもつからである。

中枢神経系内の HDL 新生は、apoE による脂質搬出機構に大きく依存する。筆者らは、アストロサイトにおける apoE による HDL 新生能は、apoE 2>apoE 3>apoE 4 であることを見出し<sup>9, 16)</sup>、apoE 3 は apoE 4 に比し、HDL 新生能すなわちコレステロール供給能に優れることを明らかにした。これらのメカニズムによって、アルツハイマー病患者の髄液コレステロール値は対照群に比し低い現象<sup>3, 17)</sup>を説明できるかもしれない。以上から、血清や髄液の高コレステロール値からアルツハイマー病発症のリスクを説明することのみが強調されることには、慎重でなければならないと筆者は考える。しかし、現在までの血清コレステロール値とアルツハイマー病発症に関する多くの研究結果の解釈に、この点を考慮する議論は欠落している。今後、髄液中の脂質解析が apoE アイソフォームとの関連でなされる必要があると思われる。

## コレステロールとタウ病変

今までの研究を整理すると、コレステロールとアルツハイマー病病理を考える論点は以下の 2 点に要約される。すなわち、①コレステロール代謝変動と amyloid  $\beta$  蛋白(A $\beta$ )産生・凝集との関連および、②コレステロール代謝変動とタウ蛋白のリン酸化・神経原線維変化およびシナプス・細胞死との関連である。①については、すでに述べたように、その根拠となる疫学研究結果そのものが揺らんでいる状況であり、本稿では割愛する。したがって、主に②に関する議論をする。②に関する議論をするといっても、実はコレステロールとタウの問題に直接切り込んだ論文は少ない。多くの場合は、「細胞内コレステロール量の上昇—A $\beta$ 産生の上昇—amyloid cascade の促進—タウ蛋白のリン酸化亢進」の図式として理解することを求めている。これは結局①の立場である。

また、この図式を念頭におきながら、実際に証明しているのは「細胞内コレステロール値を減少させるとA $\beta$ の産生が減少する」ことである。これは議論のすり替えであり、疫学研究の結果を証明しているのではない。いずれにしても、これらは①に属する議論であるので省くことにする。したがって、コレステロールとタウ蛋白の問題を直接論じた研究は、筆者の知る限り、ほぼ以下のようになる。

### 1. Niemann-Pick 病 C 型からのアプローチ

コレステロール代謝異常とタウのリン酸化亢進・神経原線維変化(NFT)形成の直接の関係を論じるに最適なモデル動物として、Niemann-Pick 病 C 1 型(NPC 1)のモデルマウスがある。このマウスでは、NPC 1 の発現欠損によってコレステロールの細胞内輸送障害が生じ、その結果、外から取り込んだコレステロールが late endosome/lysosome に蓄積する。また、コレステロール合成の持続的亢進、コレステロールエステル合成の低下を伴うことから、細胞内に多量のコレステロールが蓄積するにもかかわらず、実質的なコレステロール欠乏が起きている可能性がある。この疾患がアルツハイマー病病理を研究するうえで興味深いのは、NPC 1 脳では老人斑の沈着なしに、アルツハイマー病に類似した PHF タウ形成を認めること<sup>24)</sup>である。このことは、NPC 1 マウスが、コレステロール代謝変動とタウのリン酸化の関連を直接検討するに適した重要な系であることを示している。

筆者らの研究室では、NPC 1 のモデルマウス脳および NPC 1 欠損細胞の解析を行い、細胞膜マイクロドメインのコレステロールの低下によって、MAP kinase (ERK 1/2) の活性化を誘導し、その結果、タウ蛋白質の (Ser-396 および 404 に選択的な) リン酸化亢進が誘導されている可能性を指摘した<sup>21, 22)</sup>。この研究では、電顕および filipin 染色による解析も行い、NPC モデルマウス脳や NPC 1 欠損細胞では、細胞種を問わずコレステ

ロールが蓄積すること、必ずしも蓄積それ自体が細胞毒性を発揮するわけではないことを確認し、また NPC 1 欠損細胞では、細胞膜コレステロール量が減少していることを確認した。細胞膜コレステロール減少は、ERK 1/2 などシグナル伝達の受け渡しの場合として重要な役割を果たしているマイクロドメインの構造と機能を変化させる可能性を考えていたが、最近、細胞膜コレステロール減少が ERK 1/2 の活性化を誘導するメカニズムとして、ERK 1/2 の脱リン酸化を調整する PP 2 A/ HePTP フォスファターゼ複合体形成(活性)が、細胞膜コレステロール量依存的に制御されるためであるとする論文<sup>25)</sup>が出され、フォスファターゼ活性の変動から説明できる可能性を提示した。筆者らは、すでにコレステロールの欠乏がタウのリン酸化亢進を誘導するか否かを、ラット大脳皮質から初代培養した神経細胞を用いて検討し、マイクロドメインのコレステロール低下以外に、PP 2 A の関与を支持する結果を得ている<sup>21)</sup>。

なお、最近 NPC 1 欠損の細胞株の解析から、A $\beta$  の細胞内 (late endosome) 蓄積がみられるとする報告がなされ注目されている<sup>26)</sup>。筆者は、この細胞内 A $\beta$  量の増加は、NPC 1 欠損による細胞内輸送の障害に起因する二次的な現象である可能性を考えている。しかし、A $\beta$  産生が NPC 1 欠損によるコレステロール代謝変動に連動しているかもしれない。仮に、NPC におけるタウ蛋白異常が、細胞内 A $\beta$  蓄積増加に起因しているとするれば、NPC 1 の病態理解に新しい局面を開くのみならず、アルツハイマー病を理解するうえでも重要な示唆を与えると考えられ、今後の研究の進展が期待される。

最近、NPC 患者脳における NFT 形成の程度を、apoE のアイソフォーム (特に apoE 4) および老人斑沈着との関連で検討した論文<sup>20)</sup>が発表され注目されている。この論文の面白さは、NPC、NFT、apoE 4、A $\beta$  沈着をコレステロールをキーワードとして結びつけられる可能性を提示したことにある。もちろん、各要素間の因果関係の検証は今後の課題である。この論文の要点は、①程

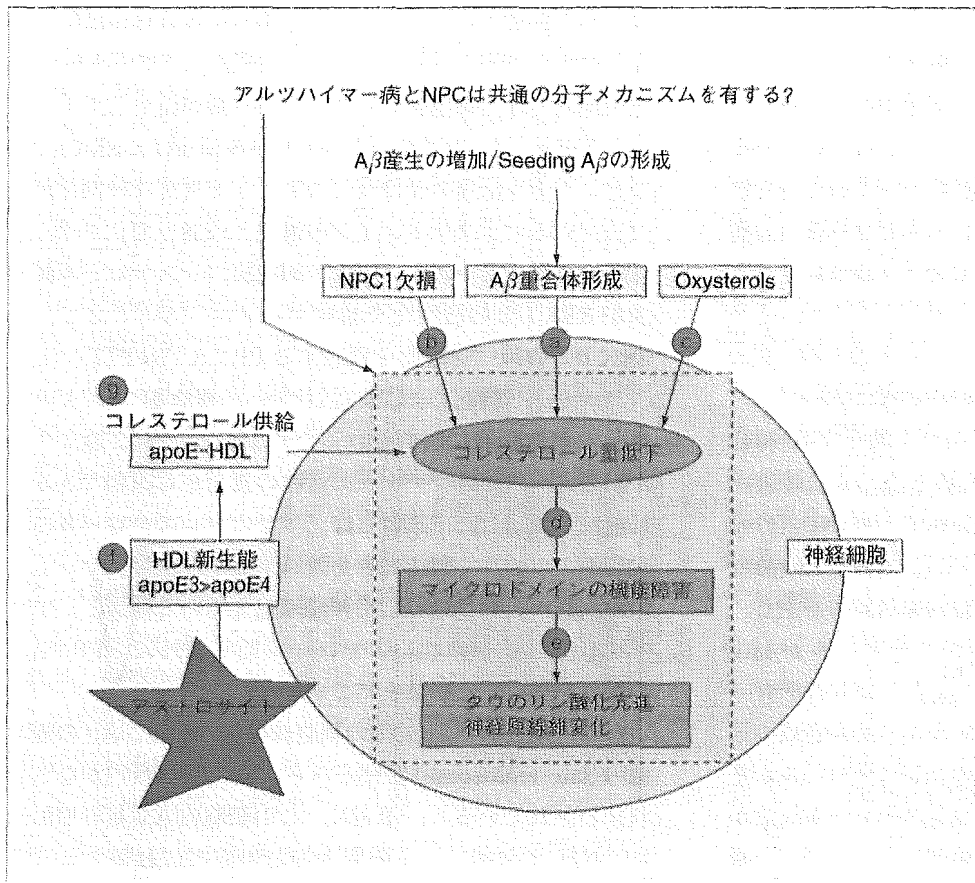


図 コレステロール代謝変動とタウのリン酸化機構(仮説)

A $\beta$ 重合体は神経細胞内コレステロール量を減少させる(a). NPCでも、コレステロール輸送障害のため、利用できるコレステロール量は減少している(b). 加齢に伴って増加すると考えられる oxysterols には強いコレステロール合成抑制作用がある(c). 細胞内コレステロールの減少はマイクロドメインの脂質構成ならびにその機能に影響し、シグナル伝達に影響する(d). その結果、タウのリン酸化亢進が誘導される(e). apoE-HDL は、コレステロール供給によってコレステロール代謝恒常性維持に寄与するが、HDL 新生能にアイソフォーム特異性がある(apoE3>apoE4)(f)ため、apoE3はapoE4に比べコレステロール供給能に優れ(g)、それが疾患発症を遅らせているのかもしれない

度の差こそあれ、少なくとも10歳以上のNPC患者では、老人斑の形成に関係なくNFT形成がみられること、② NPC患者の中で apoE $\epsilon$ 4/ $\epsilon$ 4の人でのみ、3例とも加齢では説明ができないびまん性老人斑の形成促進がみられ、いずれの症例でも NFT 形成の程度が強いこと、である。結果①は、NPCでは NFT 形成が primary に起こる可能性があること、結果②は、apoE4は DP 形成を促進し、その結果 amyloid cascade によって NFT 形成を相乗的に強めた可能性があること、と2元論的に解釈することが可能である。この解釈では本質的に新しい概念の導入なしに説明が可能である点で、この論文の面白みは薄れるかもしれない。しかし、DP 形成がみられ

た患者の年齢がいずれも30歳台であることに注目すれば、NPCの病態に apoE4による修飾が加わること、あるいは逆に apoE4型の脳内脂質代謝に NPCの病態が加わること、によって DP 形成が促進されたと解釈できる点が重要ではないかと思われる。なぜならこの解釈は、アルツハイマー病における A $\beta$ 重合体形成、A $\beta$ 沈着・老人斑形成を促進する病態として、NPC類似の(コレステロール代謝)変化を示唆するからである。このとき、同時に問われるのは、NPC病態をどう捉えるかである。コレステロールの蓄積か、輸送障害によるコレステロール欠乏か、NPC1蛋白の他の作用の欠落か、などいくつかの可能性はあるが、それぞれの考え方を apoEの

役割との関連で検証するための研究が今後必要になるだろう。ちなみに筆者らは、輸送障害により必要な部位でのコレステロール欠乏とする考え方を採って、この問題に関する研究を進めている(図)。

筆者らの考えと異なる考え方も示しておく。NFT形成がみられた細胞は、コレステロール量が多いとする報告がある。この研究では、9例のアルツハイマー病患者の剖検脳をNFTの有無で分類し、それぞれの神経細胞のコレステロール量をfilipin染色による染色強度を指標にして評価し、両者の関連を解析した<sup>4)</sup>。それによると、NFTをもつ細胞の数%ではコレステロール量が1.2倍に上昇していた。さらに、NPC1剖検脳におけるtangleをもった神経細胞におけるNFTコレステロール量も解析し、アルツハイマー病における関係と同様の結果を得たとしている。これらから、神経細胞内コレステロール量の上昇が、NFT形成に重要な役割を担っている可能性および、アルツハイマー病とNPC1はこの点で共通のメカニズムを有している可能性を指摘している(共通のメカニズムという考え方を筆者も採るが[図]、その内容は異なる)。これらの結果の再現性とその因果関係は今後の検証が必要である。NPC1ではコレステロール蓄積はlate endosome/lysosomes系で起こるが、これが、なぜタウ蛋白のリン酸化亢進、NFT形成を引き起こすのであろうか。あるいは、コレステロール蓄積による物理的圧迫がNFT形成に関与するのか。アルツハイマー病でlate endosome/lysosomeにそもそもコレステロールが蓄積するのであろうか。小器官に蓄積したコレステロールが、位相的に異なる細胞質に存在するタウ蛋白とどう関係するのか。今後、このような疑問に答えるべく、そのメカニズムを明らかにすることを期待したい。

#### ■文献

- 1) Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M et al: Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis* 120 (1-2): 67-73, 1996
- 2) Craig AM, Banker G: Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17: 267-310, 1994
- 3) Demeester N, Castro G, Desrumaux C et al: Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin: cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 41 (6): 963-974, 2000
- 4) Distl R, Meske V, Ohm TG: Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons. *Acta Neuropathol(Berl)* 101 (6): 547-554, 2001
- 5) Fagan AM, Younkin LH, Morris JC et al: Differences in the A $\beta$ 40/A $\beta$ 42 ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 48(2): 201-210, 2000
- 6) Fan QW, Yu W, Senda T et al: Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 76(2): 391-400, 2001
- 7) Fassbender K, Stroick M, Bertsch T et al: Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 59(8): 1257-1258, 2002
- 8) Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Agerholm-Larsen B et al: Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res* 41(11): 1812-1822, 2000
- 9) Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H et al: Apolipoprotein E (apoE) isoform-dependent lipid release from astrocytes prepared from human-apoE 3-and apoE 4-knock-in mice. *J Biol Chem* 277(33): 29919-29926, 2002
- 10) Jurevics H, Hostettler J, Barrett C et al: Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *J Lipid Res* 41(7): 1048-1054, 2000
- 11) Kallio MJ, Salmenpera L, Siimes MA et al: Apoprotein E phenotype determines serum cholesterol in infants during both high-cholesterol breast feeding and



- low-cholesterol formula feeding. *J Lipid Res* 38(4) : 759-764, 1997
- 12) Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T et al: Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment: A population-based study. *Neurology* 56(12) : 1683-1989, 2001
  - 13) Kuo YM, Emmerling MR, Bisgaier CL et al: Elevated low-density lipoprotein in Alzheimer's disease correlates with brain abeta 1-42 levels. *Biochem Biophys Res Commun* 252(3) : 711-715, 1998
  - 14) Kuusisto J, Koivisto K, Mykkanen L et al: Association between features of the insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease independently of apolipoprotein E 4 phenotype: cross sectional population based study. *BMJ* 315(7115) : 1045-1049, 1997
  - 15) Mauch DH, Nagler K, Schumacher S et al: CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294(5545) : 1354-1357, 2001
  - 16) Michikawa M, Fan QW, Isobe I et al: Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74(3) : 1008-1016, 2000
  - 17) Mulder M, Ravid R, Swaab DF et al: Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E 4. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12(3) : 198-203, 1998
  - 18) Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J et al: Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17(1) : 14-20, 1998
  - 19) Reitz C, Tang MX, Luchsinger J et al: Relation of plasma lipids to Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol* 61(5) : 705-714, 2004
  - 20) Saito Y, Suzuki K, Nanba E et al: Niemann-Pick type C disease: accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid beta deposition associated with apolipoprotein E epsilon 4 homozygosity. *Ann Neurol* 52(3) : 351-355, 2002
  - 21) Sawamura N, Gong JS, Chang TY et al: Promotion of tau phosphorylation by MAP kinase Erk 1/2 is accompanied by reduced cholesterol level in detergent-insoluble membrane fraction in Niemann-Pick C 1-deficient cells. *J Neurochem* 84(5) : 1086-1096, 2003
  - 22) Sawamura N, Gong JS, Garver WS et al: Site-specific phosphorylation of tau accompanied by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in brains of Niemann-Pick type C mice. *J Biol Chem* 276(13) : 10314-10319, 2001
  - 23) Scacchi R, De Bernardini L, Mantuano E et al: DNA polymorphisms of apolipoprotein B and angiotensin I-converting enzyme genes and relationships with lipid levels in Italian patients with vascular dementia or Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 9(4) : 186-190, 1998
  - 24) Suzuki K, Parker CC, Pentchev PG et al: Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol (Berl)* 89(3) : 227-238, 1995
  - 25) Wang PY, Liu P, Weng J et al: A cholesterol-regulated PP 2 A/HePTP complex with dual specificity ERK 1/2 phosphatase activity. *EMBO J* 22(11) : 2658-2667, 2003
  - 26) Yamazaki T, Chang TY, Haass C et al: Accumulation and aggregation of amyloid beta-protein in late endosomes of Niemann-pick type C cells. *J Biol Chem* 276(6) : 4454-4460, 2001

## Amyloid $\beta$ -protein (A $\beta$ )1–40 protects neurons from damage induced by A $\beta$ 1–42 in culture and in rat brain

Kun Zou,\* Daesung Kim,† Atsuko Kakio,‡ Kyunghye Byun,† Jian-Sheng Gong,\*§ Jaewoo Kim,† Myeungju Kim,† Naoya Sawamura,\*¶ Sei-ichi Nishimoto,‡ Katsumi Matsuzaki,\*\* Bonghee Lee,† Katsuhiko Yanagisawa\* and Makoto Michikawa\*

\*Department of Dementia Research, National Institute for Longevity Sciences, Aichi, Japan

†Department of Anatomy and Neurobiology, College of Medicine and Institute of Medical Science, Cheju National University, Jeju-do, Republic of Korea

‡Department of Energy and Hydrocarbon Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto

§Organization for Pharmaceutical Safety and Research of Japan, Tokyo

¶Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), Tokyo

\*\*Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto, Japan

### Abstract

Previously, we found that amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ )1–42 exhibits neurotoxicity, while A $\beta$ 1–40 serves as an antioxidant molecule by quenching metal ions and inhibiting metal-mediated oxygen radical generation. Here, we show another neuroprotective action of nonamyloidogenic A $\beta$ 1–40 against A $\beta$ 1–42-induced neurotoxicity in culture and *in vivo*. Neuronal death was induced by A $\beta$ 1–42 at concentrations higher than 2  $\mu$ M, which was prevented by concurrent treatment with A $\beta$ 1–40 in a dose-dependent manner. However, metal chelators did not prevent A $\beta$ 1–42-induced neuronal death. Circular dichroism spectroscopy showed that A $\beta$ 1–40 inhibited the  $\beta$ -sheet transformation of A $\beta$ 1–42. Thioflavin-T assay and electron microscopy analysis revealed that A $\beta$ 1–40 inhibited the fibril formation of A $\beta$ 1–42. In contrast, A $\beta$ 1–16, A $\beta$ 25–35, and A $\beta$ 40–1 did not inhibit the

fibril formation of A $\beta$ 1–42 nor prevent A $\beta$ 1–42-induced neuronal death. A $\beta$ 1–42 injection into the rat entorhinal cortex (EC) caused the hyperphosphorylation of tau on both sides of EC and hippocampus and increased the number of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive astrocytes in the ipsilateral EC, which were prevented by the concurrent injection of A $\beta$ 1–40. These results indicate that A $\beta$ 1–40 protects neurons from A $\beta$ 1–42-induced neuronal damage *in vitro* and *in vivo*, not by sequestering metals, but by inhibiting the  $\beta$ -sheet transformation and fibril formation of A $\beta$ 1–42. Our data suggest a mechanism by which elevated A $\beta$ 1–42/A $\beta$ 1–40 ratio accelerates the development of Alzheimer's disease (AD) in familial AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid  $\beta$ -protein, monomer, neuroprotection, oligomer, tau phosphorylation.

*J. Neurochem.* (2003) **87**, 609–619.

The major component of amyloid deposits in the brains of Alzheimer's disease (AD) patients is the 39- to 42-aa amyloid  $\beta$ -protein (A $\beta$ ) (Glennner and Wong 1984; Masters *et al.* 1985a). A $\beta$ 1–40 is the major soluble A $\beta$  species in biological fluids, which represents approximately 90% of the total secreted A $\beta$  (Vigo-Pelfrey *et al.* 1993). Although A $\beta$ 1–42 is a minor soluble species, it is more fibrillogenic than A $\beta$ 1–40 and accumulates initially and predominantly in parenchymal plaques (Masters *et al.* 1985b; Roher *et al.* 1993; Iwatsubo *et al.* 1994). GMI ganglioside-bound A $\beta$ 42, but not A $\beta$ 40, found in AD brains has been suggested to be a seed for amyloidogenesis (Yanagisawa *et al.* 1995). A $\beta$ 1–42 exhibits greater neurotoxicity (Dore *et al.* 1997; Zou *et al.*

2002) and produces a greater amount of hydrogen peroxide through metal ion reduction than A $\beta$ 1–40 (Huang *et al.*

Received June 3, 2003; revised manuscript received July 11, 2003; accepted July 11, 2003.

Address correspondence and reprint requests to Makoto Michikawa, MD, Department of Dementia Research, National Institute for Longevity Sciences, 36–3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474–8522, Japan. E-mail: michi@nils.go.jp

**Abbreviations used:** A $\beta$ , amyloid  $\beta$ -protein; AD, Alzheimer's disease; APP,  $\beta$ -amyloid precursor protein; APPsw, Swedish type mutation of APP; CD, circular dichroism; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EC, entorhinal cortex; FBS, fetal bovine serum; GFAP, glial fibrillary acidic protein; PBS, phosphate-buffered saline.

1999a). A $\beta$  toxicity was shown to depend on its aggregation state (Mattson *et al.* 1993; Pike *et al.* 1993; Lorenzo and Yankner 1994; Walsh *et al.* 2002). Familial-AD-linked mutations of  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) and presenilins increase the relative concentration of A $\beta$ 1–42 (Suzuki *et al.* 1994; Borchelt *et al.* 1996; Scheuner *et al.* 1996; Citron *et al.* 1997; Eckman *et al.* 1997; Tomita *et al.* 1997). These lines of evidence suggest that A $\beta$ 1–42 plays a critical role in the development of AD due to its strong amyloidogenic property. Although oligomeric A $\beta$ 1–40 was shown to affect cellular cholesterol metabolism (Michikawa *et al.* 2001; Gong *et al.* 2002) and lose its neuroprotective function (Zou *et al.* 2002), A $\beta$ 1–40, in contrast to A $\beta$ 1–42, remains a monomer under physiological conditions (Zou *et al.* 2002).

Previous studies showed that A $\beta$ 1–40 has a neurotrophic effect on differentiating neurons (Yankner *et al.* 1990) and A $\beta$ 1–40 inhibits the oxidation of lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma (Kontush *et al.* 2001). However, the role of monomeric A $\beta$ 1–40 in the pathophysiology of AD caused by A $\beta$ 1–42 remains to be completely clarified. Interestingly, recent studies showed that a high A $\beta$ 1–42/A $\beta$ 1–40 ratio, and not simply the increase in the A $\beta$ 1–42 level, is a major determinant for the early onset of AD (Younkin 1995), familial frontotemporal dementia (Amtul *et al.* 2002), and the development of plaques in human APP-transgenic mice (Mucke *et al.* 2000), suggesting an unknown effect of A $\beta$ 1–40 on the disease-promoting actions of A $\beta$ 1–42. Recently, we have found that freshly prepared A $\beta$ 1–40 and A $\beta$ 1–42 exhibit completely opposite actions on neurons; A $\beta$ 1–40 remains a monomer and prevents neuronal death induced by oxygen radicals generated in a transition metal-mediated manner, whereas A $\beta$ 1–42 aggregates immediately and promotes neuronal death (Zou *et al.* 2002). These lines of evidence led us to determine whether A $\beta$ 1–40 protects neurons from A $\beta$ 1–42-induced neurotoxicity in a ratio-dependent manner. Here, we report the novel function of A $\beta$ 1–40 other than as a metal chelator, that is, A $\beta$ 1–40 prevents neuronal death in culture, tau phosphorylation and activation of astrocytes in rat brains by inhibiting the amyloidogenesis of A $\beta$ 1–42.

## Materials and methods

### Reagents and preparation

Synthetic human A $\beta$ 1–40 was purchased from Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan; lot numbers 511024 and 510818) and AnaSpec Inc. (San Jose, CA, USA; lot number 13480–1). A $\beta$ 1–42, A $\beta$ 1–16 and A $\beta$ 25–35 were purchased from Peptide Institute Inc. A $\beta$ 40–1 was purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). A $\beta$  peptides were dissolved as described previously (Zou *et al.* 2002). In brief, A $\beta$ 1–40, A $\beta$ 40–1, A $\beta$ 1–42 and A $\beta$ 25–35 were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at 2 mM and then diluted with distilled water to a concentration of 200  $\mu$ M. Although, the solution was clear, it is known that an A $\beta$  solution contains short fibrils (Naiki

*et al.* 1998). To remove short fibrils, A $\beta$  solutions were centrifuged at 100 000 g for 1 h at 4°C, using a Beckman Optima TLX table ultracentrifuge and a Beckman TLA-120.2 fixed angle rotor. A $\beta$ 1–16 was directly dissolved in water to a concentration of 200  $\mu$ M. EDTA was purchased from Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA). Trans-1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid (CDTA) and diethylenetriamine-*N,N,N',N'*-penta-acetic acid (DTPA) were obtained from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). The monoclonal antibody PHF-1 was kindly provided by Dr P. Davies (Albert Einstein College of Medicine). The monoclonal antibodies, AT-100, AT-8, and T46 were purchased from Innogenetics (Ghent, Belgium). A polyclonal anti-GFAP antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### Cell culture and quantification of neuronal survival

All experiments were performed in compliance with existing laws and the Institute's guidelines. Cerebral cortical neuronal cultures were prepared from Sprague Dawley rats at embryonic day 17 as described previously (Michikawa and Yanagisawa 1998). The dissociated single cells were suspended in a feeding medium and plated onto poly D-lysine-coated 12-well plates at a cell density of  $5 \times 10^5$ . The feeding medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 containing 0.1% bovine albumin fraction V solution (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) and N2 supplements (Bottenstein and Sato 1979). Twenty-four hours after plating, A $\beta$ 1–42, at concentrations of 2, 3, and 4  $\mu$ M, was added to neuronal cultures maintained in the N2 medium with or without the pre-treatment (1 h before the addition of A $\beta$ 1–42) with A $\beta$ 1–40, EDTA, CDTA, or DTPA at various concentrations. Forty-eight hours following the commencement of the treatment, photomicrographs were taken and neuronal survival was determined. Neuronal survival was determined as described previously (Zou *et al.* 2002). In brief, phase-contrast photomicrographs were taken before treatment and at various time points after treatment. Neurons with intact neurites with a uniform diameter and a cell body with a smooth round appearance were considered viable, while neurons with fragmented neurites and/or shrunken cell bodies were considered non-viable. In a pilot study, cell viability was confirmed by testing cell membrane permeability using propidium iodide (PI) or by staining with a viable-cell-specific marker, calcein AM, as described previously (Michikawa and Yanagisawa 1998).

### Circular dichroism (CD) spectroscopy

CD spectra were measured on a Jasco J-720 apparatus interfaced with an NEC PC9801 microcomputer, using a 2-mm path-length quartz cell to minimize the absorbance due to buffer components. The instrument outputs were calibrated with non-hygroscopic ammonium *d*-camphor-10-sulfonate. Eight scans were averaged for each sample. The averaged blank spectra were subtracted from each CD spectra.

### Thioflavin-T binding assay for aggregated A $\beta$

Determination of the aggregated state of A $\beta$  was performed on the basis of a previously established method (LeVine 1995, 1999). The incubated A $\beta$  peptides were centrifuged at 17 000 g for 90 min, the supernatant was removed and the precipitate was resuspended in 1 mL of 5  $\mu$ M thioflavin-T in 50 mM glycine-NaOH, pH 8.5. The

steady-state fluorescence intensities for each sample were determined as described previously (Zou *et al.* 2002).

#### Electron microscopy

Samples of incubated A $\beta$  peptides were centrifuged at 17 000 *g* for 90 min, the supernatant except for 50  $\mu$ L of the bottom part was removed. The reaction mixtures were spread on carbon-coated grids, negatively stained with 1% phosphotungstic acid, pH 7.0 and examined under a transmission electron microscope (TEM) (Michikawa *et al.* 2001).

#### Animals

Adult Sprague Dawley rats (230–350 g) were used in this study. The rats were housed individually, maintained on a 12-h light-dark cycle, had access to food and water ad libitum, and were habituated to their environment for at least 1 week prior to surgery.

#### Surgery

Animals were anaesthetized with ketamine HCl (0.75 mg/kg body weight) and xylazine (1 mg/kg body weight) prior to surgical procedures. For *in vivo* experiments, A $\beta$  peptides were dissolved in distilled water to a concentration of 400  $\mu$ M and kept at 4°C until use. A $\beta$ 1–42 and/or A $\beta$ 1–40 was injected into the entorhinal cortex (EC) with the aid of a stereotaxic instrument, following the midline incision of the scalp skin. The skull was pierced with a biological electric drill at the bregma (posteriorly, 8.3 mm; laterally, 5.4 mm) and the needle (30 gauge) of a 5- $\mu$ L Hamilton syringe was lowered vertically until it reaches the target areas (depth, 4.5 mm). A total of 5  $\mu$ L of 200  $\mu$ M A $\beta$ 1–42 solution, 2.5  $\mu$ L of 400  $\mu$ M A $\beta$ 1–42 plus 2.5  $\mu$ L of 800  $\mu$ M A $\beta$ 1–40 mixture, or 5  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS) was injected slowly at the rate of 1  $\mu$ L per minute. Then the syringe was removed slowly and surgical wounds were sutured with wound clips.

#### Tissue preparation

Most of the rats were allowed to survive a total of 3 days post injection. All rats were re-anaesthetized in the same manner and perfused transcardially with 100–200 mL of heparinized saline at 18°C followed by 400 mL of 4% paraformaldehyde-lysine periodate in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH, 7.4). The brains were removed, placed in the same fixative for 4 h at 4°C, and then transferred to 20% sucrose/0.1 M phosphate-buffered (PB) solution until they sink fully at 4°C. The brains were cut in a transverse plane at 30  $\mu$ m thick on a freezing microtome and were stored at –80°C until use.

#### Immunohistochemistry

The free-floating tissue sections were processed for immunohistochemical procedure using monoclonal antibodies that specifically recognize GFAP. Sections were incubated overnight at 37°C with the polyclonal anti-GFAP antibody diluted at 1 : 100 in 0.1 M sodium PB solution containing 1% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100. After washing with PBS, the sections were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, 1 : 200) for 2 h, rinsed in PBS three times for 10 min each, and incubated in the avidin-biotin complex solution (Vector Laboratories, 1 : 50). Avidin-biotin complexes were visualized by reaction with a solution of

0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.05% 3,3'-diaminobenzidine in 0.1 M PB. Thereafter, the sections were washed, mounted onto gelatin-coated slides and coverslipped with polymount. The GFAP-positive cells were counted in an area between 0 and 500  $\mu$ m from the edge of the injection scar and in an area between 500 and 1000  $\mu$ m from the scar. In order to exclude the GFAP-positive cells arising from the injection itself, we counted the GFAP-positive cells in an area from the edge of the injection scar, defined by the loss of GFAP-positive cells, but not from the centre of the scar. The GFAP-positive cell number per cm<sup>2</sup> was then calculated. Each value represents the means number of GFAP-positive cells/cm<sup>2</sup>  $\pm$  SEM for each treatment.

#### Western blot analysis

The EC and hippocampus were isolated, homogenized in 10 volumes of Tris saline (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) containing protease inhibitors (Complete) using a motor-driven Teflon homogenizer. The homogenates were centrifuged at 19 188 *g* (Micro17R, Hanil, Korea) for 15 min at 4°C. The supernatant was saved for chemical analysis. Protein concentrations were determined with the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA). Aliquots of the supernatant containing equal amounts of proteins were subjected to 10% sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and the separated proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). The membrane was incubated for 1 h in 5% (w/v) skimmed milk in Tris-buffered saline (pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 (TBST) to block non-specific binding sites. After washing (three times for 10 min each in TBST), the membranes were incubated with the primary antibodies, AT-8 (1 : 500 dilution), AT-100 (1 : 500 dilution), T-46 (1 : 500 dilution), and PHF-1 (1 : 250 dilution) in 0.5% skimmed milk/TBST overnight at 4°C. The membranes were washed, followed by incubation with a secondary antibody, fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 5000 dilution) for 1 h at 25°C and visualized with an enhanced chemiluminescence kit (Amersham Pharmacia Biotech, Chalfont St. Giles, Bucks, UK).

#### Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using StatView computer software (Windows version 5.0, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA), and multiple pairwise comparisons among the sets of data were performed using ANOVA and the Bonferoni *t*-test.

## Results

### A $\beta$ 1–40 protects neurons against A $\beta$ 1–42-induced neurotoxicity

We studied the effect of A $\beta$ 1–40 on A $\beta$ 1–42-induced neurotoxicity. Rat embryonic cortical neurons were cultured in the DMEM/F12 medium containing N2 supplements. Viability assay for neurons was performed 48 h after the commencement of the incubation with freshly prepared A $\beta$ 1–42 at various concentrations. Incubation with A $\beta$ 1–42 at concentrations higher than 3  $\mu$ M induced neuronal death as