

apoE のアイソフォーム依存性 (apoE2 > apoE3 > apoE4) によって説明できるであろう¹⁶⁾¹⁷⁾。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) によって順番が逆になるのである。これらの結果は「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」とする仮説が、「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」とする仮説に理論上置き換えが可能であることを示している。これまでの疫学調査のデータで HDL-コレステロールとの関連を調べなおしてみることは重要である。

③ 中枢神経系では HDL-コレステロールが重要である

では、なぜ総 (あるいは LDL) コレステロールではなく HDL-コレステロールを重要視するのか? 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¹¹⁾ 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ことが示されている¹⁶⁾¹⁷⁾。したがって、血清 HDL-コレステロール値を前提として HDL 新生メカニズムを考慮すれば、中枢神経系の細胞外液中 (あるいは髄液中) のコレステロール量は apoE2 > apoE3 > apoE4 であることが予想される。加えて HDL に着目すべき理由がある。先述のように、血清中の高コレステロール値あるいは高コレステロール食は、髄液中のコレステロール濃度に影響しない^{11)~13)}。しかし興味深いことに、血清中の HDL-コレステロール値は髄液中のコレステロール値 (HDL と考えてよい) とよく相関する¹¹⁾ のである。これらの結果は、血清 HDL-コレステロールの低値、そして脳内 HDL-コレステロール量の低値をアルツハイマー病発症の危険因子であるとする解釈が、血清コレステロール値と髄液コレステロール値の関連によって説明がつくことを示している。実際にアルツハイマー病患者において血清 HDL-コレステロール値が低いとする報告¹⁸⁾¹⁹⁾があり、またアルツハイマー病の患者髄液中でのコレステロールを含む脂質濃度が対象群にくらべて低いとする報告²⁰⁾²¹⁾もある。以上から、血清コレステロール高値、また神経細胞内コレステロール高値がアルツハイマー病のリスク

だと簡単に考えることには慎重でなければならないとわれわれは考える。しかしながら、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は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。

なお読者のなかには、HDL というといわゆる体循環系の HDL を連想し、神経細胞への脂質供給がどのようなかたちでおこなわれるのか疑問に思われる方がいるかもしれない。この点について述べれば、HDL においてもそれを形成するアポリポ蛋白が異なる点が重要であると考えられる。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が、中枢神経系では apoE がその役割を担う。ApoAI レセプターとしてスカベンジャーレセプター (SR-BI) や ABCAI などが知られるものの、末梢細胞がこうしたレセプターを介し apoAI-HDL を取り込んで 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“善玉コレステロール”としての HDL の役割は意味を失う)。ところが apoE-HDL の場合は異なり、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 レセプターが存在するために、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のである。われわれは、中枢神経系内では HDL がコレステロールの搬出・搬入の双方の役割を担っていることを確認した。

④ スタチン服用でアルツハイマー病発症を予防できるか?

さて、長期にわたって先行する高コレステロール血症 (あるいは低 HDL 血症) とアルツハイマー病および MCI の発症率とに正の相関があるとすれば、当然ながら、コレステロール降下剤 (スタチン) はアルツハイマー病および MCI 発症率を下げるはずである。最近、コレステロール降下剤である HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) の服用者において、非服用者あるいはほかの薬剤の服用者にくらべアルツハイマー病発症率に有意な低下が

みられることを示す研究結果が発表された²²⁾²³⁾。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は今のところ不明であるが、いくつかの実験でそのメカニズムを示唆するものがある。最初の研究で、細胞内のコレステロール量を低下させると、APP(アミロイド前駆体蛋白質)量には影響を与えずに A β 産生を低下させるという報告がなされた²⁴⁾。この結果は、細胞膜のコレステロール濃度を下げることが α -セクレターゼ活性を増強させ、APP α 量を増加させる一方、A β 産生量を減少させるという報告によっても支持された²⁵⁾。また、大量のスタチン服用により血清コレステロール値が著減し、髄液中の A β 量が減少することがモルモットを用いた実験によって示された²⁶⁾。以上の結果は、細胞膜のコレステロール濃度の上昇が直接 A β 産生量を増加させてアルツハイマー病発症を促進させるが、一方でスタチン服用によりコレステロール濃度を低下させると A β 産生を抑制し、アルツハイマー病発症を抑制するという説明が可能であることを示している。しかしながら、その後これらに反する報告もなされた。すなわち APP トランスジェニックマウスにロバスタチンを投与したところ、雄雌とも血清のコレステロールは低下したものの、雌では脳内の A β 産生量および老人斑の数を増加させた²⁷⁾ とされる。したがってそのメカニズムに関しては依然として議論の余地があり、今後の検討が必要である。

また、スタチンの作用機序を議論するうえで重要な点は、これが血液脳関門を通過して脳内に直接作用するかどうかという点であろう。たとえば Wolozin らの疫学研究によって検討されたスタチンはロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチンの3種類であったが、プラバスタチンが最も hydrophilic(親水性)で血液脳関門を通過しにくいと考えられているにもかかわらず、アルツハイマー病の発症率を下げた。またシンバスタチンはコレステロール値を降下させた一方で、アルツハイマー病発症を抑制しなかった。それはなぜか? これらの結果は、スタチンによるアルツハイマー病抑制作用が仮にあったとしても、それが少なくとも脳内のコレステロール降下作用によるものかどうか疑問を投げかけている。また常用量のスタチン服用者の髄液の解析によると、シンバスタチンを服用したヒトでは血清コレステロール値の

低下に伴い血中の 24S-hydroxycholesterol レベルが低下することが示された²⁸⁾²⁹⁾。24S-hydroxycholesterol はおもに脳でつくられるコレステロール代謝産物であるため、スタチンが脳内コレステロール代謝に直接作用した証拠と考えられている。しかし、スタチンの常用量では髄液のコレステロール量は下げるものの A β 産生には影響しないとする報告¹²⁾ は、スタチンによるアルツハイマー病抑制効果とその脳内コレステロール産生抑制効果に関連する A β 産生低下では説明できないことを示している。すなわち、スタチンによって髄液中の A β 量の低下を招いたとする研究²⁶⁾ は通常服用量の 100 倍ものスタチン量を投与したためであり、疫学研究でみられた抑制効果が A β 量の低下によるものとは考えにくいであろう。なお、こうした混乱は *in vivo* マウス実験においてもみられる。高コレステロール食により脳内 A β 沈着が亢進し、そ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という報告³⁰⁾³¹⁾ がある一方で、高コレステロール食により脳内 A β 量が低下するとするものもあり、これらの一貫した説明ができない状況である³²⁾。餌の脂質構成があまりにも極端であったり、動物種や遺伝子操作による影響などがあるのかもしれない。

その他のスタチンの脂質代謝への作用としては、apoE の産生・分泌量を上昇させることが報告されている。Champagne ら³³⁾ は、血清コレステロール値を減少させる薬剤プロブコールがラット脳における apoE の産生量を増加させたとしている。またスタチンは総コレステロール値を減少させるが、一方で HDL-コレステロール値を増加させ³⁴⁾³⁵⁾、そのメカニズムとしてアポリポ蛋白の産生・分泌増加を介しているとする研究がある³⁶⁾。これらの報告は、総(あるいは LDL)コレステロールを低下させる薬剤がアポリポ蛋白の産生・分泌を促進することを介して HDL 量を増加させることを示す点において、低 HDL が危険因子であるとする仮説にはよく符合するものかもしれない。

これら以外にも、スタチンのも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であろう。実際、スタチンはコレステロール合成阻害以外に、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ほか, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), inducible NOS (iNOS) やサイトカインなどの産生を抑制して脳内炎症を抑えることが知られている³⁷⁾. このほかにも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との報告³⁸⁾があることから, 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³⁹⁾⁴⁰⁾でアルツハイマー病発症を抑制している可能性がある.

5 アミロイドカスケードにおいてコレステロールは中心的役割を担う

これまでアルツハイマー病とコレステロールの関連を $A\beta$ 産生の観点から述べてきたが, この両者の関連には別の側面もある. $A\beta$ はその凝集状態に依存して生物活性を発揮するとされる. 最近の研究によると, オリゴマー $A\beta$ が神経の機能障害⁴¹⁾ や細胞死など⁴²⁾⁴³⁾ を引き起こすことが示され, アミロイド形成前のオリゴマー $A\beta$ こそがアルツハイマー病発症メカニズムの主体を担うのではないかと仮説が提起されている⁴⁴⁾⁴⁵⁾. 以下に紹介するわれわれの研究も, この考え方を支持し発展させるものである. 従来より髄液中に存在する HDL に $A\beta$ が結合していることが報告されてきた. HDL には apoE も含まれることから, apoE レセプターを介して HDL 複合体を取り込むことにより $A\beta$ が除去されるのではないかという考え方がある⁴⁶⁾. しかし HDL 複合体の形成過程および生(病)理学的意味については十分に理解されているわけではなかった. われわれは, $A\beta$ 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. それは, ①オリゴマー $A\beta$ が神経細胞膜よりコレステロール, リン脂質および GM1 ガングリオシドなどを引き抜き(搬出し) HDL 様粒子を形成するが, この脂質- $A\beta$ 複合体は apoE によって産生される HDL 様粒子とは異なり細胞に取り込まれないこと⁴⁷⁾, ②オリゴマー $A\beta$ 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はたらきがあること⁴⁸⁾ である. こうした作用は単体 $A\beta$

にはみられず, むしろ抗酸化作用を発揮して細胞を保護するものであった⁴⁹⁾. アルツハイマー病脳ではオリゴマー $A\beta$ 量が増加すると考えられることから, アルツハイマー病においては増加したオリゴマー $A\beta$ 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もあろう. われわれ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, 以下のような考え方が可能になる. すなわち, オリゴマー $A\beta$ が細胞内コレステロールを減少させ⁴⁷⁾⁴⁸⁾, コレステロール量の減少が τ のリン酸化亢進⁵⁰⁾⁵¹⁾, シナプス可塑性および機能の低下³⁾⁵¹⁾⁵²⁾, そして神経細胞に特異的な細胞死の誘導⁵³⁾ などのアルツハイマー病病理に類似した神経細胞変性を招くというものである. オリゴマー $A\beta$ によって混乱する細胞内コレステロール代謝の恒常性を, アストロサイトから分泌される apoE は apoE-HDL 新生, およびそれを神経細胞に供給することによって維持していると考えられる. しかしながら, われわれの示したように apoE の HDL 新生作用(それは同時にコレステロール供給作用でもある)がアイソフォーム依存性である¹⁶⁾¹⁷⁾ ことから, apoE はアイソフォーム依存性にアルツハイマー病発症に関与しているのではないだろうか? コレステロール欠乏と τ のリン酸化亢進との関連については, 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) のモデルマウス脳において解析され, MAPK 活性の上昇および τ のリン酸化亢進⁵⁴⁾, cdk5 の活性化亢進やほかの細胞骨格蛋白のリン酸化亢進が確かめられている⁵⁵⁾. これらの機序として, NPC1 欠損細胞においてはマイクロドメインのコレステロール量の低下がそ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誘導している可能性⁵⁶⁾ を考えている.

● おわりに

①高コレステロール血症が本当にアルツハイマー病発症の危険因子であるのかどうか, という根本的問題については更なる検証が必要であると思われる. その際に規模の大きい厳密な疫学研究がなされることは当然ながら, 筆者は体循環系と中枢神経系を結ぶ因子として(血中・髄液の)HDL-コレステロールに注目することを提言したい.

- ②また血中および中枢神経系において、それぞれのコレステロール代謝の相関についての研究も未解決である。これに関しては、血液脳関門を介した脂質代謝の相互作用を明らかにするための実験系の確立と解析のほかに、24S-hydroxycholesterolなど脳内コレステロール代謝マーカーに着目する研究が必要になると思われる。
- ③スタチンの予防効果およびそのメカニズムについても上記①・②に準じておこなわれるべきであると考えますが、さらに通常量のスタチン服用でアルツハイマー病発症に関連する(コレステロールを含む)どういった因子が動くのかを、ヒト検体・動物モデル・細胞モデルを通して解析する必要がある。
- ④もし①の考え方が正しく、しかも血中コレステロールの高値が脳内コレステロール代謝に影響を与えず、さらにスタチンに予防効果があるとするならば、コレステロールの問題は脳血管の動脈硬化などを介した作用機序を示唆しているかもしれない。

文 献

- 1) Craig AM *et al* : Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17 : 267-310, 1994
- 2) Okabe S *et al* : Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2 : 804-811, 1999
- 3) Mauch DH *et al* : CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294 : 1354-1357, 2001
- 4) Strittmatter WJ *et al* : Apolipoprotein E : high-avidity binding to amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 : 1977-1981, 1993
- 5) Notkola IL *et al* : Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17 : 14-20, 1998
- 6) Jarvik GP *et al* : Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease : a case-control study. *Neurology* 45 : 1092-1096, 1995
- 7) Evans RM *et al* : Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of Alzheimer's disease : a population-based study of African Americans. *Neurology* 54 : 240-242, 2000
- 8) Kivipelto M *et al* : Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment : a population-based study. *Neurology* 56 : 1683-1689, 2001
- 9) Frikke-Schmidt R *et al* : Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype. *J Lipid Res* 41 : 1812-1822, 2000
- 10) Tan ZS *et al* : Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease : the Framingham Study. *Arch Intern Med* 163 : 1053-1057, 2003
- 11) Fagan AM *et al* : Differences in the A^ε 40/A^ε 42 ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 48 : 201-210, 2000
- 12) Fassbender K *et al* : Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 59 : 1257-1258, 2002
- 13) Jurevics H *et al* : Diurnal and dietary-induced changes in cholesterol synthesis correlate with levels of mRNA for HMG-CoA reductase. *J Lipid Res* 41 : 1048-1054, 2000
- 14) Braeckman L *et al* : Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men : phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis* 120 : 67-73, 1996
- 15) Kallio MJ *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 : 759-764, 1997
- 16) Michikawa M *et al* : Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J Neurochem* 74 : 1008-1016, 2000
- 17) Gong JS *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
- 18) Merched A *et al* : Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21 : 27-30, 2000
- 19) Hoshino T *et al* : Gene dose effect of the APOE-epsilon4 allele on plasma HDL cholesterol level in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23 : 41-45, 2002
- 20) Mulder M *et al* : Reduced levels of cholesterol, phospholipids, and fatty acids in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients are not related to apolipoprotein E4. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12 : 198-203, 1998
- 21) Demeester N *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 : 963-974, 2000
- 22) Wolozin B *et al* : Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch Neurol* 57 : 1439-1443, 2000
- 23) Jick H *et al* : Statins and the risk of dementia. *Lancet* 356 : 1627-1631, 2000

- 24) Simons M *et al* : Cholesterol depletion inhibits the generation of b-amyloid in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 6460-6464, 1998
- 25) Kojro E *et al* : Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha-secretase ADAM 10. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 5815-5820, 2001
- 26) Fassbender K *et al* : Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** : 5856-5861, 2001
- 27) Park IH *et al* : Lovastatin enhances Abeta production and senile plaque deposition in female Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* **24** : 637-643, 2003
- 28) Locatelli S *et al* : Reduction of plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) levels using high-dosage simvastatin in patients with hypercholesterolemia : evidence that simvastatin affects cholesterol metabolism in the human brain. *Arch Neurol* **59** : 213-216, 2002
- 29) Vega GL *et al* : Reduction in levels of 24S-hydroxycholesterol by statin treatment in patients with Alzheimer disease. *Arch Neurol* **60** : 510-515, 2003
- 30) Sparks DL : Intraneuronal beta-amyloid immunoreactivity in the CNS. *Neurobiol Aging* **17** : 291-299, 1996
- 31) Refolo LM *et al* : Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiol Dis* **7** : 321-331, 2000
- 32) Howland DS *et al* : Modulation of secreted beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide in brain by cholesterol. *J Biol Chem* **273** : 16576-16582, 1998
- 33) Champagne D *et al* : The cholesterol-lowering drug Probucol increases apolipoprotein e production in the hippocampus of aged rats : implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* **121** : 99-110, 2003
- 34) Adair J : Cholesterol and neuropathologic markers of AD : a population-based autopsy study. *Neurology* **59** : 788-789 : author reply 789, 2002
- 35) Chong PH *et al* : High-density lipoprotein cholesterol and the role of statins. *Circ J* **66** : 1037-1044, 2002
- 36) Bonn V *et al* : Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein AI in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis* **163** : 59-68, 2002
- 37) Hess DC *et al* : HMG-CoA reductase inhibitors (statins) : a promising approach to stroke prevention. *Neurology* **54** : 790-796, 2000
- 38) Hofman A *et al* : Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* **349** : 151-154, 1997
- 39) Ross R : Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340** : 115-126, 1999
- 40) Sparrow CP *et al* : Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21** : 115-121, 2001
- 41) Walsh DM *et al* : Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416** : 535-539, 2002
- 42) Walsh DM *et al* : Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* **272** : 22364-22372, 1997
- 43) Hartley DM *et al* : Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* **19** : 8876-8884, 1999
- 44) Klein WL *et al* : Targeting small Abeta oligomers : the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci* **24** : 219-224, 2001
- 45) Kirkitadze M *et al* : Paradigm shift in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders : emerging role of oligomeric assemblies. *J Neurosci Res*, 2002 (in press)
- 46) Holtzman DM *et al* : Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid- β deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* **103** : R15-R21, 1999
- 47) Michikawa M *et al* : A novel action of Alzheimer's amyloid β -protein (Ab) : oligomeric Ab promotes lipid release. *J Neurosci* **21** : 7226-7235, 2001
- 48) Gong JS *et al* : Amyloid β -protein affects cholesterol metabolism in cultured neurons : implications for pivotal role of cholesterol in the amyloid cascade. *J Neurosci Res* **70** : 438-446, 2002
- 49) Zou K *et al* : A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *J Neurosci* **22** : 4833-4841, 2002
- 50) Fan QW *et al* : Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* **76** : 391-400, 2001
- 51) Koudinov AR *et al* : Essential role for cholesterol in synaptic plasticity and neuronal degeneration. *FASEB J* **15** : 1858-1860, 2001
- 52) Fan QW *et al* : Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* **80** : 178-190, 2002
- 53) Michikawa M *et al* : Inhibition of cholesterol production but not of nonsterol isoprenoid products induces neuronal cell death. *J Neurochem* **72** : 2278-2285, 1999
- 54) Sawamura N *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** : 10314-10319, 2001
- 55) Bu B *et al* : Deregulation of cdk5, hyperphosphorylation, and cytoskeletal pathology in the Niemann-Pick type C murine model. *J Neurosci* **22** : 6515-6525, 2002
- 56) Sawamura N *et al* : 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*, 2003 (in press)

別刷

Cognition and Dementia

Vol. **2** No. **3**

2003. 7

メディカルレビュー社

コレステロール代謝変動と タウオパチー

Cholesterol and tauopathy

国立長寿医療研究センター痴呆疾患研究部長

Makoto Michikawa 道川 誠

Summary

コレステロール代謝とアルツハイマー病(AD)との関連が注目されている。これらの議論は当然、中枢神経系のコレステロール代謝とAD病理との関連でなされる必要がある。しかし、血液中のコレステロール代謝は中枢神経系でのそれとは大きく異なるうえ、相互の関連性も未確定であるにもかかわらず、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、こうした既報の疫学研究結果の解釈上の問題点を考察し、タウのリン酸化などアミロイドカスケードにおけるコレステロールの役割、特にコレステロールと神経原線維変化(タウのリン酸化亢進)の関連に焦点を当てた論を展開した。

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
- ニーマン・ピック病
- マイクロドメイン
- アポリポ蛋白 E

Ⅰ 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(AD)発症機構とコレステロール代謝の関係に関心が寄せられている。しかし、コレステロール代謝研究の知見の集積は膨大であるにもかかわらず、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。しかも、神経細胞は、その形態が他の細胞と異なること、血液脳関門により体循環系とは隔絶されていることなどから、非神経細胞(組織)におけるコレステロール代謝の知見をそのまま用いることはできない。たとえば、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と考えられる。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²⁾。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。これを支持する研究として最近、細胞外液中のHDL(高比重リポ蛋白)-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³⁾。以上のような理由から神経

系独自の脂肪代謝系を明らかにし、その上に立ってAD発症機構とコレステロール代謝の関係を議論する必要がある。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、AD発症機構とコレステロール研究の論点を整理することに前半の誌面を使い、後半にタウとコレステロール研究についてより具体的な議論を展開したい。



III コレステロール代謝とAD

1. 血清コレステロール値とADおよびアポリポ蛋白E (ApoE) 遺伝子多型

AD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^{9)~9)}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AD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⁷⁾。血清コレステロール値とApoEの遺伝子多型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る。これらの研究では、血清コレステロール値はApoE2<ApoE3<ApoE4の順であることが示されている^{9)~10)}。こうした結果は、AD発症とApoE4型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、ApoE4はApoE2やApoE3に比べて血清コレステロール値を上昇させることでAD発症促進に関わっていると考えることができる。

2. コレステロールパラドックス—高総コレステロール or 低HDL-コレステロール, 真犯人はどちらか?

では、上記の考え方で、すべてが矛盾なく説明できるのだろうか? 実は、そう単純ではないかもしれない。なぜなら、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^{11)~13)}とされるからである。この結果が本当ならば、「先行する高コレステロール血症がAD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ことになる。この矛盾に対して筆者は、同じデータに対して別の解釈が可能ではないかと考えて

いる。確かに、血清中の総コレステロール値[あるいはLDL(低比重リポ蛋白)コレステロール値]は、ApoEのアイソフォームに依存して高い順にApoE4>ApoE3>ApoE2となっている^{9)~10)}。しかし、血清HDL-コレステロール値をみると、全く逆になる(高い順にApoE2>ApoE3>ApoE4)^{9)~10)}。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、おそらく筆者らが報告したようにApoEの逆行性コレステロール運搬作用(コレステロール搬出による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^{14)~15)}。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)によって全く逆の順番になるのである。したがって、「先行する高コレステロール血症がAD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ADの危険因子である」とする仮説に理論上置き換え可能であることに注目すべきではないかと考える。

3. 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-コレステロールが存在しない¹¹⁾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(超低比重リポ蛋白)などのリポ蛋白とそれらに関連する多くのアポリポ蛋白は存在しない。ゆえに、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。ここで多くの研究者は、HDLの名前から誤解をしてしまうかもしれない。同じHDLといっても、それを形成するアポリポ蛋白が中枢神経系と体循環系では異なる点に注意すべきである。血液中ではアポリポ蛋白AI(ApoAI)がHDL形成に重要な役割を果たすが、中枢神経系ではアポリポ蛋白E(ApoE)の役割が重要であると考えられる。ApoAI受容体としてスカベンジャー受容体(SR-B1)やABCAIなどが知られるが、末梢細胞がApoAI-HDLをこうした受容体を介して取り込み、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行輸送されると考えられる(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、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と考えられるからである。筆者らは中枢神経系内ではHDLがコレステロールの搬出と供給の双方の役割を担っていることを裏づける研究結果を得ている(論文準備中)。

以上述べたように、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。したがって、血清HDL-コレステロール値を踏まえれば、中枢神経系の細胞外液中(あるいは髄液中)のコレステロール量は、 $ApoE2 > ApoE3 > ApoE4$ である可能性が高い。これを支持するデータとして、筆者らはアストロサイトにおけるApoEによるHDL新生能は $ApoE2 > ApoE3 > ApoE4$ であることを見出した¹⁴⁾¹⁵⁾。さらに、HDLに着目すべき理由として、血清の総(またはLDL)コレステロール値は、髄液コレステロール値に影響しない^{11)~13)}が、血清HDL-コレステロール値は髄液コレステロール値(HDLと考えてよい)とよく相関する¹¹⁾とされる。これらは、血清および脳内HDL-コレステロール値の低下が、AD発症の危険因子である、とする疫学データの解釈に矛盾しない。実際、AD患者の血清HDL-コレステロール値が低いとする報告¹⁶⁾¹⁷⁾がある。また、髄液のコレステロール値についても、AD患者の髄液コレステロール値は対照群に比し低いとする報告¹⁸⁾¹⁹⁾がある。以上から、血清や髄液の高コレステロール値からAD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AD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アイソフォームあるいはAD発症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

上記のように、「どこ」のコレステロール代謝がAD発症と関連するかに常に注意して研究することの必要性を述べた。本稿では議論できないが、「どこ」には、血清や髄液といった違いのほかに、細胞内外、膜や小器官、さらにマイクロドメインなどといった総量の大小では論じられない、より厳密なものも含まれることを述べておきたい。この前提を踏まえたうえで以下の議論をする。

コレステロールとAD病理を考える際の論点を考えれば以下の2点に要約されるだろう。すなわち、①コレステロール代謝変動とアミロイドβ蛋白(Aβ)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のリン酸化・神経原線維変化(NFT)およびシナプス・細胞死との関連である。以下、②に関する議論をする。②に関する議論といっても、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、「コレステロール代謝変動-Aβ産生の変動-アミロイドカスケードからタウのリン酸化」の図式として理解することを求めている(上記①の立場)。しかし、この論理展開は、コレステロール代謝とタウのリン酸化をアミロイドカスケードを挟んで間接的に論じているため、本稿の趣旨に沿うものではなく、これに関連する研究の紹介は割愛する。したがって、コレステロールとタウの問題を直接論じた研究は、筆者の知るかぎりほぼ以下ようになる。

1. ニーマン・ピック病C型における神経原線維変化(NFT)の形成

コレステロール代謝異常とタウのリン酸化・NFTの直接の関係を示唆する疾患としてニーマン・ピック病C型(NPC)がある。この疾患の病態として、LDL由来のコレステロールを取り込んだのち、コレステロールの細胞内輸送機構が障害された結果、late endosome/lysosomeに遊離コレステロールが蓄積することが知られ、1997年に原因遺伝子としてNPC1が同定された²⁰⁾²¹⁾。興味深いのは、NPC脳では老人斑(SP)の沈着なしにADのPHF(paired helical filament)タウに類似したPHFタウ形成

を認める²²¹⁻²⁴¹点であり、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うえで重要な系であると考えられる。

2. コレステロール代謝障害とタウのリン酸化調節異常

以上のような背景から、筆者らの研究室では、NPCのモデルマウス脳の解析を行った²⁵¹。その結果、MAPK (mitogen-activated protein kinase, ERK1/2)の活性化とタウのSer-396および404に選択的なリン酸化亢進が認められ、MAPK活性化によりタウのリン酸化亢進が誘導されている可能性を指摘した。さらに、これらの因果関係を明らかにし、NPCのコレステロール代謝障害がタウのリン酸化の亢進を引き起こすメカニズムを明らかにするために、筆者らはNPC1欠損細胞を用いた実験を行った。この際に重要になるのは、NPCではどのようなコレステロール代謝障害が起こっているのかということである。コレステロール蓄積なのか、輸送障害による欠乏なのか、またはNPC1蛋白に関連した他の要因なのか、これらを明確にしつつ研究の方向性を定める必要がある。

筆者らのNPC1欠損細胞を用いた研究の結果、NPC1欠損細胞では、コレステロール合成の著しい亢進、コレステロールエステル合成の強い抑制、マイクロドメイン (lipid raft)におけるコレステロール量の低下、MAPKの活性化亢進などがみられ、またこのような条件下でタウのリン酸化亢進が起こることが明らかになった²⁶¹。ただし、培養細胞でのタウはmultiple sitesでリン酸化されており、*in vivo*とは異なる制御システムが働いている可能性が示唆された。われわれが今までに行った電子顕微鏡およびfilipin染色による解析から、NPCモデルマウス脳やNPC1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が確認されている。以上の結果から筆者らは、NPC1欠損細胞は、コレステロールを著しく蓄積するにもかかわらず、輸送障害があるために必要な場所には供給できず、その結果コレステロール欠乏を招いていると考えている。その結果、MAPKなどシグナル伝達の受け渡しの場として重要な役割を果た

しているマイクロドメインの機能に影響が出て、各種シグナルの活性調節の乱れからタウのリン酸化亢進が誘導されるのではないかと考えている。筆者らは、さら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どう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、上記仮説を支持する結果を得た²⁷¹。すなわち、細胞内コレステロール量の減少に伴ってMAPKの活性化およびタウのリン酸化亢進が認められ、それはコレステロールを補うことで抑制された。このとき、マイクロドメインにおけるコレステロール量は低下していた²⁸¹。

なお、最近NPC1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²⁸¹。筆者は、この細胞内 $A\beta$ 量の増加は、NPC1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 (疾患にとって本質的ではない) 可能性を考えている。しかし、 $A\beta$ 産生の場としてマイクロドメインの役割を示唆する研究もあることから、NPC1欠損と $A\beta$ 産生およびその後の代謝変動が、コレステロール代謝変動を介した別の機序で連動している可能性があるかもしれない。仮にNPCにおけるタウ異常 (タウのリン酸化促進およびNFT形成)が、細胞内 $A\beta$ 蓄積増加に起因したアミロイドカスケードの結果であるとするれば、NPCの理解に新しい局面を開くのみならず、AD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。

これに関連する可能性がある報告として最近、NPCにおけるNFT形成の問題を、ApoEのアイソフォーム (特にApoE4)およびSP沈着を巻き込んだかたちで提示した論文が発表された²⁹¹。この論文の面白さは、NPC、AD、NFT、ApoE4、SPのすべて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、現時点では現象論の域を出ないし、それぞれの要素間の因果関係の検証は今後の課題である。筆者なりにこの論文の要点を挙げるとすれば、①程度の差こそあれ、少なくとも10歳以上のNPC患者では、SPの存在に無関係にNFT形成がみられること、②NPC患者の中でApoE ϵ 4/ ϵ 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 (DP)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、あるといえよう。この結果は、① NPC にみられるコレステロール代謝障害が直接 NFT 形成に深く関与している可能性を強く示唆すること、② ApoE4 は DP 形成を促進し、その結果アミロイドカスケードによって NFT 形成を相乗的に強めた可能性があること、と二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、この報告の面白味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 による脂質代謝に NPC の病態が加わることで 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、AD における重合体形成、SP 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)変化を想定することができるからである。このとき同時に問われるのは、何度も述べるように NPC

病態をどう捉えるかであろう。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、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。ただし、NPC 細胞ではコレステロール合成が著しく亢進していること、コレステロールエステル合成が強く抑制されていること、マイクロドメインのコレステロール量が低いことなど²⁶⁾から、筆者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 1)。

3. コレステロール蓄積と NFT 形成

さて、筆者らの考えと対照的に、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。すなわち、Distl らは 9 例の AD 患者の剖検脳を tangle の有無で分類し、それぞれの神経細胞の遊離コレステロー

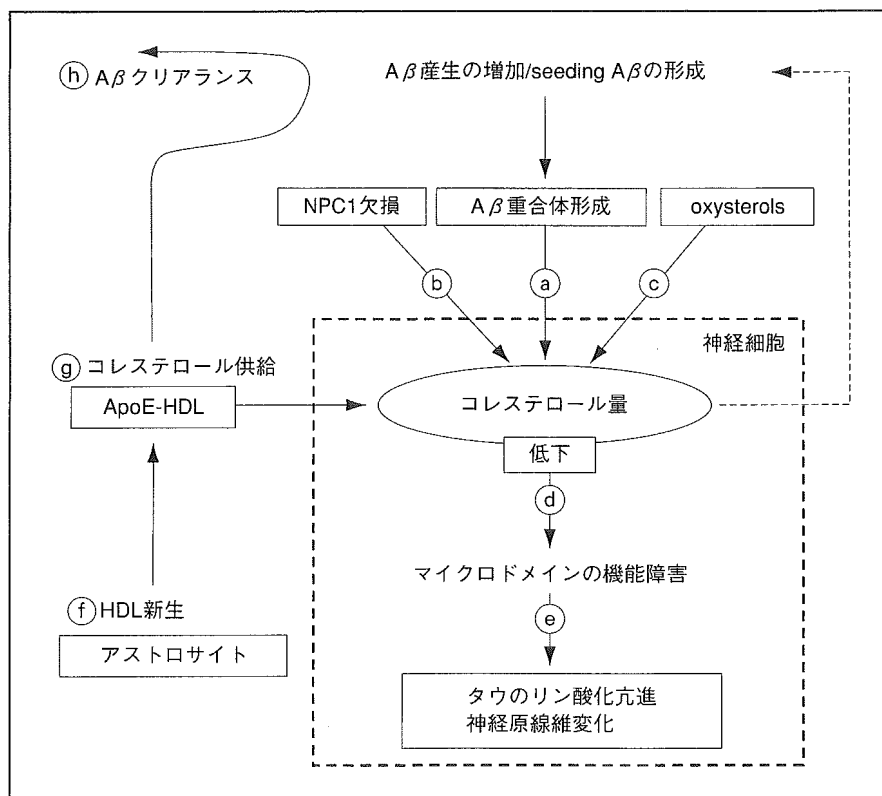


図 1 コレステロール代謝変動とタウのリン酸化機構(仮説)―AD と NPC は共通の分子メカニズムを有する?

Aβ 重合体は神経細胞のコレステロール代謝を障害し、細胞内コレステロール量を減少させる(Ⓐ)。また NPC でも、コレステロールの輸送障害のため、利用できるコレステロール量は減少していると考えられる(Ⓑ)。これらの他にも、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ことが知られている(Ⓒ)。細胞内コレステロールが減少すると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を与え(Ⓓ)、その結果、タウのリン酸化亢進が誘導される(Ⓔ)可能性がある。なお、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)(Ⓕ)ことから、ApoE3 は ApoE4 に比べコレステロール供給能に優れ(Ⓖ)、それが疾患発症を遅らせているのかもしれない。また、HDL 粒子は Aβ と結合し、Aβ 除去に働くと考えられるが、HDL 粒子数は ApoE3>ApoE4 であるため ApoE3 のほうが Aβ 除去効率が高い(Ⓖ)と考えられ、Aβ 重合体形成を遅らせている可能性がある。

ル量を filipin 染色法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ものを報告した³⁰⁾。それによると AD 脳における神経細胞で tangle をもつ細胞では、もたない細胞に比べて遊離コレステロール量の分布のピークが約1.05倍に増加し、tangle をもつ細胞の数パーセントの subpopulation では遊離コレステロール量が1.2倍に上昇していた。Distl らはさらに、NPC 剖検脳における tangle をもった神経細胞における遊離コレステロール量も解析し、AD における関係と同様の結果を得た³¹⁾としており、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 AD と NPC 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。この変化が疾患発症との関連で意味あるものかどうかは、再現性およびその因果関係も含めて検証する必要があるだろう。既述したように NPC では確かに総コレステロール量は著しく増加するが、これは細胞内でコレステロールが余っていることを意味しない。なぜなら、NPC ではコレステロール合成は亢進し、そのエステル化は強く抑制されており、むしろコレステロールは不足していると考えられるからである。では、コレステロール蓄積による物理的圧迫が NFT 形成に関与するのであろうか。あるいは NFT 形成に伴う変化の結果としてコレステロール蓄積が更新するのだろうか。AD のコレステロール増加を NPC とのアナロジーで論を展開しているが、AD で late-endosome/lysosome にコレステロールが蓄積するのであろうか。また、こうした小器官に蓄積したコレステロールが、細胞質に存在するタウ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。

4. コレステロール減少とタウのリン酸化亢進

すでに述べたように、筆者らは HMG-CoA reductase (スタチン)処理により細胞内コレステロール量を減少させるとタウのリン酸化が誘導されることを報告した²⁷⁾。さらに、コレステロールの減少は、MAP2のリン酸化にも影響し、樹状突起選択的にその伸長を抑制することも報告した³²⁾。これらの変化は最終産物であるコレステロ

ールヤリポ蛋白の添加で回復することから、スタチンによるコレステロール抑制によってもたらされた変化であり、その機序としてはマイクロドメインのコレステロール量の減少によって細胞内シグナルの変動を招いたためであると結論した。その後 Meske らは、スタチン処理によって神経突起伸長に障害をきたし、タウのリン酸化を誘導するという筆者らと同様の現象を報告した³³⁾。しかしその機序として、最終産物であるコレステロールの欠乏によるものではなく、geranylgeranylpyrophosphate 産生量の低下による³³⁾としており、筆者らの研究結果と明らかに異なるものとなっている。この乖離は、1つには用いたスタチンの濃度が30倍以上違うこと(彼らは10 μ M であり、筆者らは0.3 μ M であった)、用いた神経細胞の培養日数が異なることが考えられる。高濃度のスタチンはコレステロール以外に、isoprenoid products の産生をも強く抑制してしまうために、その影響が強く出てしまったのではないだろうか。しかし、低濃度では isoprenoid products 産生に影響を与えずにコレステロールのみの合成抑制をもたらすことが知られている。そもそも10 μ M のスタチン投与というのは非現実的であり、低濃度によってもたらされるコレステロール量の減少による議論が重要ではないだろうか。

文 献

- 1) Craig AM, Banker G : Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17 : 267-310, 1994
- 2) Okabe S, Kim HD, Miwa A, et al : Continual remodeling of postsynaptic density and its regulation by synaptic activity. *Nat Neurosci* 2 : 804-811, 1999
- 3) Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, et al : CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294 : 1354-1357, 2001
- 4) Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, et al : Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease ; A case-control study. *Neurology* 45 : 1092-1096, 1995
- 5) Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, et al : Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 17 : 14-20, 1998
- 6) Evans RM, Emsley CL, Gao S, et al : Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of Alzheimer's disease ; A population-based study of African Americans. *Neurol*

- ogy 54 : 240-242, 2000
- 7) Kivipelto M, Helkala EL, Hanninen T, et al : Midlife vascular risk factors and late-life mild cognitive impairment ; A population-based study. *Neurology* 56 : 1683-1989, 2001
 - 8) 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 : 759-764, 1997
 - 9) 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 : 67-73, 1996
 - 10) 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 : 1812-1822, 2000
 - 11) Fagan AM, Younkin LH, Morris JC, et al : Differences in the A β 40/A β 42 ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 48 : 201-210, 2000
 - 12) 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 : 1048-1054, 2000
 - 13) Fassbender K, Stroick M, Bertsch T, et al : Effects of statins on human cerebral cholesterol metabolism and secretion of Alzheimer amyloid peptide. *Neurology* 59 : 1257-1258, 2002
 - 14) 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 : 1008-1016, 2000
 - 15) Gong JS, Kobayashi M, Hayashi H, 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
 - 16) Merched A, Xia Y, Visvikis S, et al : Decreased high-density lipoprotein cholesterol and serum apolipoprotein AI concentrations are highly correlated with the severity of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21 : 27-30, 2000
 - 17) Hoshino T, Kamino K, Matsumoto M : Gene dose effect of the APOE-epsilon4 allele on plasma HDL cholesterol level in patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23 : 41-45, 2002
 - 18) 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 E4. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 12 : 198-203, 1998
 - 19) 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 : 963-974, 2000
 - 20) Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, et al : Murine model of Niemann-Pick C disease ; Mutation in a cholesterol homeostasis gene. *Science* 277 : 232-235, 1997
 - 21) Carstea ED, Morris JA, Coleman KG, et al : Niemann-Pick C 1 disease gene ; Homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277 : 228-231, 1997
 - 22) Love S, Bridges LR, Case CP : Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain* 118(Pt. 1) : 119-129, 1995
 - 23) Suzuki K, Parker CC, Pentchev PG, et al : Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathol(Berl)* 89 : 227-238, 1995
 - 24) Auer IA, Schmidt ML, Lee VM, 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 : 547-551, 1995
 - 25) 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 : 10314-10319, 2001
 - 26) Sawamura N, Gong JS, Chang TY, et al : Promotion of tau phosphorylation by MAP kinase Erk1/2 is accompanied by reduced cholesterol level in detergent-insoluble membrane fraction in Niemann-Pick C1-deficient cells. *J Neurochem* 84 : 1086-1096, 2003
 - 27) Fan QW, Yu W, Senda T, et al : Cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation in cultured neurons. *J Neurochem* 76 : 391-400, 2001
 - 28) 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 : 4454-4460, 2001
 - 29) 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 : 351-355, 2002
 - 30) Distl R, Meske V, Ohm TG : Tangle-bearing neurons contain more free cholesterol than adjacent tangle-free neurons. *Acta Neuropathol(Berl)* 101 : 547-554, 2001
 - 31) Distl R, Treiber-Held S, Albert F, et al : Cholesterol storage and tau pathology in Niemann-Pick type C disease in the brain. *J Pathol* 200 : 104-111, 2003

-
- 32) Fan QW, Yu W, Gong JS, et al : Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem* **80** : 178-190, 2002
- 33) Meske V, Albert F, Richter D, et al : Blockade of HMG-

CoA reductase activity causes changes in microtubule-stabilizing protein tau via suppression of geranylgeranylpyrophosphate formation ; Implications for Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **17** : 93-102, 2003

Amyloid β -Protein Affects Cholesterol Metabolism in Cultured Neurons: Implications for Pivotal Role of Cholesterol in the Amyloid Cascade

Jian-Sheng Gong,¹ Naoya Sawamura,¹ Kun Zou,¹ Juro Sakai,² Katsuhiko Yanagisawa,¹ and Makoto Michikawa^{1*}

¹Department of Dementia Research, National Institute for Longevity Sciences, Morioka, Obu, Japan

²Division of Nephrology and Vascular Medicine, Department of Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

Recently, we have found that alterations in cellular cholesterol metabolism are involved in promotion of tau phosphorylation (Fan et al. [2001] *J. Neurochem.* 76: 391–400; Sawamura et al. [2001] *J. Biol. Chem.* 276:10314–10319). In addition, we have shown that amyloid β -protein ($A\beta$) promotes cholesterol release to form $A\beta$ -lipid particles (Michikawa et al. [2001] *J. Neurosci.* 21:7226–7235). These lines of evidence inspired us to conduct further studies on whether $A\beta$ affects cholesterol metabolism in neurons, which might lead to tau phosphorylation. Here, we report the effect of $A\beta$ 1–40 on cholesterol metabolism in cultured neurons prepared from rat cerebral cortex. Oligomeric $A\beta$ 1–40 inhibited cholesterol synthesis and reduced cellular cholesterol levels in a dose- and time-dependent manner, while freshly dissolved $A\beta$ had no effect on cholesterol metabolism. However, oligomeric $A\beta$ had no effect on the proteolysis of sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) or protein synthesis in cultured neurons. Oligomeric $A\beta$ did not enhance lactate dehydrogenase (LDH) release from neuronal cells or decrease signals in the cultures reactive to 3,3'-Bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, hexaacetoxymethyl ester (calcein AM) staining, indicating that $A\beta$ used in this experiment did not cause neuronal death during the time course of our experiments. Since alterations in cholesterol metabolism induce tau phosphorylation, our findings that oligomeric $A\beta$ alters cellular cholesterol homeostasis may provide new insight into the mechanism underlying the amyloid cascade hypothesis. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid β -protein; tau phosphorylation; cholesterol; cholesterol release; cholesterol synthesis

The formation of intracellular neurofibrillary tangles and extracellular amyloid deposits is the neuropathological hallmark of Alzheimer's disease (AD; Selkoe, 1994). The

age-related accumulation of amyloid β -protein ($A\beta$) in fibril form is assumed to initiate the clinico-pathological process in AD (Hardy and Higgins, 1992; Esiri et al., 1997); this is called the amyloid cascade hypothesis. Previous studies showing that aggregated $A\beta$ fibrils, but not $A\beta$ monomers, induce tau phosphorylation (Takashima et al., 1993; Busciglio et al., 1995) and neurodegeneration in cultured neurons (Mattson et al., 1993; Pike et al., 1993; Lorenzo and Yankner, 1994) support this hypothesis. Recently, it has been shown that not fibrillar $A\beta$, but oligomeric $A\beta$ and the intermediates in amyloid fibril formation, also have biological effects including cytotoxicity on neurons (Lambert et al., 1998; Hartley et al., 1999; El-Agnaf et al., 2001), suggesting that the role of $A\beta$ oligomers in the amyloid cascade. However, the molecular mechanism underlying tau phosphorylation induced by $A\beta$ remains unclear.

Accumulating evidence has shown that the interaction of $A\beta$ with membrane lipid is the initial step of amyloid fibril formation in AD brain (Yanagisawa et al., 1995) and in vitro (Terzi et al., 1995; Choo-Smith et al., 1997). It has been reported that $A\beta$ interacts with neuronal membranes, modulating membrane function by altering the physicochemical properties of membrane constituents including lipids (Muller et al., 1995; Mason et al., 1996; McLaurin and Chakrabarty, 1996; Avdulov et al.,

Contract grant sponsor: Sciences (8A-1); Contract grant sponsor: Research on Brain Science from the Ministry of Health, Labor and Welfare; Contract grant sponsor: CREST (Core Research for Evolutional Sciences and Technology), Japan; Contract grant sponsor: Ono Research Foundation and Life Science Foundation of Japan.

*Correspondence to: Makoto Michikawa, M.D., National Institute for Longevity Sciences, 36-3 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan. E-mail: michi@nils.go.jp

Received 27 December 2001; Revised 26 February 2002; Accepted 28 February 2002

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.10347

1997; Chochina et al., 2001), and that these interactions are dependent on the aggregation state of A β (Avdulov et al., 1997; Mason et al., 1999). These interactions have also been demonstrated as A β -lipid complexes existing as high-density lipoproteins (HDLs) in the cerebrospinal fluid (Koudinov et al., 1996; Fagan et al., 2000) and human plasma (Koudinov et al., 1994; Biere et al., 1996; Matsubara et al., 1999).

In accordance with these lines of evidence, our recent study shows that oligomeric A β promotes lipid release from astrocytes and neurons to form A β -lipid particles that cannot be internalized into neurons, suggesting that pathological forms of A β may disrupt cellular cholesterol homeostasis (Michikawa et al., 2001). Moreover, we have shown that alterations in cholesterol metabolism induce tau phosphorylation (Fan et al., 2001; Sawamura et al., 2001), suggesting that cholesterol is the key molecule in the pathogenesis of tauopathy. These lines of evidence have led us to the hypothesis that A β disrupts cholesterol homeostasis in neurons, leading to the abnormal phosphorylation of tau. In the present study, the effect of A β on cholesterol metabolism is examined using primary cultures of neurons. We found that oligomeric A β reduces cellular cholesterol levels in neurons by inhibiting cholesterol biosynthesis. Our findings may give new insight into the mechanism underlying the amyloid cascade governing how A β causes tau phosphorylation.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

All experiments were performed in compliance with existing laws and institutional guidelines. Neuron-rich cultures were prepared from rat cerebral cortices as previously described (Michikawa and Yanagisawa, 1998). The dissociated cells were suspended in the feeding medium and plated onto poly-D-lysine-coated 12-well plates at a cell density of $2 \times 10^5/\text{cm}^2$. The feeding medium consisted of Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture (DMEM/F12; 50%:50%) and N₂ supplements. More than 99% of the cultured cells were identified as neurons by immunocytochemical analysis using monoclonal antibody against microtubule associated protein 2, a neuron-specific marker, on day 3 of culture (Michikawa and Yanagisawa, 1999).

Preparation of Oligomeric A β

Synthetic A β 1-40 (TFA salt) was purchased from Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan; lot numbers 500520, 501001, and 510116). A β was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 13.3 M, and diluted with phosphate-buffered saline (PBS) to obtain a 350- μM stock solution. The A β solution was then incubated for 24 hr at 37°C. After incubation, the A β solution was filtered through a 0.45- μm Millipore filter (iA β). Peptide concentrations of the filtered A β solution were determined using a bicinchoninic acid protein assay kit (Pierce, Rockford, IL). Fresh A β 1-40 was dissolved in the same manner to obtain a 350- μM stock solution and used for experiments immediately after the determination of its peptide concentration.

Determination of Cellular and Released Cholesterol Content

Cellular cholesterol content was determined as described previously (Fan et al., 2001). For the determination of cholesterol released into the media, cholesterol content in 1 ml of each culture medium was analyzed as described previously (Michikawa et al., 2000).

Quantification of Released and Intracellular Cholesterol by [¹⁴C]acetate Labeling

Neurons in 6-well or 12-well plates were labeled in DMEM supplemented with N₂ supplements containing 37 kBq/ml of [¹⁴C]acetate (DuPont NEN, Boston, MA) for 48 hr. The labeled cells were rinsed three times with fresh DMEM and treated with the reagents examined. Aliquots of 1.0 ml of each conditioned medium were filtered through a 0.45- μm Millipore filter and then transferred into clean glass tubes containing 4.0 ml of chloroform:methanol (2:1 v/v). The organic phase was separated from the aqueous phase, washed twice by vigorous shaking with 3 ml of chloroform:water (1:1 v/v), separated from the aqueous phase by centrifugation, and dried under N₂ gas. For the extraction of intracellular lipids, dried cells were incubated in hexane:isopropanol (3:2 v/v) for 1 hr at room temperature. The solvent from each plate was removed and dried under N₂ gas. The organic phases were redissolved in 50 μl of chloroform, and 10 μl of each sample was spotted on activated silica gel high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) plates (Merck, Darmstadt, Germany). The lipids were separated by sequential one-dimensional chromatography using the chloroform:methanol:acetic acid:water (25:15:4:2, v/v/v/v) solvent system, followed by another run in hexane:diethyl ether:acetic acid (80:30:1). [¹⁴C]cholesterol and [¹⁴C]phosphatidylcholine were used as standards. The chromatography plates were exposed to radiosensitive films and each lipid was visualized and quantified with BAS2500 (Fuji Film, Tokyo, Japan). The amount of lipid efflux was calculated as the percentage of released lipid relative to the total lipid content (released plus intracellular lipid).

Nuclear Extract Preparation

Nuclear extracts were prepared from cultured neurons incubated for 48 hr in the presence or absence of iA β (5 μM) in serum-free N2 medium, according to the previously described method (Andrews and Faller, 1991). Cultured neurons were washed and collected in buffer A (10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). After centrifugation, the cell pellet was resuspended in buffer A containing 0.1% Nonidet-P and protease inhibitors (Complete™, Boehringer-Mannheim, Germany). The nuclei were collected by centrifugation at 5,000 rpm for 1 min at 4°C. The pellet was resuspended in buffer B (20 mM Hepes, pH 7.9, 2.5% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, and protease inhibitors, Complete™). The nuclear fractions were obtained by centrifugation at 14,000 rpm for 15 min. The samples were then subjected to immunoblot analysis using anti-SREBP-2 antibody, 7D4, at a concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Yang et al., 1995).

Incorporation of [³⁵S]methionine to Cellular Proteins

The cultured neurons in N2 medium incubated in the presence or absence of iA β (5 μ M) for 48 hr were used for the experiments. The cultures were washed with DMEM three times, followed by incubation in DMEM medium containing [³⁵S]-L-methionine (0.9 MBq/ml) for 30 and 120 min at 37°C. After treatment, the cells were washed with DMEM three times and then collected into tubes, subjected to sonication and incubated in 2% sodium dodecylsulfate (SDS) for 1 hr at 4°C. The samples were then centrifuged to remove cell debris, and solubilized cellular proteins were precipitated using 15% trichloroacetic acid (TCA). Before precipitation, aliquots of the samples were used for the determination of protein concentration and [³⁵S]methionine uptake. Radioactivities of each sample were determined using a scintillation counter.

Viability Assay

The release of the cytoplasmic enzyme, lactate dehydrogenase (LDH), into culture medium was determined for the quantification of cell mortality as described previously (Michikawa and Yanagisawa, 1999). Cultured neurons incubated in the presence or absence of iA β (5 μ M) for 3 days were treated with 2 μ M 3,3'-Bis[N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, hexaacetoxymethyl ester (calcein AM) (Molecular Probes, Eugene, OR) for 30 min at 37°C. The cultures were then washed in PBS three times and subjected to the determination of fluorescence intensity using a fluorescence multiplate reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using StatView computer software (SAS, Cary, NC), and multiple pairwise comparisons among the sets of data were performed using analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni *t*-test.

RESULTS

We studied the effect of A β 1-40 on lipid metabolism in cultured neurons. We incubated A β 1-40 for 24 hr at 37°C at 350 μ M, followed by filtration through a 0.45- μ M Millipore filter (iA β), and freshly dissolved A β (fresh A β). The characterization of these A β preparations has been reported previously (Michikawa et al., 2001).

Neuron-rich cultures were incubated in a serum-free N2 medium containing iA β at various concentrations for 48 hr at 37°C. The cholesterol content per mg protein of the cultured neurons is shown in Figure 1a, indicating that iA β decreased cellular cholesterol content in a dose-dependent manner. To determine the dose-response curves for the cholesterol release from neurons, cultured neurons were labeled by incubation with 37 kBq/ml [¹⁴C]acetate for 48 hr, washed and then incubated further with iA β at various concentrations for 8 hr. The amounts of cholesterol released are shown in Figure 1b. When we analyzed lipids released from the cells, all the conditioned media of the cultures treated with iA β were examined after filtration through a 0.45- μ m Millipore filter. Saturation of the iA β -mediated cholesterol release was observed at iA β concentrations higher than 1 μ M. For the deter-

mination of the effect of iA β on cholesterol synthesis, the cultured neurons were incubated with 5 μ M iA β for 48 hr, and the incorporation of 2 μ M [¹⁴C]acetate into cholesterol was determined. As shown in Figure 1c, iA β inhibits cholesterol synthesis in a dose-dependent manner.

The time course of the effect of 5 μ M iA β on cellular cholesterol content, cholesterol release, and cholesterol synthesis is shown in Figure 2. Cellular cholesterol content in control cultures increased with culture time, while that in the cultures treated with iA β did not (Fig. 2a). Cholesterol release from cultured neurons into the media in the presence of 5 μ M A β is shown in Figure 2b. The amount of cholesterol released in the presence of A β increased in a time-dependent manner. Cholesterol synthesis, which is expressed as [¹⁴C]acetate incorporation into cholesterol, is shown in Figure 2c. A β significantly decreased the level of cholesterol synthesis. We next examined whether freshly dissolved A β also affects cholesterol metabolism in cultured neurons. As shown in Figure 3a and b, freshly dissolved A β did not reduce cellular cholesterol content or the level of cholesterol synthesis, while iA β at the same protein concentration reduced both.

Since iA β suppressed cholesterol synthesis in neurons, we next examined whether this reduction was due to the reduced levels of the nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs). Figure 3c shows an experiment in which cultured neurons were incubated with 5 μ M iA β for 48 hr. Nuclear extracts and membrane fractions were subjected to electrophoresis and immunoblotted with antibody against the NH₂-terminal segment of SREBP-2, one of the two isoforms of SREBPs. Figure 3c shows that iA β treatment did not alter the amount of mature SREBP-2 in nuclear extracts, or the amount of the SREBP-2 precursor in cell membranes. This finding indicates that iA β affects the cholesterol synthetic pathway at the post-transcriptional site.

To exclude the possibility that the reduced levels of cellular cholesterol and cholesterol synthesis are the results of a general dysfunction of neurons damaged by A β , we determined the effect of A β on protein synthesis in cultured neurons. Under the condition that neurons were incubated with iA β for 48 hr, cellular protein synthesis was evaluated in terms of the uptake of ³⁵S-methionine. As shown in Figure 4a,b, iA β did not reduce ³⁵S-methionine uptake by the cells or its incorporation into TCA-precipitated protein fractions. These data indicate that iA β has a selective effect on cholesterol metabolism. We also examined the effect of iA β on cell viability in cultured neurons. iA β did not have a neurotoxic effect on cultured neurons, as shown by the release of LDH from neurons in the shortest time period of our experiments (Fig. 5a). The nontoxic effect of iA β on cultured neurons was confirmed by means of another assay system, calcein AM staining (Fig. 5b), which is a marker for esterase activity in viable cells. These data indicate that A β used in the present study had no neurotoxic effect during the time course of our experiments. However, the incubation with

iA β at 5 μ M for a long time, more than 7 days in culture, resulted in the increase in the amount of LDH released from neurons (data not shown).

DISCUSSION

In the present study, we found that oligomeric A β reduces cellular cholesterol content in neurons, which is accompanied by reduced levels of cholesterol synthesis and promotion of cholesterol release without influencing protein synthesis or cell viability.

A β used in the present study was incubated, filtered through 0.45- μ m pore-size filters, and did not contain any fibrils or A β -derived diffusible ligands (ADDLs) as described previously (Michikawa et al., 2001). In contrast to iA β , freshly prepared A β did not have any effect on cholesterol metabolism, suggesting that oligomerization of A β is required for the ability to inhibit cholesterol synthesis, promote cholesterol release from the cells, and finally reduce cellular cholesterol content. In accordance with our present results, the interaction of A β with lipids is suggested to be dependent on the aggregation state of A β (Avdulov et al., 1997; Mason et al., 1999). Previous investigations of the effect of A β on cholesterol synthesis revealed a dependence on cell type: A β 1-40 inhibits cholesterol synthesis in HepG2 cells (Koudinova et al., 1996) but slightly increases cholesterol synthesis in rat brain and liver (Koudinova et al., 2000). However, in both cases, the A β used in their study was not characterized in detail. In the present study, we found for the first time that oligomeric A β inhibits cholesterol synthesis in neurons. One possible explanation for the discrepancy in results is that the forms of A β Koudinova et al. used are different from ours; they might have used freshly prepared A β or A β monomers and dimers, while we used an oligomeric one. The finding that freshly dissolved A β does not have an inhibitory effect on cholesterol synthesis (Fig. 3a) supports this notion.

One may say that the inhibitory effect of A β on cholesterol synthesis is due to its toxic effect on neurons, thereby reducing the general activities of the cells. However, 35 S-methionine uptake and its incorporation into proteins in A β -treated neurons showed levels that are similar to or higher than those of controls, indicating that the inhibitory effect of A β on cholesterol synthesis is a specific action. In addition, the fact that iA β has no

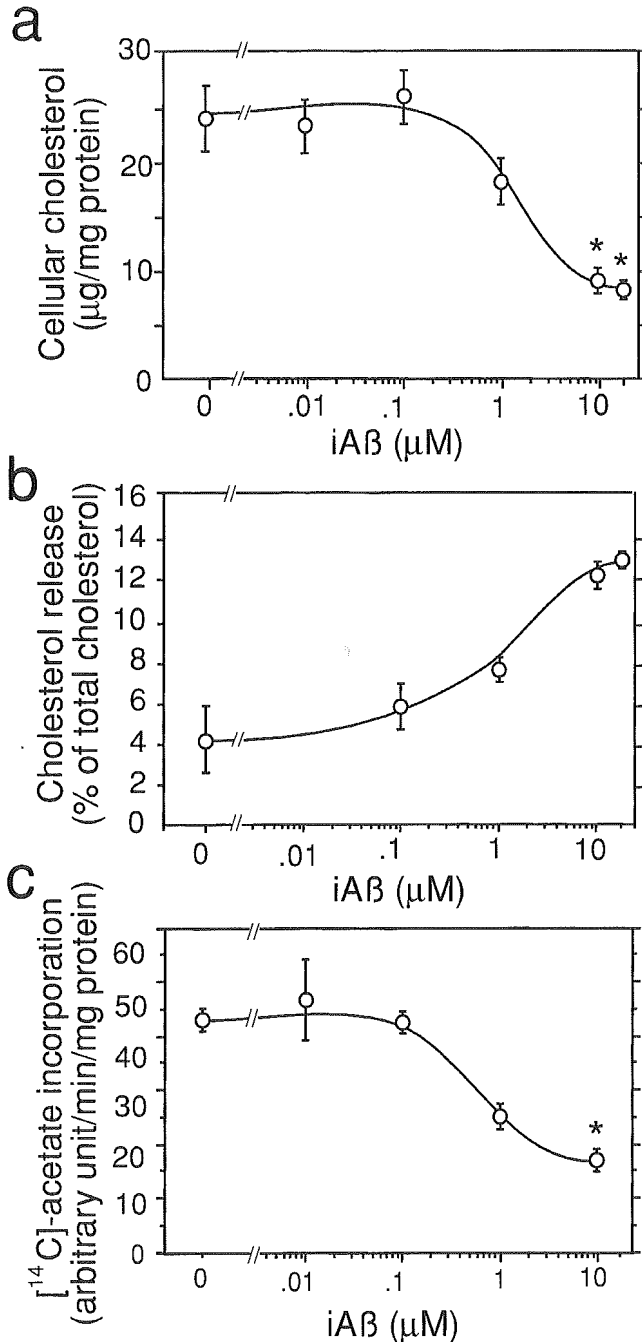


Fig. 1. Effect of filtered amyloid β -protein (iA β)1-40 on cellular cholesterol content, cholesterol release, and cholesterol synthesis. A β 1-40 was prepared as described in Materials and Methods. **a:** Cultured neurons were incubated with iA β at various concentrations for 48 hr. Cellular cholesterol content was determined as described in Materials and Methods. Three independent experiments were performed and similar results were obtained. The data are means \pm S.E. for eight cultures. * $P < 0.005$ vs. cultures at 0 μ M iA β . **b:** Cultured neurons labeled with 37 kBq/ml [14 C]acetate for 48 hr were incubated with iA β at various concentrations. The cultures were then incubated for 8 hr, and the amount of labeled cholesterol released into the media and that remaining in the cells were determined as described in Materials and Methods. Three independent experiments were performed and similar results were obtained. The data are means \pm S.E. for duplicates. **c:** Cultured neurons were incubated with iA β at various concentrations for 48 hr. The cultures were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) three times, followed by incubation with 37 kBq/ml [14 C]acetate for 2 hr. The [14 C]acetate that was incorporated into cells was then quantified as described in Materials and Methods. Three independent experiments were performed and similar results were obtained. The data are means \pm S.E. for triplicates. * $P < 0.003$ vs. cultures at 0 μ M iA β .

cytotoxic effect on our culture system as demonstrated by two independent assay systems, quantification of released LDH and calcein AM staining, excludes the possibility that the reduced levels of cholesterol synthesis are due to the toxic effect of A β .

The molecular mechanism by which A β specifically inhibits cholesterol synthesis remains obscure. The mature forms of SREBPs are necessary for activation of the tran-

scription of multiple genes encoding several enzymes in the cholesterol biosynthetic pathway, including HMG-CoA synthase (Brown and Goldstein, 1997). In various cell types, sterols suppress cleavage of SREBPs at site 1, and this interrupts the transcription of genes for HMG-CoA synthase and genes encoding several other proteins required for cholesterol synthesis and LDL receptor expression. Our study shows that A β inhibits cholesterol synthesis without affecting SREBP-2 processing, suggesting that A β may affect the cholesterol synthetic pathway in a post-transcriptional manner.

It is now evident that there is relationship between cholesterol and AD (Hartmann, 2001; Simons et al., 2001). Several studies have suggested that high levels of serum cholesterol are involved in the formation of AD pathology (Notkola et al., 1998; Wolozin et al., 2000; Launer et al., 2001). A growing body of evidence shows that A β production and secretion are dramatically reduced when cellular cholesterol levels are reduced (Simons et al., 1998; Fassbender et al., 2001). Cholesterol has been shown to modulate the processing of amyloid precursor protein (Simons et al., 1998), α - and β -secretase cleavage (Simons et al., 1998; Fassbender et al., 2001; Kojro et al., 2001). These lines of evidence indicate that lowering cholesterol levels prevents developing AD by reducing A β production and secretion. Recent studies showing a decreased prevalence of AD and dementia associated with the use of statins (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000) support this notion. These findings seem to contradict our present results that oligomeric A β reduces cellular cholesterol levels, which may induce AD-related pathophysiology including promotion of tau phosphorylation (Fan et al., 2001; Sawamura et al., 2001), dendritic damage (Fan et al., 2002), and eventual neuronal death (Michikawa and Yanagisawa, 1999). This discrepancy can be explained by the notion that the involvement of cholesterol in AD

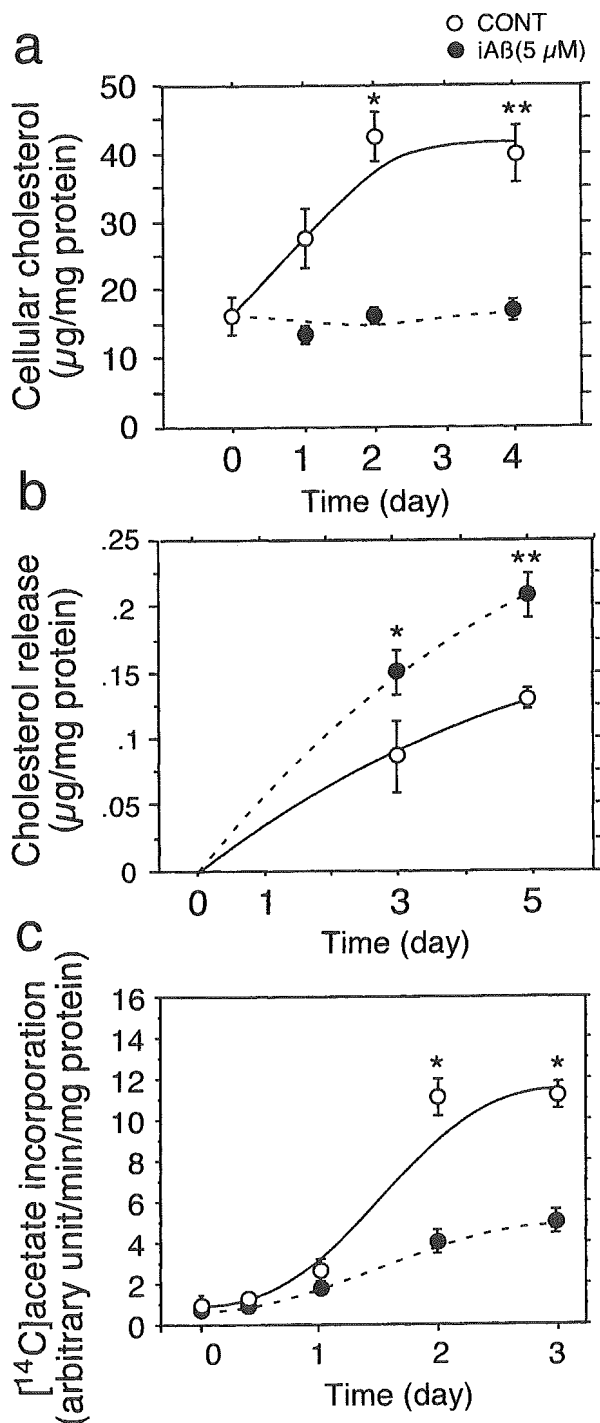


Fig. 2. Time course of cellular cholesterol content, cholesterol release, and cholesterol synthesis in the presence or absence of iA β (5 μ M). **a**: Neuron-rich cultures were maintained in N2 medium in the presence (filled circles) or absence (open circles) of iA β (5 μ M) for 48 hr. The cholesterol content of the cultures was then determined as described in Materials and Methods. Three independent experiments were performed and similar results were obtained. The data are means \pm S.E. for triplicates. * $P < 0.0001$, ** $P < 0.0005$ vs. cultures treated with iA β for 2 and 4 days, respectively. **b**: Cholesterol released into the media of the cultured neurons in the presence (filled circles) or absence (open circles) of iA β (5 μ M) was determined on culture days 3 and 5. The amount of cholesterol released into the media of the cultures treated with iA β was higher than that of the control cultures. The data are means \pm S.E. for triplicates. * $P < 0.03$, ** $P < 0.05$ vs. control cultures. **c**: [14 C]acetate incorporation into cholesterol was determined in the cultured neurons in the presence (filled circles) or absence (open circles) of iA β (5 μ M). The cultured neurons were incubated with or without iA β for 48 hr, followed by incubation with 37 kBq/ml [14 C]acetate for 2 hr. The amount of [14 C]acetate incorporated into cholesterol was determined as described in Materials and Methods. The data are means \pm S.E. for triplicates. * $P < 0.001$ vs. control (CONT) cultures.

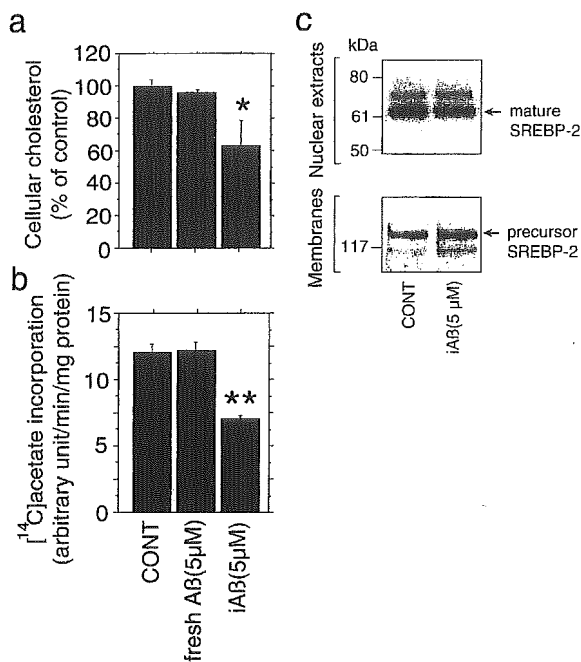


Fig. 3. Freshly prepared A β has no effect on cellular cholesterol metabolism in cultured neurons. Neuron-rich cultures were maintained in N2 medium in the presence of iA β (5 μ M), fresh A β (5 μ M), or absence of A β for 48 hr. Cholesterol content of each culture (a) and the ability of [¹⁴C]acetate incorporation into cholesterol (b) were determined as described in Materials and Methods. The data are means \pm S.E. for triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.0005$ vs. control cultures. c: Cultured cells were incubated in the presence or absence of iA β (5 μ M) for 48 hr in serum-free N2 medium. The nuclear extracts and membrane fractions were prepared as described in Materials and Methods. Each sample was subjected to western blot analysis using anti-sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) antibody.

pathophysiology may be biphasic; in one aspect, the cellular cholesterol level regulates A β generation and secretion, and, in another aspect, once A β oligomers are formed, they could disturb cellular cholesterol metabolism and decrease cellular cholesterol levels, which in turn, may initiate the amyloid cascade leading to hyperphosphorylation of tau and neurodegeneration. This notion is supported by a previous study showing that an elevated serum cholesterol level is a risk for developing AD; however, the serum cholesterol level decreases before AD development (Notkola et al., 1998). In accordance with this notion, exogenous cholesterol addition protects neurons from A β -induced cell toxicity (Yip et al., 2001).

Based on the present results together with our previous findings, we propose the putative role of cholesterol in the amyloid cascade (Fig. 6). Our findings are shown in Figure 6a that oligomeric A β promotes cholesterol release from neurons to generate A β -lipid particles, which are not taken up by neurons (Michikawa et al., 2001), and that it inhibits cholesterol biosynthesis, leading to decreased levels of neuronal cholesterol content, as demonstrated in this study. Further, we and others have shown that alterations in cholesterol

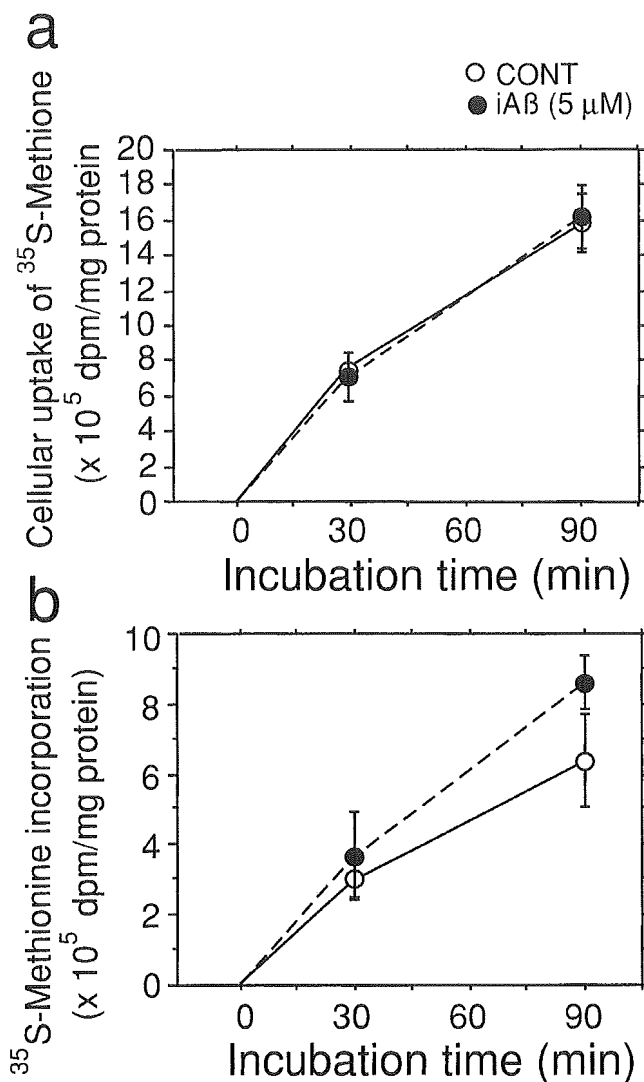


Fig. 4. Effect of iA β on cellular uptake of [³⁵S]methionine and [³⁵S]methionine incorporation into the cellular protein. [³⁵S]methionine (0.9 MBq/ml) in methionine-deficient medium was applied to the neuronal cultures pretreated with iA β (5 μ M) for 48 hr. Cellular uptake of [³⁵S]methionine (a) and [³⁵S]methionine incorporation into the cellular protein (b) at 30 and 120 min were determined as described in Materials and Methods. The data are means \pm S.E. for triplicates.

metabolism promote tau phosphorylation in vitro (Fan et al., 2001) and in vivo (Koudinov and Koudinova, 2001; Sawamura et al., 2001)(Fig. 6b). Additionally, the essential roles of cholesterol in dendrite outgrowth and synaptic plasticity (Mauch et al., 2001; Fan et al., 2002) and maintenance of neuronal viability (Michikawa and Yanagisawa, 1999) have been demonstrated (Fig. 6c, d). Apolipoprotein E (ApoE) may be involved in this cascade by its isoform-dependent difference in the ability to modulate cholesterol metabolism in neurons (Michikawa et al., 2000) (Fig. 6e). These lines of evidence may indicate that oligomeric A β