

Z00500151A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

アルツハイマー病発症の危険因子であるコレステロール代謝関連  
遺伝子の機能解析に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成18 (2006) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告	
アルツハイマー病発症の危険因子であるコレステロール代謝関連遺伝子の機能解析 に関する研究	-----1
道川 誠	
II. 分担研究報告	
1. Apolipoprotein Eのアイソフォーム特異的HDL新生の分子機構に関する研究	-----8
道川 誠	
2. CYP46トランスジェニックマウス作製に関する研究	-----11
藤野貴広	
3. アルツハイマー病脳および髄液サンプルを用いた脂質関連因子の解析	-----14
赤津裕康	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----19

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書  
 厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
 総括研究報告書

脳内コレステロール代謝に関連するApoE, ABCA1, CYP46などの遺伝子多型とアルツハイマー病(AD) 発症との関連が指摘されている。しかし、脳内コレステロール代謝の理解は不十分であり、上記遺伝子産物の脳内における機能も良くわかっていない。本研究班は、危険因子である遺伝子多型の機能を明らかにすることでAD脳におけるコレステロールの病理発症における意義を明らかにすることを目的とする。この研究によって得られた成果は、脳内コレステロール代謝調節法の開発とそれによるアルツハイマー病予防・治療法の開発に生かされることが期待される。

- (I) 道川らの本年度の成果は、(i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いによってHDL新生能の違いが生じること、ApoEによるHDL新生はABCA1を介していること、を明らかにした(論文投稿準備中)。(ii) また海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なること、またその増減による神経細胞の形態・機能への影響が異なることを見出した(Ko et al, *J Biol Chem*, 2005)。(iii)更にコレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導することを見出した(Yu et al, *J Biol Chem*, 2005a; 2005b)。AD脳でもミトコンドリア機能障害が指摘されており、コレステロール代謝変動による神経細胞変性の分子機構として重要であると考えられた。
- (II) 藤野らは、遺伝子多型とADとの関連が指摘されているCYP46のトランスジェニックマウス作製を当面の目標に、マウスCYP46A1のcDNAを単離し、脳神経系で高発現させるためにCYP46A1 cDNAをNSE (Neuron Specific Enolase) プロモーター下流に連結したトランスジェニック (Tg) マウス用のミニゲーンを構築した。Tgマウス作製に先立ち、CYP46A1 Myc-tagの活性の有無を解析し、野生型と同等の活性を有すること、CYP46A1の機能解析を目的に組換えアデノウィルスを作製し、高効率で発現可能であることを確認した。これとは別に、脳神経系で発現するアポEは高度にシアル酸修飾を受け、ヘテロな分子種として存在していることをin vitro及びin vivoで確認した。この糖鎖修飾はイムノプロット及び点突然変異体の解析からアミノ酸289/290/296のThr/Serに付加していることが明らかとなった。また、アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、アポEのシアル酸修飾パターンが日本人と西洋人の間では異なる、又は加齢と共に変化する可能性が示唆された。
- (III)赤津らは、ADの危険因子である各種コレステロール代謝関連因子に関して、ヒトのサンプルを用いて解析を行い、早期診断や予防法の開発に役立てることを目指している。本年度は、主に髄液中のコレステロール解析および脈絡叢凍結サンプルでのプロテオーム解析を行った。その結果、髄液におけるコレステロール解析では疾患群間でのある程度の傾向を得ることができた。脈絡叢プロテオームにおいてはアルツハイマー病および正常加齢各4例での解析を行い、アルツハイマー病群での高発現因子を得た。現在、症例数を増やしての解析を行うとともにこの因子の同定を行なっている。ヒト組織を用いてのコレステロールを中心とした髄液・血液・脳組織での代謝解析を現在進行中であるが、初年度において、複数の候補因子を得ることができた。残る2年間において疾患特異的変動を示す因子を同定し、その臨床応用への可能性を探ることで本事業貢献できると考えている。

#### A. 研究目的

(道川) 本研究班は、ApoE、ABCA1、CYP46などコレステロール代謝関連分子によって担われる脳内コレステロール代謝の主要経路の解明と、コレステロール代謝変動とAD発症との関連の解明を目的とした研究を行う。脳脊髄液中にはHDLのみ存在し、それがシナプス可塑性維持や神経修復に働くこと、

脳内HDL産生には、ApoEおよびABCA1蛋白の関与が想定されることから、具体的には、(1)HDL産生と輸送に果たすApoE、ABCA1の機能とApoEのアイソフォーム依存的なHDL産生の分子機構を明らかにする。さらにHDL-コレステロールによる神経修復作用並びにコレステロールの細胞機能における意義について検討する。

(藤野) 脳神経系は脳血液関門によって体循環系とは隔絶されているため、余剰なコレステロールの排出機構の解明は特に重要である。脳特異的に発現するCYP46A1は脳血液関門を容易に通り返ける24-水酸化コレステロールの生成を触媒し、神経細胞からのコレステロール排出に重要な役割を担っている。一方、アルツハイマー病の危険因子として知られるアポEは神経細胞からのコレステロールの引き抜きにも重要である。本研究では、脳内のコレステロール排出機構の解明を通して、アルツハイマー病の予防と治療の基礎を築くことを目的としている。

(赤津) コレステロール代謝に関与する *apoE*, *ABCA1* および *CYP46* の遺伝子多型がAD発症と強い相関があることが知られている。しかし、脳内コレステロール代謝制御における上記分子の役割の理解、およびAD発症との関連についての知見が不十分である。

この解明に向けて我々は主にヒトサンプルを用いての研究を行う。

## B. 研究方法

(道川) (1) 神経細胞培養は、妊娠17日目のラット大脳皮質ならびに海馬からすでに確立した方法によって準備し、DMEM/F12にN2を含む無血清培地で培養した。これらの細胞に各種 *apoE* 等のアクセプターを投与し培地中へ放出された脂質(コレステロールおよびリン脂質)をキットにより定量した。短時間に放出される脂質の定量に際しては、神経細胞をアイソトープラベルし ( $[^{14}\text{C}]$ acetateで48時間ラベル)、培地中へ放出される脂質は、クロロフォルム:メタノール法によりを抽出し、TLC展開によりコレステロールおよびリン脂質を定量した。また密度勾配法により12のフラクションを得、それぞれに含まれるコレステロールおよびリン脂質を定量し、*apoE*量をウエスタンブロットにより検出定量した。

(2) ヒト *apoE3*, *apoE4*, 変異 *apoE4*, 22 kDa *apoE3*断片, 22 kDa *apoE4*断片のリコンビナント蛋白は、米国ペンシルバニア大学のフィリップ教授より供与を受けた。

(3) NPC1及び野生型マウス脳およびそれらから培養した神経細胞およびアストロサイトを解析に用いた。これら検体について電子顕微鏡解析、ミト

コンドリア機能評価では膜電位依存的な発色をするdyeを用いた。またATPの定量、ATP合成酵素活性を定量した。さらにミトコンドリア膜における脂質解析およびミトコンドリアにおける脂質代謝のプルステイス解析を行った。

(4)形態学的検索は、各種抗体を使った免疫組織染色法で染めた後、レーザー顕微鏡による観察ならに、カールツイアスの解析ソフトによる解析を行った。

(倫理面への配慮) 本研究は、当センターの実験動物倫理委員会の審査ならびに許可を受けて行われた。また、動物を扱う際には、当センターの実験動物委員会の規則に則り、動物愛護に十分に配慮した。

(藤野) マウス脳mRNAを鋳型としてRT-PCR法によりマウスCYP46A1・cDNAを増幅し、更にPCR法によりC末にMyc-tagを挿入した。シーケンスにより配列を確認後、培養細胞用発現ベクター及びアデノウィルスベクターに組み込み、CYP46A1活性を確認した。このcDNAをNSEプロモーター、SV40イントロン配列下流に組み込み、cDNA下流にはSV40ポリA付加配列を連結し、トランスジェニックマウス作成用ミニジーンを構築した。ApoEの糖鎖研究では、ヒトApoE2、E3、E4 cDNAをアデノウィルスベクターに組み込み、ヒト・グリオーマ細胞に感染させる事により、ヒトApoEの大量発現系を確立した。この培養上清から一連のクロマトグラフィー操作により、各ApoEを均一にまで精製した。本精製標品を様々な糖鎖結合特異性を持つシアリダーゼ処理、レクチンブロット法、イムブロット法を用いて結合糖鎖の構造及び結合部位を予測した。この結果を基にApoE・cDNAを鋳型としたPCR法による点突然変異法の導入により、ApoEの主要な糖鎖付加部位を決定した。(倫理面への配慮) 実験動物を用いる実験は、愛媛大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

(赤津) AD脳・髄液サンプルを用いてa) 遺伝子多型解析、b) コレステロール値およびその関連因子の測定、c) 大脳皮質、脈絡叢を用いてプロテオーム解析を行い脂質代謝関連因子のピックアップを行う。

(倫理面への配慮)ヒトサンプルは病理解剖時に、

遺伝子解析も含めての研究利用に供される事が明記してある書面にて遺族より承諾書をとっている。その後の検体はすべて匿名化され、全ての情報は個人情報管理室にて厳重に管理されている。またヒトサンプルを用いての研究は全て福祉村病院倫理委員会の承認を得て行われている。

### C. 研究結果

(道川) 本年度は、(i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いが生じること、ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介していることを明らかにした(論文投稿準備中)。(ii) また海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なること、またその増減による神経細胞の形態・機能への影響が異なることを見出した(Ko et al, *J Biol Chem*, 2005)。コレステロール代謝がAD病理に関連するとすれば、この発見で老人斑および神経原線維変化の形成が部位別に異なるメカニズムを説明できる可能性がある。(iii)更にコレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導することを見出した(Yu et al, *J Biol Chem*, 2005a; 2005b)。AD脳でもミトコンドリア機能障害が指摘されており、コレステロール代謝変動による神経細胞変性の分子機構として重要であると考えられた。

(藤野) マウス脳mRNAを鋳型としてRT-PCR法によりマウスCYP46A1・cDNAを増幅し、更にC末にMyc-tagを挿入した。シーケンスにより配列を確認後、培養細胞用発現ベクターに組み込み、COS細胞に導入した所、野生型と同レベルのCYP46A1活性を確認した。このcDNAをNSEプロモーター下流に連結したトランスジェニック(Tg)マウス用のミニジーンを構築した。Tgマウスは現在作成中である。さらに、CYP46A1の機能をin vitroで解析する目的で組換えアデノウィルスを作製し、高効率で発現可能であることを確認した。

ヒト・ApoE2、E3又はE4のcDNAを組み込んだアデノウィルスを用いることにより、グリオーマ細胞系においてApoEを大量発現した。複数の分子種として得られたApoEが糖鎖修飾の違いによるものであることを明らかにする目的で、様々な糖鎖切断酵素を作用させた。ノイラミニダーゼ処理によって、ApoEが単一バンドとして観察され

た。この糖鎖がApoEのどの部位に結合しているのかを解析するために、ApoEの様々な部位をエピトープとするモノクローナル抗体によるイムノプロテイングを行った。C末端付近をエピトープとする9H7で他の抗体とは異なる反応性が認められ、ノイラミニダーゼ及びO-グリカナーゼ処理によって、その反応性は減弱した。また、シアリダーゼ処理により、ピーナッツレクチン(PNA)に対する反応性の上昇が観察され、これはO-グリカナーゼ処理によって減弱した。ApoEのC末端付近には4箇所のSer/Thrが存在することから、それぞれのアミノ酸をAlaに変異したApoEの発現を行った。ApoE・Ser296Alaの発現では最も低分子量に確認されるApoEが消失し、全て高分子量側にシフトした。一方、ApoE・Ser/Thr289/290Ala/Alaでは、低分子量側にシフトし、ほぼ単一バンドとして観察された。また、部位特異的なノイラミニダーゼを用いた糖鎖構造の解析から、ApoEに付加する糖鎖構造はNeuAca2? 3Galβ1? 3 ( ( NeuAca2? 8 ) n NeuAca2? 6 ) GalNAca1? Ser/Thrであることが推定された。

アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるApoE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。

(赤津) 発現遺伝子・蛋白解析をヒトサンプルを用いて解析した。

(a) 遺伝子多型解析はApoE genotypingをルーチンに行い、他施設との共同研究で脂質代謝関連因子の多型解析も進めている。ApoEに関しては従来の報告どおり、ADではtype 4がリスクであるほか、アミロイドアンギオパチー、レビー小体病においてもリスクである点が明らかとなった。

(b) 臨床検体でのコレステロール値測定では、600例の血液サンプルの測定と内服状況が終了したが、まだ未解析の状況である。髄液サンプルは生前採取50例に関して測定を行いADおよび前頭側頭型認知症においてコレステロール値が増加傾向を見出す事ができた。

死後脳室および腰椎採取髄液は現在測定継続中である。

(c) 大脳皮質、脈絡叢を用いてプロテオーム解析脳実質でのプロテオーム解析においてAD、DLBでの解析を共同研究で行い増加および減少スポッ

トを検出し同定中である。脈絡叢解析においてはAD特異的に上昇している4スポットを捉える事ができた。

リン酸化酵素発現解析はカナダのベンチャー企業と網羅的リン酸化酵素arrayを展開しておりAD脳における発現解析は終了したが、その病態に対する意義に関しては検討中である。

#### D. 考察

(道川) (i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いが生じること、ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介していることを明らかにした。これらの結果は、ApoE4の劣った作用を補うには、ApoE4の発現それ自体を増強させる方法と、その構造を変えるような薬剤を使う可能性、ならびにApoE3を脳に送り込んで発現させる方法などが理論としては、考えうることを示唆している。しかし、ApoEの発現増強は、Abの沈着を促進してしまう可能性などがあり、また構造を変える薬剤の開発には多くの困難が伴うと予想される。こうしたApoE側からのアプローチに対して、細胞側からのアプローチとして、今回の結果は、ABCA1の発現調節による脳内HDL新生の増強の可能性を示している点が重要である。ABCA1は、核内レセプターであるLXRやRXRなどによって発現制御されることが明らかになってきており、所謂HDL療法としての可能性を示せた点で予防・治療法は開発につながる結果であると考えられる。(ii) また海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なること、またその増減による神経細胞の形態・機能への影響が異なることを見出した(Ko et al, *J Biol Chem*, 2005)。コレステロール代謝がAD病理に関連するとすれば、この発見で老人班および神経原線維変化の形成が部位別に異なるメカニズムを説明できる可能性がある。また、コレステロール代謝変動の影響が、神経細胞別に、また脳の部位別に異なることが考えられ、アルツハイマー病病理発現抑制の観点からもこうした視点は今後重要になると予想される。(iii)最後に、コレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導することを見出した(Yu et al, *J Biol Chem*, 2005a; 2005b)。AD脳でもミトコンドリア機能障害が指摘されており、コレステロール代謝変動による神経細胞変性の分子機構として重要であると考えられた。アルツハイマー病の予防・治療を考える際にも、ミトコンドリア機能障害の観点を

加味する必要があるとともに、ミトコンドリア膜のコレステロール代謝制御による神経細胞変性の予防という戦略が考えられる。

(藤野) C末にMyc-tagを挿入したマウスCYP46A1・cDNAを発現ベクターに組み込み、COS細胞にてCYP46A1活性を確認したが、その活性は非常に低いものであった。一方、組換えアデノウィルスを用いてCHO細胞に発現させた場合、COS細胞と比較して非常に高い活性が得られた。しかし、ウェスタンブロット法での発現タンパク量の比較では極端な違いは見いだせず、細胞の種類によっては活性発現に顕著な差があることが示唆された。また、CYP46A1・組換えアデノウィルスの作製において、通常型ベクターでは全く作製することが出来なかったため、Cre-loxPシステムが組み込まれたベクターを用いた。この結果は、CYP46A1の発現が細胞にとって強い毒性を持つことを示唆した。もしかすると、この毒性のためTgマウスが得られない可能性が考えられた。

アデノウィルスによって発現したApoEは脳脊髄液中のものと同様にシアル酸による修飾を受け、複数の分子種として分泌されることが明らかとなった。このApoEはノイラミニダーゼ処理によって単一バンドとして観察されることから、複数の分子種として検出されるApoEはシアル酸修飾の違いであることが明らかとなった。更にウェスタンブロット及びレクチンブロットにより、ApoEのC末端側に3GalNAc1? Ser/Thrを基本骨格に持つムチン型糖鎖が結合していることが示唆された。ApoE・C末端付近のSer/ThrをAlaに変異したApoEの発現実験及びレクチンブロットの結果から、主要な糖鎖付加部位はThr289、Ser290、Ser296であると結論された。また、部位特異的なノイラミニダーゼを用いた糖鎖構造の解析からの糖鎖構造はNeuAca2? 3Galβ1? 3 ( ( NeuAca2? 8 ) n NeuAca2? 6 ) GalNAc1? Ser/Thrであることが推定された。

アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、アポEのシアル酸修飾パターンが日本人と西洋人の間では異なる、又は加齢と共に変化する可能性が示唆された。

(赤津) 脂質代謝がAD発症に関与している可能性

がある知見がヒトサンプルにおいても集積しつつあり、脂質代謝機構の中核における解明がADの病態理解には重要な鍵となると考えられる。

#### E. 結論

(道川)

- (i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いを生じさせる。
- (ii) ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介している。
- (iii) 海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なり、コレステロール濃度の増減が神経細胞の形態・機能に与える影響が神経細胞別に異なる。
- (iv) コレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導する

(藤野)

- (i) C末にMyc-tagを挿入したマウスCYP46A1の活性の有無を解析し、野生型と同等の活性を有することを確認した。さらに、CYP46A1・組換えアデノウイルスを作製し、高効率で発現可能であることを確認した。
- (ii) 脳神経系で発現するアポEは高度にシアル酸修飾を受け、ヘテロな分子種として存在していることをin vitro及びin vivoで確認した。この糖鎖修飾はイムノプロット及び点突然変異体の解析からアミノ酸289/290/296のThr/Serに付加していることが明らかとなった。また、アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、アポEのシアル酸修飾パターンが日本人と西洋人の間では異なる、又は加齢と共に変化する可能性が示唆された。

(赤津)

現在進行中のプロジェクトをさらに推し進め、脳組織、脈絡叢、髄液、血液での脂質代謝関連因子の検索を行い、トータルにその機構解明を行うことでAD発症の手がかりを得られるものと確証している。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong JS, Yanagisawa K, and Michikawa M

Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons.

**J. Biol. Chem., in press**

- (2) Yu W, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M. Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: Implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy. **J. Biol. Chem., 280: 27296-27302, 2005.**
- (3) Yu W, Gong J-S, Ko M, Garver W. S., Yanagisawa K, and Michikawa M. Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick Type C1 mouse brain affects mitochondria function. **J. Biol. Chem., 280(12): 11731-11739, 2005.**
- (4) Yu W, Zou K, Gong JS, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M. Oligomerization of amyloid  $\beta$ -protein occurs during the isolation of lipid rafts. **J. Neurosci. Res., 80: 114-119, 2005.**
- (5) Kim MJ, Kim J, Michikawa M, Cha CI, Lee B. Substance P immunoreactive cell reductions in cerebral cortex of Niemann-Pick disease type C mouse. **Brain Res., 1043(1-2): 218-224, 2005.**
- (6) Yang SR, Kim SJ, Byun KH, Hutchinson B, Lee HH, Michikawa M, Lee YS, Kang KS. NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38MAP kinase signaling. **Stem Cells, in press, 2005.**
- (7) Iwasaki T., Takahashi S., Takahashi M., Zenimaru Y., Kujiraoka T., Ishihara M., Nagano M., Suzuki J., Miyamori I., Naiki H., Sakai J., Fujino T., Norman E. Miller N. E., Yamamoto T. T. and Hattori H.. Deficiency of the very low-density lipoprotein (vldl) receptors in streptozotocin-induced diabetic rats: insulin-dependency of the vldl receptor. **Endocrinology 146, 3286-3294, 2005**
- (8) Taguchi K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T

- Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease.  
**Ann Neurol.** Apr;57(4):585-8.2005
- (9) Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.  
Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease.  
**J Neurol Sci.** 238, 53-57, 2005
- (10) Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial migration through extracellular matrix.  
**Biochem Biophys Res Commun.** 23;335(2):631-6.2005
- (11) Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H  
Non-uniformity in the regional pattern of Lewy pathology in brains of dementia with Lewy bodies.; **Neuropathology.**25, 188-194.2005
- (12) Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y.  
Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease.  
**J Neurosci.**23;25(47):10857-62. 2005
- (13) Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K.  
Depletion of cholinergic neurons in the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies.  
**Acta Neurophathol.** In press 2005
- (14) Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K.  
Variations in the BDNF Gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies in Japan.  
**Dement Geriatr Cogn Disord.** In press. 2006
- (1) 赤津裕康, 磯島大輔、桑野良三、山本孝之、小阪憲司  
脳水腫と脳梗塞を併発し非特異的的老人斑を伴ったアルツハイマー病の1例  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (2) 都甲崇、勝瀬大海、塩崎一昌、井関栄三、秋山治彦、土谷邦秋、磯島大輔、赤津裕康、鈴木京子、de Silva Rohan、Lees Andrew、小阪憲司、平安良男  
4-repeat tauopathiesにおけるpretanglesの検討  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (3) 藤城弘樹、梅垣宏行、赤津裕康、磯島大輔、井口昭久、小阪憲司  
レビー小体型痴呆における中隔核の免疫組織学的検討  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (4) 堀本佳彦、松本光弘、赤津裕康、小阪憲司、山本孝之、小島章弘、吉田眞理、橋詰良夫  
Machado-Joseph病におけるMRI所見と病理所見の対比  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (5) 赤津裕康、岡田秀親、山本孝之、橋本歩美、岡崎三代、小山典久、横山信治  
ゲルろ過HPLC法による亜急性硬化性全脳炎(SSPE)患者の脳室液蛋白室およびリポ蛋白解析.第9回日本神経ウイルス研究会2005.6.9-11
- (6) 赤津裕康、道川誠、山田達夫、岡田秀親、山本孝之、伊藤仁一、横山信二  
アルツハイマー病を中心とした髄液中コレステロールの解析  
第24回日本痴呆学会、2005.9.30-10.1
- (7) 赤津裕康、堀本佳彦、中畑英樹、佐藤知雄、小橋修、岡田秀親、山本孝之、小阪憲司、橋詰良夫  
特異な臨床徴候を呈した長期画像フォローを所得た進行性核上性麻痺の1剖検例  
第33回臨床神経病理懇話会 2005.11.26-27
- (8) 梅津正博、石井俊、水上勝義、片桐拓也、内田和彦、朝田隆、小阪憲司、赤津裕康  
アルツハイマー病患者における脈絡叢のプロテオーム解析

## 2. 学会発表



第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7-10  
(9) 石井俊、片桐拓也、水上勝義、赤津裕康、小阪憲司、朝田隆、内田和彦  
アルツハイマー病、レビー小体型痴呆症および統合失調症患者剖検脳を用いたプロテオーム比較解析

第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7-10

(10) 道川 誠

アルツハイマー病モデル動物：病態解明と治療効果判定における有用性と限界、  
第24回神経組織培養研究会シンポジウム、2006年3月11日、東京。

(11)道川 誠

アルツハイマー病の予防・治療法開発に向けて：アルツハイマー病発症機構とコレステロール代謝。  
日本農芸化学会年会シンポジウム、2006年3月28日、京都。

(12)道川 誠、ウ 文新、高 美姫、柳澤勝彦  
Niemann-Pick C1病の原因遺伝子NPC1ヘテロ接合体マウスにおける加齢依存的タウオパチーの発症

日本認知症学会、2005年9月30日~10月1日、大阪

(13) 赤津裕康、道川 誠、山田達夫、岡田秀親、山本孝之、伊藤仁一、横山信治  
アルツハイマー病を中心とした髄液中コレステロールの解析

日本認知症学会、2005年9月30日~10月1日、大阪

(14)道川 誠、ウ 文新、キョウ建生、高 美姫、柳澤勝彦

コレステロール代謝変動に起因するミトコンドリア機能障害と神経細胞変性過程

日本認知症学会、2005年9月30日~10月1日、大阪

(15)Michikawa, Makoto

Cholesterol and Alzheimer's disease:  
Apolipoprotein E-mediated cholesterol metabolism in the central nervous system.  
日本神経化学会年会シンポジウム、2005年9月28日、福岡。

(16)道川 誠、ウ 文新、キョウ建生、高 美姫、柳澤勝彦

Altered cholesterol metabolism in Neimann-Pick type C1 mouse brains induces mitochondrial

dysfunction.

日本神経化学会年会、2005年9月28日、福岡

(17)道川 誠、キョウ建生、斎藤博幸、ゾウケン、ウ 文新、高 美姫、ルンドカツジセル、フィリップ ミッシェル、柳澤勝彦

A mechanism underlying apolipoprotein E-isoform-specific induction of lipid efflux from neurons.

日本神経化学会年会、2005年9月28日、福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担）研究報告書

分担研究者 道川 誠 国立長寿医療センター研究所 アルツハイマー病研究部部長

脳内コレステロール代謝に関連するApoE, ABCA1, CYP46などの遺伝子多型とアルツハイマー病(AD) 発症との関連が指摘されている。しかし、脳内コレステロール代謝の理解は不十分であり、上記遺伝子産物の脳内における機能も良くわかっていない。本研究班は、主として脳内コレステロール代謝制御に関与する上記遺伝子産物の機能を明らかにし、AD発症との関連を解明することを目指す。本年度は、(i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いが生じること、ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介していることを明らかにした(論文投稿準備中)。(ii) また海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なること、またその増減による神経細胞の形態・機能への影響が異なることを見出した(Ko et al, *J Biol Chem*, 2005)。コレステロール代謝がAD病理に関連するとすれば、この発見で老人斑および神経原線維変化の形成が部位別に異なるメカニズムを説明できる可能性がある。(iii)更にコレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導することを見出した(Yu et al, *J Biol Chem*, 2005a; 2005b)。AD脳でもミトコンドリア機能障害が指摘されており、コレステロール代謝変動による神経細胞変性の分子機構として重要であると考えられた。

#### D. 研究目的

本研究班は、ApoE、ABCA1、CYP46などコレステロール代謝関連分子によって担われる脳内コレステロール代謝の主要経路の解明と、コレステロール代謝変動とAD発症との関連の解明を目的とした研究を行う。脳脊髄液中にはHDLのみ存在し、それがシナプス可塑性維持や神経修復に働くこと、脳内HDL産生には、ApoEおよびABCA1蛋白の関与が想定されることから、具体的には、(1)HDL産生と輸送に果たすApoE、ABCA1の機能とApoEのアイソフォーム依存的なHDL産生の分子機構を明らかにする。さらにHDL-コレステロールによる神経修復作用並びにコレステロールの細胞機能における意義について検討する。

B. 研究方法：(1) 神経細胞培養は、妊娠17日目のラット大脳皮質ならびに海馬からすでに確立した方法によって準備し、DMEM/F12にN2を含む無血清培地で培養した。これらの細胞に各種apoE等のアクセプターを投与し培地中へ放出された脂質（コレステロールおよびリン脂質）をキットにより定量した。短時間に放出される脂質の定量に際しては、神経細胞をアイソトープラベルシ（ $[^{14}\text{C}]$ acetateで48時間ラベル）、培地中へ放出される脂質は、クロロフォルム：メタノール法によりを抽出し、TLC展開によりコレステロールおよびリン脂質を定量した。

また密度勾配法により12のフラクションを得、それぞれに含まれるコレステロールおよびリン脂質を定量し、apoE量をウエスタンブロットにより検出定量した。

(2) ヒトapoE3, apoE4, 変異apoE4、22 kDa apoE3断片、22 kDa apoE4断片のリコンビナント蛋白は、米国ペンシルバニア大学のフィリップ教授より供与を受けた。

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

(4)形態学的検索は、各種抗体を使った免疫組織染色法で染めた後、レーザー顕微鏡による観察ならに、カールツィアスの解析ソフトによる解析を行った。

(倫理審査) 本研究は、当センターの実験動物倫理委員会の審査ならびに許可を受けて行われた。また、動物を扱う際には、当センターの実験動物委員会の規則に則り、動物愛護に十分に配慮した。

### C. 結果

本年度は、(i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いが生じること、ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介していることを明らかにした(論文投稿準備中)。(ii) また海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なること、またその増減による神経細胞の形態・機能への影響が異なることを見出した(Ko et al, *J Biol Chem*, 2005)。コレステロール代謝がAD病理に関連するとすれば、この発見で老人班および神経原線維変化の形成が部位別に異なるメカニズムを説明できる可能性がある。(iii)更にコレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導することを見出した(Yu et al, *J Biol Chem*, 2005a; 2005b)。AD脳でもミトコンドリア機能障害が指摘されており、コレステロール代謝変動による神経細胞変性の分子機構として重要であると考えられた。

### D. 考察

本年度は、(i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いが生じること、ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介していることを明らかにした(論文投稿準備中)。これらの結果は、ApoE4の劣った作用を補うには、ApoE4の発現それ自体を増強させる方法と、その構造を変えるような薬剤を使う可能性、ならびにApoE3を脳に送り込んで発現させる方法などが理論としては、考えることを示唆している。しかし、ApoEの発現増強は、Abの沈着を促進してしまう可能性などがあり、また構造を変える薬剤の開発には多くの困難が伴うと予想される。こうしたApoE側からのアプローチに対して、細胞側からのアプローチとして、今回の結果は、ABCA1の発現調節による脳内HDL新生の増強の可能性を示している点が重要である。ABCA1は、核内レセプターであるLXRやRXRなどによって発現制御されることが明らかになってきており、所謂HDL療法としての可能性を示せた点で予防・治療法は開発につながる結果であると考えられる。(ii) また海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なること、またその増減による神経細胞の形態・機能への影響が異なることを見出した(Ko et al, *J Biol Chem*, 2005)。コレステロール代謝がAD病理に関連するとすれば、この発見で老人班および神経原線維変化の形成が部位別に異なるメカニズムを説明できる可能性がある。また、コレステロール代謝変動の

影響が、神経細胞別に、また脳の部位別に異なることが考えられ、アルツハイマー病病理発現抑制の観点からもこうした視点は今後重要になると予想される。(iii)最後に、コレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導することを見出した(Yu et al, *J Biol Chem*, 2005a; 2005b)。AD脳でもミトコンドリア機能障害が指摘されており、コレステロール代謝変動による神経細胞変性の分子機構として重要であると考えられた。アルツハイマー病の予防・治療を考える際にも、ミトコンドリア機能障害の観点を加味する必要があるとともに、ミトコンドリア膜のコレステロール代謝制御による神経細胞変性の予防という戦略が考えられる。

### E. 結論

- (i) ApoE3とApoE4の3次元構造の違いがHDL新生能の違いを生じさせる。
- (ii) ApoEによるHDL新生は、ABCA1を介している。
- (iii) 海馬と大脳皮質神経細胞では、コレステロール濃度が異なり、コレステロール濃度の増減が神経細胞の形態・機能に与える影響が神経細胞別に異なる。
- (iv) コレステロール代謝変動が神経細胞のミトコンドリア機能障害を誘導する

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong JS, Yanagisawa K, and Michikawa M. Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, in press.
- (2) Yu W, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M. Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: Implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy. *J. Biol. Chem.*, 280: 27296-27302, 2005.
- (3) Yu W, Gong J-S, Ko M, Garver W. S., Yanagisawa K, and Michikawa M. Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick Type C1 mouse brain affects mitochondria

function.

**J. Biol. Chem., 280(12): 11731-11739, 2005.**

- (4) Yu W, Zou K, Gong JS, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M.

Oligomerization of amyloid  $\beta$ -protein occurs during the isolation of lipid rafts.

**J. Neurosci. Res., 80: 114-119, 2005.**

- (5) Kim MJ, Kim J, Michikawa M, Cha CI, Lee B. Substance P immunoreactive cell reductions in cerebral cortex of Niemann-Pick disease type C mouse.

**Brain Res., 1043(1-2): 218-224, 2005.**

- (6) Yang SR, Kim SJ, Byun KH, Hutchinson B, Lee HH, Michikawa M, Lee YS, Kang KS. NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38MAP kinase signaling.

**Stem Cells, in press, 2005.**

## 2. 学会発表

- (1) 道川 誠

アルツハイマー病モデル動物：病態解明と治療効果判定における有用性と限界、

第24回神経組織培養研究会シンポジウム、2006年3月11日、東京。

- (2) 道川 誠

アルツハイマー病の予防・治療法開発に向けて：アルツハイマー病発症機構とコレステロール代謝。

日本農芸化学会年会シンポジウム、2006年3月28日、京都。

- (3) 道川 誠、ウ 文新、高 美姫、柳澤勝彦  
Niemann-Pick C1病の原因遺伝子NPC1ヘテロ接合体マウスにおける加齢依存的タウオパチーの発症

日本認知症学会、2005年9月30日~10月1日、大阪

- (4) 赤津裕康、道川 誠、山田達夫、岡田秀親、山本孝之、伊藤仁一、横山信治

アルツハイマー病を中心とした髄液中コレステ

ロールの解析

日本認知症学会、2005年9月30日~10月1日、大阪

- (5) 道川 誠、ウ 文新、キョウ建生、高 美姫、柳澤勝彦

コレステロール代謝変動に起因するミトコンドリア機能障害と神経細胞変性過程

日本認知症学会、2005年9月30日~10月1日、大阪

- (6) Michikawa, Makoto

Cholesterol and Alzheimer's disease:

Apolipoprotein E-mediated cholesterol metabolism in the central nervous system.

日本神経化学会年会シンポジウム、2005年9月28日、福岡。

- (7) 道川 誠、ウ 文新、キョウ建生、高 美姫、柳澤勝彦

Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains induces mitochondrial dysfunction.

日本神経化学会年会、2005年9月28日、福岡

- (8) 道川 誠、キョウ建生、斎藤博幸、ゾウクン、ウ 文新、高 美姫、ルンドカツジセル、フィリップ ミッセル、柳澤勝彦

A mechanism underlying apolipoprotein E-isoform-specific induction of lipid efflux from neurons.

日本神経化学会年会、2005年9月28日、福岡

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

アルツハイマー病発症の危険因子であるコレステロール代謝関連遺伝子の機能解析

分担研究者 藤野貴広 愛媛大学・総合科学研究支援センター 助教授

研究要旨：マウスCYP46A1のcDNAを単離し、脳神経系で高発現させるためにCYP46A1 cDNAをNSE (Neuron Specific Enolase) プロモーター下流に連結したトランスジェニック (Tg) マウス用のミニジーンを構築した。Tgマウス作製に先立ち、CYP46A1 Myc-tagの活性の有無を解析し、野生型と同等の活性を有することを確認した。Tgマウスは現在作成中である。さらに、CYP46A1の機能をin vitroで解析する目的で組換えアデノウィルスを作製し、高効率で発現可能であることを確認した。脳神経系で発現するアポEは高度にシアル酸修飾を受け、ヘテロな分子種として存在していることをin vitro及びin vivoで確認した。この糖鎖修飾はイムノプロット及び点突然変異体の解析からアミノ酸289/290/296のThr/Serに付加していることが明らかとなった。また、アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、アポEのシアル酸修飾パターンが日本人と西洋人の間では異なる、又は加齢と共に変化する可能性が示唆された。

A. 研究目的

脳神経系は脳血液関門によって体循環系とは隔絶されているため、余剰なコレステロールの排出機構の解明は特に重要である。脳特異的に発現するCYP46A1は脳血液関門を容易に通り返ける24-水酸化コレステロールの生成を触媒し、神経細胞からのコレステロール排出に重要な役割を担っている。一方、アルツハイマー病の危険因子として知られるアポEは神経細胞からのコレステロールの引き抜きにも重要である。本研究では、脳内のコレステロール排出機構の解明を通して、アルツハイマー病の予防と治療の基礎を築くことを目的としている。

B. 研究方法

マウス脳mRNAを鋳型としてRT-PCR法によりマウスCYP46A1・cDNAを増幅し、更にPCR法によりC末にMyc-tagを挿入した。シーケンスにより配列を確認後、培養細胞用発現ベクター及びアデノウィルスベクターに組み込み、CYP46A1活性を確認した。このcDNAをNSEプロモーター、SV40イントロン配列下流に組み込み、cDNA下流にはSV40ポリA付加配列を連結し、トランスジェニックマウス作成用ミニジーンを構築した。

ヒトApoE2、E3、E4 cDNAをアデノウィルスベクターに組み込み、ヒト・グリオーマ細胞に感染させる事により、ヒトApoEの大量発現系を確立した。この培養上清から一連のクロマトグラフィー操作によ

り、各ApoEを均一にまで精製した。本精製標品を様々な糖鎖結合特異性を持つシアリダーゼ処理、レクチンプロット法、イムノプロット法を用いて結合糖鎖の構造及び結合部位を予測した。この結果を基にApoE・cDNAを鋳型としたPCR法による点突然変異法の導入により、ApoEの主要な糖鎖付加部位を決定した。

（倫理面への配慮）

実験動物を用いる実験は、愛媛大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。

C. 研究結果

マウス脳mRNAを鋳型としてRT-PCR法によりマウスCYP46A1・cDNAを増幅し、更にC末にMyc-tagを挿入した。シーケンスにより配列を確認後、培養細胞用発現ベクターに組み込み、COS細胞に導入した所、野生型と同レベルのCYP46A1活性を確認した。このcDNAをNSEプロモーター下流に連結したトランスジェニック (Tg) マウス用のミニジーンを構築した。Tgマウスは現在作成中である。さらに、CYP46A1の機能をin vitroで解析する目的で組換えアデノウィルスを作製し、高効率で発現可能であることを確認した。

ヒト・ApoE2、E3又はE4のcDNAを組み込んだアデノウィルスを用いることにより、グリオーマ細胞系においてApoEを大量発現した。複数の分子種として得られたApoEが糖鎖修飾の違いによるもので

あることを明らかにする目的で、様々な糖鎖切断酵素を作用させた。ノイラミニダーゼ処理によって、ApoEが単一バンドとして観察された。この糖鎖がApoEのどの部位に結合しているのかを解析するために、ApoEの様々な部位をエピトープとするモノクローナル抗体によるイムノプロテイングを行った。C末端付近をエピトープとする9H7で他の抗体とは異なる反応性が認められ、ノイラミニダーゼ及びO-グリカナーゼ処理によって、その反応性は減弱した。また、シアリダーゼ処理により、ピーナツレクチン (PNA) に対する反応性の上昇が観察され、これはO-グリカナーゼ処理によって減弱した。ApoEのC末端付近には4箇所のSer/Thrが存在することから、それぞれのアミノ酸をAlaに変異したApoEの発現を行った。ApoE・Ser296Alaの発現では最も低分子量に確認されるApoEが消失し、全て高分子量側にシフトした。一方、ApoE・Ser/Thr289/290Ala/Alaでは、低分子量側にシフトし、ほぼ単一バンドとして観察された。また、部位特異的なノイラミニダーゼを用いた糖鎖構造の解析から、ApoEに付加する糖鎖構造はNeuAca2? 3Galβ1? 3 ( (NeuAca2? 8) n NeuAca2? 6) GalNAca1? Ser/Thrであることが推定された。

アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。

#### D. 考察

C末にMyc-tagを挿入したマウスCYP46A1・cDNAを発現ベクターに組み込み、COS細胞にてCYP46A1活性を確認したが、その活性は非常に低いものであった。一方、組換えアデノウィルスを用いてCHO細胞に発現させた場合、COS細胞と比較して非常に高い活性が得られた。しかし、ウェスタンブロット法での発現タンパク量の比較では極端な違いは見いだせず、細胞の種類によっては活性発現に顕著な差があることが示唆された。また、CYP46A1・組換えアデノウィルスの作製において、通常型ベクターでは全く作製することが出来なかったため、Cre-loxPシステムが組み込まれたベクターを用いた。この結果は、CYP46A1の発現が細胞にとって強い毒性を持つことを示唆した。もしかすると、この毒性のためTgマウスが得られない可能性が考えられた。

アデノウィルスによって発現したApoEは脳脊髄

液中のものと同様にシアル酸による修飾を受け、複数の分子種として分泌されることが明らかとなった。このApoEはノイラミニダーゼ処理によって単一バンドとして観察されることから、複数の分子種として検出されるApoEはシアル酸修飾の違いであることが明らかとなった。更にウェスタンブロット及びレクチンブロットにより、ApoEのC末端側に3GalNAca1? Ser/Thrを基本骨格に持つムチン型糖鎖が結合していることが示唆された。ApoE・C末端付近のSer/ThrをAlaに変異したApoEの発現実験及びレクチンブロットの結果から、主要な糖鎖付加部位はThr289、Ser290、Ser296であると結論された。また、部位特異的なノイラミニダーゼを用いた糖鎖構造の解析からの糖鎖構造はNeuAca2? 3Galβ1? 3 ( (NeuAca2? 8) n NeuAca2? 6) GalNAca1? Ser/Thrであることが推定された。

アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、アポEのシアル酸修飾パターンが日本人と西洋人の間では異なる、又は加齢と共に変化する可能性が示唆された。

#### (9) 結論

C末にMyc-tagを挿入したマウスCYP46A1の活性の有無を解析し、野生型と同等の活性を有することを確認した。さらに、CYP46A1・組換えアデノウィルスを作製し、高効率で発現可能であることを確認した。

脳神経系で発現するアポEは高度にシアル酸修飾を受け、ヘテロな分子種として存在していることをin vitro及びin vivoで確認した。この糖鎖修飾はイムノプロット及び点突然変異体の解析からアミノ酸289/290/296のThr/Serに付加していることが明らかとなった。また、アルツハイマー病患者と健常者の脳脊髄液中におけるアポE糖鎖修飾について解析したが、両者に顕著な差は認められなかった。しかし、アポEのシアル酸修飾パターンが日本人と西洋人の間では異なる、又は加齢と共に変化する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Iwasaki T., Takahashi S., Takahashi M., Zenimaru Y., Kujiraoka T., Ishihara M., Nagano M., Suzuki J., Miyamori I., Naiki H., Sakai J., Fujino T., Norman E. Miller N. E., Yamamoto T. T. and Hattori H..  
Deficiency of the very low-density lipoprotein (vldl) receptors in streptozotocin-induced diabetic rats: insulin-dependency of the vldl receptor.  
**Endocrinology 146, 3286-3294, 2005**

### 2. 学会発表

#### (1) 藤野貴広

糖及び脂質代謝におけるLDL受容体類似タンパク質5 (LRP5) の機能  
第37回 日本動脈硬化学会総会シンポジウム  
2005年7月15日、東京

#### (2) 藤野貴広

脳におけるアポEの糖鎖修飾とその機能  
日本農芸化学会2006年度大会  
2006年3月26日、京都

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得  
なし

実用新案登録  
なし

## 研究要旨

目的：アルツハイマー病発症の危険因子であるコレステロール代謝関連因子に関して、ヒトのサンプルを用いて解析を行う。

方法：主に髄液中のコレステロール解析および脈絡叢凍結サンプルでのプロテオーム解析を中心に行なう。

結果：髄液におけるコレステロール解析では疾患群間でのある程度の傾向を得ることができた。脈絡叢プロテオームにおいてはアルツハイマー病および正常加齢各4例での解析を行い、アルツハイマー病群での異常発現因子を得た。現在、症例数を増やしての解析を行うとともに異常発現因子の同定を行なっている。

考察：ヒト組織を用いてのコレステロールを中心とした髄液・血液・脳組織での代謝解析を現在進行中であるが、ある程度の手答えを初年度において得ることができた。アルツハイマー病の病因において、残る2年間において本事業での一定の成果を得る事ができると考えている。

### A. 研究目的

コレステロール代謝に関与する $apoE$ ,  $ABCA1$ および $CYP46$ の遺伝子多型がAD発症と強い相関があることが知られている。しかし、脳内コレステロール代謝制御における上記分子の役割の理解、およびAD発症との関連についての知見が不十分である。この解明に向けて我々は主にヒトサンプルを用いての研究を行う。

### B. 研究方法

我々はAD脳・髄液サンプルを用いてa) 遺伝子多型解析、b) コレステロール値およびその関連因子の測定、c) 大脳皮質、脈絡叢を用いてプロテオーム解析を行い脂質代謝関連因子のピックアップを行う。(倫理面への配慮)

ヒトサンプルは病理解剖時に、遺伝子解析も含めての研究利用に供される事が明記してある書面にて遺族より承諾書をとっている。その後の検体はすべて匿名化され、全ての情報は個人情報管理室にて厳重に管理されている。またヒトサンプルを用いての研究は全て福祉村病院倫理委員会の承認を得て行われている。

### C. 研究結果

#### 1. 発現遺伝子・蛋白解析；

a) 遺伝子多型解析はApoE genotypingをルーチンに行い、他施設との共同研究で脂質代謝関連因子の多型解析も進めている。ApoEに関しては従来の報告どおり、ADではtype 4がリスクであるほか、アミロイドアンギオパチー、レビー小体病においてもリスクである点が明らかとなった。

臨床検体でのコレステロール値測定では、600例

の血液サンプルの測定と内服状況が終了したが、まだ未解析の状況である。髄液サンプルは生前採取50例に関して測定を行いADおよび前頭側頭型認知症においてコレステロール値が増加傾向を見出す事ができた。

死後脳室および腰椎採取髄液は現在測定継続中である。

c) 大脳皮質、脈絡叢を用いてプロテオーム解析脳実質でのプロテオーム解析においてAD, DLBでの解析を共同研究で行い増加および減少スポットを検出し同定中である。脈絡叢解析においてはAD特異的に上昇している4スポットを捉える事ができた。リン酸化酵素発現解析はカナダのベンチャー企業と網羅的リン酸化酵素arrayを展開しておりAD脳における発現解析は終了したが、その病態に対する意義に関しては検討中である。

### D. 考察

脂質代謝がAD発症に関与している可能性がある知見がヒトサンプルにおいても集積しつつあり、脂質代謝機構の中核における解明がADの病態理解には重要な鍵となると考えられる。

### E. 結論

現在進行中のプロジェクトをさらに推し進め、脳組織、脈絡叢、髄液、血液での脂質代謝関連因子の検索を行い、トータルにその機構解明を行うことでAD発症の手がかりを得られるものと確証している。

### F. 健康危険情報

なし。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Taguchi K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T  
Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease.  
**Ann Neurol.** Apr;57(4):585-8.2005
- (2) Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.  
Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease.  
**J Neurol Sci.** 238, 53-57, 2005
- (3) Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T.  
Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial migration through extracellular matrix.  
**Biochem Biophys Res Commun.** 23;335(2):631-6.2005
- (4) Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H  
Non-uniformity in the regional pattern of Lewy pathology in brains of dementia with Lewy bodies.; **Neuropathology.**25, 188-194.2005
- (5) Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y.  
Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease.  
**J Neurosci.**23;25(47):10857-62. 2005
- (6) Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K.  
Depletion of cholinergic neurons in the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies.  
**Acta Neuropathol.** In press 2005
- (7) Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K.  
Variations in the BDNF Gene in autopsy-

confirmed Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies in Japan.

**Dement Geriatr Cogn Disord.** In press. 2006

### 2. 学会発表

- (1) 赤津裕康、磯島大輔、桑野良三、山本孝之、小阪憲司  
水腫と脳梗塞を併発し非特異的的老人斑を伴ったアルツハイマー病の1例  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (2) 都甲崇、勝瀬大海、塩崎一昌、井関栄三、秋山治彦、土谷邦秋、磯島大輔、赤津裕康、鈴木京子、de Silva Rohan、Lees Andrew、小阪憲司、平安良男  
4-repeat tauopathiesにおけるpretanglesの検討  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (3) 藤城弘樹、梅垣宏行、赤津裕康、磯島大輔、井口昭久、小阪憲司  
レビー小体型痴呆における中隔核の免疫組織学的検討  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (4) 堀本佳彦、松本光弘、赤津裕康、小阪憲司、山本孝之、小島章弘、吉田眞理、橋詰良夫  
Machado-Joseph病におけるMRI所見と病理所見の対比  
第46回日本神経病理学会総会学術研究会  
2005.5.12-14
- (5) 赤津裕康、岡田秀親、山本孝之、橋本歩美、岡崎三代、小山典久、横山信治  
ゲルろ過HPLC法による亜急性硬化性全脳炎(SSPE)患者の脳室液蛋白室およびリポ蛋白解析  
第9回日本神経ウイルス研究会 2005.6.9-11
- (6) 赤津裕康、道川誠、山田達夫、岡田秀親、山本孝之、伊藤仁一、横山信二  
アルツハイマー病を中心としたの髄液中コレステロールの解析  
第24回日本痴呆学会、2005.9.30-10.1
- (7) 赤津裕康、堀本佳彦、中畑英樹、佐藤知雄、小橋修、岡田秀親、山本孝之、小阪憲司、橋詰良夫  
特異な臨床徴候を呈した長期画像フォローをし得た進行性核上性麻痺の1剖検例

第33回臨床神経病理懇話会 2005.11.26-27

- (8) 梅津正博、石井俊、水上勝義、片桐拓也、内田和彦、朝田隆、小阪憲司、赤津裕康  
アルツハイマー病患者における脈絡叢のプロテオーム解析

第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7-10

- (9) 石井俊、片桐拓也、水上勝義、赤津裕康、小阪憲司、朝田隆、内田和彦  
アルツハイマー病、レビー小体型痴呆症および統合失調症患者剖検脳を用いたプロテオーム比較解析

第28回日本分子生物学会年会 2005.12.7-10

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

発明の名称「アポトーシスに陥る傾向を判定する方法及びその利用」

共同発明者 「三浦 裕、川口誠、赤津裕康、小阪憲司、西野仁雄」

出願番号「特願2005-60654」

出願日 平成17年4月4日

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
道川 誠	脳と栄養	小田裕昭、加藤久典、関泰一郎	健康栄養学	共立出版	東京	2005年	132-139
道川 誠	アルツハイマー病と栄養	小田裕昭、加藤久典、関泰一郎	健康栄養学	共立出版	東京	2005年	212-220
道川 誠	脳病変におけるコレステロールの意義	柳澤信夫	老年期痴呆の克服をめざして	医学書院	東京	2005年	47-56

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ko M, Zou K, Minagawa H, Yu W, Gong JS, Yanagisawa K, and Michikawa M	Cholesterol-mediated neurite outgrowth is differently regulated between cortical and hippocampal neurons.	J. Biol. Chem	280	42759-42765	2005
Yu W, Gong J-S, Ko M, Garver W. S., Yanagisawa K, and Michikawa M.	Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick Type C1 mouse brain affects mitochondria function.	J. Biol. Chem	280	11731-11739	2005
Yu W, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M	Neurodegeneration in heterozygous Niemann-Pick type C1 (NPC1) mouse: Implication of heterozygous NPC1 mutations being a risk for tauopathy.	J. Biol. Chem	280	27296-27302	2005
Yu W, Zou K, Gong JS, Ko M, Yanagisawa K, and Michikawa M.	Oligomerization of amyloid $\beta$ -protein occurs during the isolation of lipid rafts.	J. Neurosci. Res.	80	114-119	2005
Kim MJ, Kim J, Michikawa M, Cha CI, Lee B.	Substance P immunoreactive cell reductions in cerebral cortex of Niemann-Pick disease type C mouse.	Brain Res	1043	218-224	2005
Yang SR, Kim SJ, Byun KH, Hutchinson B, Lee HH, Michikawa M, Lee YS, Kang KS.	NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38MAP kinase signaling	Stem Cells	印刷中		2005
Taguchi K, Yamagata H, Zhong W, Kamino K, Akatsu H, Hata R, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T	Identification of hippocampus-related candidate genes for Alzheimer's disease.	Ann Neurol	57	585-588	2005
Zhong W, Yamagata HD, Taguchi K, Akatsu H, Kamino K, Yamamoto T, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase is a novel risk gene for Alzheimer disease.	J Neurol Sci.	238	53-57	2005

Satoh K, Hata M, Shimizu T, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T.	Lib, transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes, promotes glial migration through extracellular matrix.	Biochem Biophys Res Commun.	335	631-636	2005
Yamamoto R, Iseki E, Marui W, Togo T, Katsuse O, Kato M, Isojima D, Akatsu H, Kosaka K, Arai H	Non-uniformity in the regional pattern of Lewy pathology in brains of dementia with Lewy bodies	Neuropathology	25	188-194	2005
Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y.	Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease.	J Neurosci.	25	10857-10862	2005
Fujishiro H, Umegaki H, Isojima D, Akatsu H, Iguchi A, Kosaka K	Depletion of cholinergic neurons in the nucleus of the medial septum and the vertical limb of the diagonal band in dementia with Lewy bodies.	Acta Neuropathol	印刷中		2005
Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K.	Variations in the BDNF Gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies in Japan.	Dement Geriatr Cogn Disord.	印刷中		2005
Iwasaki T., Takahashi S., Takahashi M., Zenimaru Y., Kujiraoka T., Ishihara M., Nagano M., Suzuki J., Miyamori I., Naiki H., Sakai J., Fujino T., Norman E. Miller N. E., Yamamoto T. T. and Hattori H..	Deficiency of the very low-density lipoprotein (vldl) receptors in streptozotocin-induced diabetic rats: insulin-dependency of the vldl receptor	Endocrinology	146	3286-3294	2005