

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18年度 総括・分担研究年度終了報告書

主任研究者 道川 誠

平成19（2007）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	-----9
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	-----12
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	-----15
赤津裕康	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----23

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

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

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。

道川：本年度は、ApoEのアイソフォーム依存的HDL産生のメカニズムを解明した。(i)ApoEによるコレステロール搬出はN末端断片のみでアイソフォーム依存的であること、(ii)その理由はApoE3 N末端断片が持つシステイン間によるdisulfide結合による2量体形成(分子間相互作用)にあること、(iii)C末端断片はそれ自体ではコレステロール搬出能が弱い、N末端断片の作用を相加的に修飾すること、(iv)しかしApoE4では、ドメイン相互作用のためC末端断片が相加的に働かないこと(分子内相互作用)が明らかになった(論文投稿中)。この結果を受けて、ApoE4の劣ったHDL産生能を回復させることを標的にした治療法開発のために(テラーメイド治療)、脳内HDL産生を増強させる薬剤探索を現在行っている。一方、高ホモシステイン血症は、アルツハイマー病の危険因子であるが、そのメカニズムは不明である。本年度の研究結果から、脳内ホモシステインはホモシステインの持つSH基がApoE3のシステインのSH基と反応してApoE3のHDL産生作用を阻害しApoE4と同レベルまで機能低下させてしまうため、アルツハイマー病の危険因子となっている可能性があることが明らかになった。ApoE3型の人で高ホモシステイン血症の場合は、積極的にホモシステインを下げる治療を行うべきである(テラーメイド医療)。

藤野：CYP46A1・mycを脳神経系で高発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製するために、NSE (Neuron Specific Enolase) プロモーター下流にCYP46A1・myc cDNAを連結したTgマウス作製用ミニジーンを構築した。このミニジーンをマウス受精卵にマイクロインジェクションすることで、最終的にゲノム中にミニジーンが挿入された26個体のTgマウスを得た。これらのTgマウスの内、5個体のみが脳においてmCYP46A1・mycタンパク質を発現していた。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明らかにした。アポEのシアル酸修飾はレクチンプロット、イムノプロット及び点突然変異体の解析から、Ser290に付加するムチン型糖鎖に結合していることが強く示唆された。現在、アポEのシアル酸修飾の意義をアルツハイマー病発症との関連で解析中である。

赤津：本年度は、昨年度に引き続き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の変動をヒトのサンプルを用いて解析した。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った。結果：HPLC法を用いたHDL, LDL分画別での解析の結果、髄液におけるコレステロール量およびHDLサイズはアルツハイマー病患者で有意に変化していた。脈絡叢プロテオームではアルツハイマー病および正常加齢各4例での解析を終え、発現レベルが変化している物質を同定中である。また海外との共同研究でABCA2多型とAD発症との関連性について明らかにした。プロテオーム解析によっていくつかのコレステロール関連因子の変動とアルツハイマー病との関連を示すデータが得られた。

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。(道川)

また、脳神経系の脂質代謝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、脳神経系から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じ抜ける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。(藤野)

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。(赤津)

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([¹⁴C]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量をウェ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) ApoEは脳ではアストロサイトで産生され22kDaのN末端ドメインと10kDaのC末端ドメインからなる。様々な長さのリコンビナントApoE分子をApoE3, ApoE4型双方ともに準備し、それらによるHDL産生能を神経細胞培養を用いて検討した。

(4) ホモシステインのApoE3によるHDL産生作用への影響を生化学的に解析した。また、高ホモシステイン血症患者の脳脊髄液における両者の相互作用について解析した。

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。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、Tgマウス作成用ミニジーンを構築した。このミニジーンをC57BL/6J・マウス受精卵の前核にマイクロインジェクションすることでTgマウスを作製した。ゲノム中にミニジーンが挿入されたTgマウスのスクリーニングはPCRによって行った。また、脳におけるmCYP46A1・mycタンパク質の検出は抗myc-tag抗体を用いたイムノブロットで行った。

ヒト・アポE2, E3, E4及び様々なアミノ酸置換変異体 cDNAを組み込んだアデノウィルスベクターを構築し、ヒト・グリオーマ細胞にて大量発現を行

った。この培養上清から各アポEを均一にまで精製した。精製標品を様々なシアリダーゼによる処理、レクチンブロット、イムノブロットを組み合わせさせてシアル酸結合糖鎖の構造及び結合部位を解析した。これら精製アポEの脂質結合能はDMPCリポソーム・濁度クリアランスを指標に、リポタンパク受容体への結合能はリポタンパク受容体を発現させたCHO細胞への蛍光標識 α -VLDLの取り込みのアポE・リポソームの競合阻害活性から解析した。

赤津：AD脳・髄液・血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った。

(倫理審査) 本研究は、当該研究施設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。

ヒトサンプルの解析に当たっては病理解剖時に、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た。その後、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. 結果

道川：(i)ホモシステインはApoE3の2量体形成を阻害し、(ii) ApoE3によるHDL産生能を低下させた(ApoE4レベルまで)。(iii)ApoE3はApoE4に比し疎水性が高いが、ホモシステインはそれをApoE4レベルに低下させた。(iv)ヒト脳脊髄液解析では、脳脊髄液中のホモシステイン値が高いサンプルで、ApoE3の2量体量が低下していた。

(i)ホモシステインはApoE3の2量体形成を阻害し、(ii) ApoE3によるHDL産生能を低下させた(ApoE4レベルまで)。(iii)ApoE3はApoE4に比し疎水性が高いが、ホモシステインはそれをApoE4レベルに低下させた。(iv)ヒト脳脊髄液解析では、脳脊髄液中のホモシステイン値が高いサンプルで、ApoE3の2量体量が低下していた。

藤野：CYP46A1・myc cDNAをNSEプロモーター下流に連結したTgマウス作製用のミニジーンを構築した。このミニジーンをB6・マウス受精卵の前核にマイクロインジェクションすることで、Tgマウスを作製した。PCRによるスクリーニングの結果、最終的にゲノム中にミニジーンが挿入された26個体のTgマウスを得た。これらのTgマウス脳から調製した抽出液を用いて、抗myc-tag抗体を用いたイムノブロットにより、CYP46A1・mycタンパ

ク質の発現を解析した。26系統のTgマウスの内、5系統でmCYP46A1・mycの発現が認められた。この5系統の内、比較的発現が高い4-1系統及び2-3系統の組織特異性を解析したところ、CYP46A1・mycは脳以外にも肺や心臓で脳と同程度の発現が認められた。また、9-6系統は繁殖が著しく悪く、系統を維持することが出来なかった。

ヒト・アポE2、E3、E4及び様々なアミノ酸置換変異体 cDNAを組み込んだアデノウィルスベクターを構築し、ヒト・グリオーマ細胞にて大量発現を行った。この培養上清から各アポEを均一にまで精製した。また、このアデノウィルスをアポE-KOマウスより調製した腹腔マクロファージに感染させ、アポEを発現させたところ、グリア細胞と同様にシアル酸による修飾を受けることが明らかとなった。これまでの解析から、アポEのシアル酸修飾部位はC末端付近のSer/Thr残基に付加したムチン型糖鎖に結合していることが示唆された。これらの結果に基づいて、PCR-based突然変異導入によりC末端に存在する4箇所のSer/Thr残基をAlaに置換した。アポE・Ser 296 Alaでは全ての分子種がシアル酸結合型の分子量へシフトし、一方、ApoE・Ser/Thr 289/290 Ala/Alaではシアリダーゼ処理したアポEと同一分子量にシフトした。また、アポE・Ser 263 Alaでは野生型と同様であった。これらの結果は、アポEに見られる主要なシアル酸修飾はSer 290に付加するムチン型糖鎖への結合であることが示唆された。また、部位特異的ノイラミニダーゼとレクチンプロットを併用した解析から、その糖鎖構造は NeuAc α 2 β 3Gal α 1 β 3GalNAc α 1 β Ser/Thr、Gal α 1 β 3 (NeuAc α 2 β 6) GalNAc α 1 β Ser/Thrの混在であることが予測された。

アポEのシアル酸修飾の意義を解析する目的で、シアル酸修飾アポE及び未修飾アポEのDMPCリポソームに対する結合能を解析した。さらに、リポタンパク受容体 (LDL受容体、VLDL受容体、ApoER2受容体) を発現させたCHO細胞を用いて標識 α -VLDLの取り込みのシアル酸修飾アポE・DMPCリポソーム複合体による競合阻害活性から、リポタンパク受容体に対する親和性を解析した。しかし、いずれもシアル酸修飾を受けていないアポEとの間に差は認められなかった。

赤津：発現遺伝子・蛋白解析では、海外との共同研究でABCA2多型とADの関連性が明らかとなった。髄液、血清サンプルでの脂質解析ではHPLC法を用いてHDL、LDL分画での分析が終了し疾患との関連性を検討中である。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特異的に異常発現している因子を見出す事

ができ、同定を進めるとともに、各10例以上に症例数を増やして追試を行っている。

D. 考察

道川：(i)ApoEによるコレステロール搬出はN末端断片のみでアイソフォーム依存的であること、(ii)その理由はApoE3 N末端断片が持つシステイン間によるdisulfide結合による2量体形成 (分子間相互作用) にあること、(iii)C末端断片はそれ自体ではコレステロール搬出能が弱い、N末端断片の作用を相加的に修飾すること、(iv)しかしApoE4では、ドメイン相互作用のためC末端断片が相加的に働かないこと (分子内相互作用) を明らかにした(論文投稿中)。ApoEアイソフォーム特異的HDL産生機構のほぼ全容が明らかになった。

今後の予定：この研究の延長としてHDL療法として、下記(3)のアプローチを考えている。しかし、ApoE4の構造を変える方法として、FRET-ApoEなどを作成してドメイン相互作用を消失させる薬剤の探索は可能である。

(i)高ホモシステイン血症では、ApoE3のHDL産生作用を阻害するために、動脈硬化・脳梗塞の危険因子となっている可能性がある。(ii)一方、脳内ホモシステインはApoE3のHDL産生作用を阻害しApoE4と同レベルまで機能低下させてしまうため、アルツハイマー病の危険因子となっている可能性がある。(iii)ApoE3型の人で高ホモシステイン血症の場合は、積極的にホモシステインを下げる治療を行うべきである (テラーメイド医療)。

今後の予定：ApoE3、ApoE4ノックインマウスx APP Tgマウスとの交配マウスに、葉酸欠乏、ビタミンB12欠乏食で高ホモシステイン血症にさせ、A β 沈着への影響を検証する。

藤野：脳神経系で高発現するTgマウスを作製するために、NSEプロモーター下流にCYP46A1・myc cDNAを組み込んだ。最終的にゲノム中にインテグレーションされた26系統のTgマウスを得たが、5系統のみが脳においてmCYP46A1・mycを発現していた。しかし、この発現はそれほど高いものではなく、しかもNSEプロモーターを用いたにもかかわらず、2~3系統では脳以外の組織でもその発現が認められた。また、一部の系統では繁殖が著しく悪く、系統を維持することが出来なかった。これらの結果は、CYP46A1・myc cDNA組換えアデノウィルスの作製において、CYP46A1の発現が細胞にとって強い毒性を持つことが示唆されたことと一致する。

グリア細胞で発現するアポEは、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。このアポEに見られる主要なシアル酸修飾はC末端のSer 290に付加するムチン型糖鎖への結合であることが示唆された。また本研究により、マクロファージか

ら分泌されるアポEもグリア細胞と同様にシアル酸による修飾を受けることが明らかとなった。これらの結果は、体循環におけるリポタンパク代謝に重要な肝臓由来のアポEと肝臓以外で発現するアポEでは糖鎖修飾が異なることを示している。この修飾の違いは機能の違いに因るものであることが考えられたため、シアル酸修飾アポEのDMPCリポソームに対する結合能及びリポタンパク受容体に対する親和性を解析したが、シアル酸修飾を受けていないアポEとの間に違いは見いだせなかった。マクロファージから分泌されるアポEは肝臓から分泌されるアポEとは異なり動脈硬化形成を増悪させることが報告されている。また、マクロファージ由来のアポEは肝臓にほとんど取り込まれない又は取り込まれるがそのままの形で再放出されることが示唆されている。今回の結果を考え合わせると、今後、細胞に取り込まれたアポEの安定性とリサイクリングを解析する必要がある。また、アポEはABCトランスポーターなどと協調して細胞からのコレステロール引き抜きにも機能しており、シアル酸修飾が与えるコレステロール搬出能への影響も検討する必要がある。

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 およびApoE4によるコレステロール搬出にアイソフォーム依存性があるのは、N末端断片による2量体形成 (ApoE3) によってHDL産生能が増強するためと、N末端とC末端とのドメイン相互作用のために能力が減少する(ApoE4)という2つのメカニズムによることが明らかになった。ApoE4の劣った能力を補うためにHDL療法開発に着手した。(ii)高ホモシステイン血症では、ApoE3のHDL産生作用を阻害するために、動脈硬化・脳梗塞の危険因子となる。一方、脳内ホモシステインはApoE3のHDL産生作用を阻害しApoE4と同レベルまで機能低下させてしまうため、アルツハイマー病の危険因子となっている可能性がある。(iii) ApoE3型の人で高ホモシステイン血症の場合は、積極的にホモシステインを下げる治療を行うべきである(テラーメイド医療)。

藤野：CYP46A1・mycを脳神経系で発現するTgマウスを作製した。最終的に5系統のTgマウスのみが脳においてmCYP46A1・mycを発現していた。また、2〜3系統では脳以外の組織に発現が認められた。この発現はそれほど高いものではなく、CYP46A1・mycの神経細胞における発現が生体にとって毒性を示すことが示唆された。脳神経系及びマクロファ

ージで発現するアポ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が明らかとなった。このシアル酸修飾はC末端側のSer290に付加するムチン型糖鎖に結合していることが強く示唆された。リポソームに対する結合能及びリポタンパク受容体に対する親和性を解析したが、いずれもシアル酸修飾を受けていないアポEとの間に違いは認められなかった。

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

論文発表

Michikawa M.

Role of cholesterol in amyloid cascade: cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and mitochondrial function.

Acta Neurol Scand Suppl. 185:21-26, 2006

Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K

A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly.

J Biol Chem, in press.

Wollmer MA, Kapaki E, Hersberger M, Muntwyler J, Brunner F, Tsolaki M, Akatsu H, Kosaka K, Michikawa M, Molyva D, Paraskevas GP, Lutjohann D, von Eckardstein A, Hock C, Nitsh RM, and Papassotiropoulos A.

Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease.

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 141(5):534-536, 2006.

Byun K, Kim J, Cho S-Y, Hutchinson B, Yang S-R, Kang K-S, Cho M, Hwang K, Michikawa M, Jeon Y-W, Paik Y-K, and Lee B.

Alteration of the glutamate and GABA transporters in the hippocampus of the Niemann-Pick disease, type C mouse using proteomic analysis.

Proteomics, 6(4):1230-1236, 2006.

Yang SR, Kim SJ, Byun KH, Hutchinson B, Lee HH, Michikawa M, Lee YS, and Kang KS.

NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38 MAP kinase signaling. *Stem Cells*, 24(2):292-298, 2006.

1) 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 (Berl)*. 111(2):109-14, 2006

2) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tani H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M. Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. 60 Suppl 1:S34-9, 2006.

3) 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*. 22(3):216-22, 2006.

4) Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., Paraskevas, G.P., Lutjohann, D., von Eckardstein, A., Hock, C., Nitsch, R.M., Papassotiropoulos, A. Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 141(5):534-6, 2006.

5) Heese K, Akatsu H. Alzheimer's disease--an interactive perspective. *Curr Alzheimer Res*. 3(2):109-21, 2006.

6) Isojima D, Togo T, Kosaka K, Fujishiro H, Akatsu H, Katsuse O, Iritani S, Matsumoto T, Hirayasu Y. Vascular complications in dementia with Lewy bodies: a postmortem study. *Neuropathology*. 26(4):293-7, 2006.

7) Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M,

Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.

A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease. *Life Sci*. 78(21):2444-8, 2006.

8) Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T. A novel membrane protein, encoded by the gene covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes. *Brain Res*. In press, 2006.

9) Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M. Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 345(3):967-72, 2006.

道川 誠
アポリポ蛋白E
老年期認知症ナビゲーター
pp226-227, 2006年9月発行、メヂカルレビュー社

道川 誠
アルツハイマー病とコレステロール代謝
生化学 第78巻,第9号, pp831-839, 2006

道川 誠
アルツハイマー病:ベッドサイドからベンチへ
医療 第60巻,第12号, pp752-759, 2006

道川 誠
アルツハイマー病:ベッドサイドからベンチへ
医療 第60巻,第12号, pp752-759, 2006

道川 誠、柳澤勝彦
コレステロールとAlzheimer病
医学のあゆみ 220巻、5号、pp439-444、2007年

道川 誠
Alzheimer病と脂質
Clinical neuroscience 25巻、2号、pp162-164、2007年

2. 学会発表

1) Michikawa M.
Cholesterol and neurodegeneration: Metabolism

and roles of cholesterol in the central nervous system. University Louis Pasteur, Strasbourg, France, June 8, 2006.

2) Michikawa M

Approaches to establish the "HDL-therapy" for Alzheimer's disease.

FORENAP Pharma. Rouffach, France, June 7, 2006

3) 丸谷寿裕、小亀浩一、道川 誠、駒野宏人

Herp is involved in the regulation of presenilin complex formation

第49回日本神経化学会大会 国際ミニシンポジウム「認知症」、2006年9月14日、名古屋

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2006年度大会・シンポジウム。京都。2006年3月25-28日(発表日28日)

道川 誠

アルツハイマー病モデル動物一病態解明と治療効果判定における有用性と限界。第24回日本神経組織培養研究会・シンポジウム。東京。2006年3月11日

道川 誠

アルツハイマー病の病態・病因ならびに予防・治療戦略について：コレステロール代謝の側面から
神戸薬科大学大学院特論講義,神戸。2006年5月26日

道川 誠

神経組織培養研究会

「アルツハイマー病モデル動物の病態解明と治療効果判定における有用性と限界」

2006年3月11日(土)

順天堂大学医学部講堂、東京

源川博久、きょう建生、ゾウクン、中村俊行、斎藤博幸、Sissel Lund-Katzm, Michael C. Phillips, 柳澤勝彦、道川 誠

アポリポ蛋白Eアイソフォーム依存的HDL産生機構の検討

第25回日本認知症学会、広島、2006年10月7日

ゾウクン、白石博久、駒野宏人、柳澤勝彦、

道川 誠

Deficiency in presenilin-1 and -2 promotes maturation and cell surface expression of integrin

α1. 第25回日本認知症学会、広島、2006年10月6日

1) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行、丸山将浩、田代学、舟木善仁、石川洋介、加藤元久、赤津裕康、山本孝之、成田勉、古川勝敏、岩田錬、伊藤正敏、谷内一彦、荒井哲行 アルツハイマー病の早期診断のためPETプローブの開発
東北大学先進行医工学研究機構第2回公開シンポジウム(2006.1.24)

2) 赤津裕康、松本光弘、宮本圭子、山本淑子、芦田欣也、高見正雄、小橋修
胃瘻造設患者へのタンパク質補給食品(メイプロテイン)の栄養介入による栄養改善効果
第21回日本静脈経腸栄養学会(2006.1.27)

3) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
アミロイドβ蛋白の画像化によるアルツハイマー病の早期診断
痴呆を語る会(2006.2.18)

4) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
PETによるβアミロイドイメージングの可能性
第35回日本神経放射線学会(2006.2.23)

5) 赤津裕康、宮本圭子、谷水清美、山本淑子、小橋修、山本孝之
栄養療法にて肝性脳症をコントロールし得た末期肝癌例
第6回愛知NST研究会(2006.2.25)

6) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之
βアミロイドイメージングAD研究会画像診断サブコミティ(2006.2.4)

7) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之 アルツハイマー病用PETプローブの開発とその臨床応用
第79回日本薬理学会年会(2006.3.10)

8) 山縣英久、鐘望涛、田口敬子、名倉潤、川尻真和、秦龍二、赤津裕康、紙野晃人、武田雅俊、三木哲郎 519候補遺伝子アプローチによるアルツハイマー病関連遺伝子の探索
日本内科学会総会(2006.4.14-16)

9) 山縣英久、鐘望涛、田口敬子、赤津裕康、紙野晃人、川尻真和、武田雅俊、三木哲郎
PE-305リンパ球特異的蛋白チロシンキナーゼはア

ルツハイマー病の新規リスク遺伝子である
日本神経学会(2006.5.11-13)

10) 三木哲郎、山縣英久、満田憲昭、鐘望涛、青木守、赤津裕康、紙野晃人、武田雅俊、小原克彦、小阪憲司

PE-306ニカストリン遺伝子スプライス変異と確実例アルツハイマー病の関連
日本神経学会(2006.5.11-13)

11) 赤津裕康、水上勝義、石井俊、山本孝之、小阪憲司、片桐拓也、内田和彦、朝田隆
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
日本精神神経学会(2006.5.11-13)

12) 赤津裕康、三室マヤ、中澤秀嘉、松川則之、山本孝之、堀映、吉田眞理、小阪憲司、橋詰良夫
Amyloid angiopathy を伴った Orthochromatic(sudanophilic) leukodystrophy の一例
第47回日本神経病理学会(2006.5.24-26)

13) Hiroyasu Akatsu, Hidehisa Yamagata, Jun Kawamata, Kouzin Kamino, Masatoshi Takeda, Takayuki Yamamoto, Tetsuro Miki, Ikuo, Shun Shimohama, Kenji Kosaka
Variations in the Brain-Derived Neurotrophic Factor(BDNF) Gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease(AD) or Dementia with Lewy bodies(DLB) in Japan
第一回国際ブレインバンク会議(2006.6.13-15)

14) Kazuki Satoh, Mitsumi Hata, Seiji Takahara, Tomoko Shimizu, Hidetoshi Tsuzaki, Hiroshi Yokota, Hiroyasu Akatsu, Takayuki Yamamoto, Kenji Kosaka and Tatsuo Yamada
Novel genes transcriptionally induced in senile-plaque associated astrocytes
第20回国際生化学・分子生物学会議/第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議/第79回日本生化学会大会、第29回日本分子生物学会年会および第59回日本細胞生物学会大会との共同開催(2006.6.18-23)

15) Hiroyasu Akatsu, Masahiro Umezu, Takashi Ishii, Hideyuki Suzuki, Takayuki Yamamoto, Takuya Katagiri, Katsuyosi Mizukami, Takashi Asada, Kenji Kosaka, Kazuhiro Uchida
Proteome analysis of choroid plexus in

Alzheimer's disease
第20回国際生化学・分子生物学会議/第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議/第79回日本生化学会大会、第29回日本分子生物学会年会および第59回日本細胞生物学会大会との共同開催(2006.6.18-23)

16) Saori Hata, Yoichi Araki, Hiroyasu Akatsu, Katsuya Urakami, Masaki Nishimura, Tadashi Nakaya, Toshiharu Suzuki
■-Alc■, metabolic products of Alcadein, as a novel diagnostic marker in CSF of Alzheimer's disease
国際アルツハイマー学会(2006.7.15-20)

17) Hiroyasu Akatsu, Masahiro Umezu, Takashi Ishii, Hideyuki Suzuki, Takuya Katagiri, Katsuyosi Mizukami, Takashi Asada, Kenji Kosaka, Kazuhiro Uchida
Choroid plexus proteome analysis in Alzheimer disease
ICGP 6th Annual Meeting(2006.10.3-6)

18) Ikuo Tooyama, Tomoko Kato, Yoshihiro Konishi, Shun Shimohama, Teruyuki Tsuji, Hiroyasu Akatsu
The interaction of ■1-chimaerin protein with ■-amyloid in culture cells.
ICGP 6th Annual Meeting(2006.10.3-6)

19) Nobuyuki Okamura, Yukitsuka Kudo, Shozo Furumoto, Katsutoshi Furukawa, Manabu Tashiro, Motohisa Kato, Hiroyasu Akatsu, Tohru Sawada, Kazuhiko Yanai, Hiroyuki Arai
In vivo imaging of amyloid plaques in the brain: [11C]BF-227 PET study.
ICGP 6th Annual Meeting(2006.10.3-6)

20) Kazuki Satoh, Mitsumi Hata, Seiji Takahara, Tomoko Shimizu, Hidetoshi Tsuzaki, Hiroshi Yokota, Hiroyasu Akatsu, Takayuki Yamamoto, Kenji Kosaka and Tatsuo Yamada
Novel genes transcriptionally induced in senile-plaque associated astrocytes
第36回米国ニューロサイエンス(2006.10.14-18)

21) 赤津裕康、三室マヤ、谷由章、山本孝之、堀映、橋詰良夫
パーキンソンニズムと認知症状を伴った1剖検例
第34回臨床神経病理懇話会(2006.11.18-19)

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

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、ApoEのアイソフォーム依存的HDL産生のメカニズムを明らかにした。すなわち、(i)ApoEによるコレステロール搬出はN末端断片のみでアイソフォーム依存的であること、(ii)その理由はApoE3 N末端断片が持つシステイン間によるdisulfide結合による2量体形成（分子間相互作用）にあること、(iii)C末端断片はそれ自体ではコレステロール搬出能が弱い、N末端断片の作用を相加的に修飾すること、(iv)しかしApoE4では、ドメイン相互作用のためC末端断片が相加的に働かないこと（分子内相互作用）を明らかにした（論文投稿中）。ApoEアイソフォーム特異的HDL産生機構のほぼ全容が明らかになった。この結果、ApoE4の劣ったHDL産生能を回復させることを標的にした治療法開発のために（テラーメイド治療）、脳内HDL産生を増強させる薬剤探索を現在行っている。

一方、ホモシステインは、メチオニン代謝の中間産物でありシステインと同様にSH基を持つ。高ホモシステイン血症は、アルツハイマー病の危険因子であることが分かっているが、そのメカニズムは不明である。ホモシステインの持つ-SH基がApoE3が持つシステインの-SH基と反応してApoE3によるHDL産生能を低下させる（ApoE3のApoE4化）かどうかを明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、脳内ホモシステインはApoE3のHDL産生作用を阻害しApoE4と同レベルまで機能低下させてしまうため、アルツハイマー病の危険因子となっている可能性があると考えられた。従って、ApoE3型の人で高ホモシステイン血症の場合は、積極的にホモシステインを下げる治療を行うべきである（テラーメイド医療）。

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) ApoEは脳ではアストロサイトで産生され22kDaのN末端ドメインと10kDaのC末端ドメインからなる。様々な長さのリコンビナントApoE分子をApoE3, ApoE4型双方ともに準備し、それらによるHDL産生能を神経細胞培養を用いて検討した。

(4) ホモシステインのApoE3によるHDL産生作用への影響を生化学的に解析した。また、高ホモシステイン血症患者の脳脊髄液における両者の相互作用について解析した。

(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)ホモシステインはApoE3の2量体形成を阻害し、(ii) ApoE3によるHDL産生能を低下させた(ApoE4レベルまで)。(iii)ApoE3はApoE4に比し疎水性が高いが、ホモシステインはそれをApoE4レベルに低下させた。(iv)ヒト脳脊髄液解析では、脳脊髄液中のホモシステイン値が高いサンプルで、ApoE3の2量体量が低下していた。

(i)ホモシステインはApoE3の2量体形成を阻害し、(ii) ApoE3によるHDL産生能を低下させた(ApoE4レベルまで)。(iii)ApoE3はApoE4に比し疎水性が高いが、ホモシステインはそれをApoE4レベルに低下させた。(iv)ヒト脳脊髄液解析では、脳脊髄液中のホモシステイン値が高いサンプルで、ApoE3の2量体量が低下していた。

D. 考察

本年度は、(i)ApoEによるコレステロール搬出はN末端断片のみでアイソフォーム依存的事であること、(ii)その理由はApoE3 N末端断片が持つシステイン間によるdisulfide結合による2量体形成(分子間相互作用)にあること、(iii)C末端断片はそれ自体ではコレステロール搬出能が弱い、N末端断片の作用を相加的に修飾すること、(iv)しかしApoE4では、ドメイン相互作用のためC末端断片が相加的に働かないこと(分子内相互作用)を明らかにした(論文投稿中)。ApoEアイソフォーム特異的HDL産生機構のほぼ全容が明らかになった。

今後の予定：この研究の延長としてHDL療法として、下記(3)のアプローチを考えている。しかし、ApoE4の構造を変える方法として、FRET-ApoEなどを作成してドメイン相互作用を消失させる薬剤の探索は可能である。

(i)高ホモシステイン血症では、ApoE3のHDL産生作用を阻害するために、動脈硬化・脳梗塞の危険因子となっている可能性がある。(ii)一方、脳内ホモシステインはApoE3のHDL産生作用を阻害しApoE4と同レベルまで機能低下させてしまうため、アルツハイマー病の危険因子となっている可能性がある。(iii) ApoE3型の人で高ホモシステイン血症の場合は、積極的にホモシステインを下げる治療を行うべきである(テーラーメイド医療)。

今後の予定：ApoE3, ApoE4ノックインマウスx APP Tgマウスとの交配マウスに、葉酸欠乏、ビタミンB12欠乏食で高ホモシステイン血症にさせ、A β 沈着への影響を検証する。

E. 結論

(i)ApoE3 およびApoE4によるコレステロール搬出

にアイソフォーム依存性があるのは、N末端断片による2量体形成(ApoE3)によってHDL産生能が増強するためと、N末端とC末端とのドメイン相互作用のために能力が減少する(ApoE4)という2つのメカニズムによることが明らかになった。ApoE4の劣った能力を補うためにHDL療法開発に着手した。

(ii)高ホモシステイン血症では、ApoE3のHDL産生作用を阻害するために、動脈硬化・脳梗塞の危険因子となる。一方、脳内ホモシステインはApoE3のHDL産生作用を阻害しApoE4と同レベルまで機能低下させてしまうため、アルツハイマー病の危険因子となっている可能性がある。(iii) ApoE3型の人で高ホモシステイン血症の場合は、積極的にホモシステインを下げる治療を行うべきである(テーラーメイド医療)。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

Michikawa M.

Role of cholesterol in amyloid cascade: cholesterol-dependent modulation of tau phosphorylation and mitochondrial function.

Acta Neurol Scand Suppl. 185:21-26, 2006

Yamamoto N, Matsubara E, Maeda S, Minagawa H, Takashima A, Maruyama W, Michikawa M, Yanagisawa K

A ganglioside-induced toxic soluble A β assembly. J Biol Chem, in press.

Wollmer MA, Kapaki E, Hersberger M, Muntwyler J, Brunner F, Tsolaki M, Akatsu H, Kosaka K, Michikawa M, Molyva D, Paraskevas GP, Lutjohann D, von Eckardstein A, Hock C, Nitsh RM, and Papassotiropoulos A.

Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease.

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 141(5):534-536, 2006.

Byun K, Kim J, Cho S-Y, Hutchinson B, Yang S-R, Kang K-S, Cho M, Hwang K, Michikawa M, Jeon Y-W, Paik Y-K, and Lee B.

Alteration of the glutamate and GABA transporters in the hippocampus of the Niemann-Pick disease, type C mouse using proteomic analysis.

Proteomics, 6(4):1230-1236, 2006.

Yang SR, Kim SJ, Byun KH, Hutchinson B, Lee HH, Michikawa M, Lee YS, and Kang KS.
NPC1 gene deficiency leads to lack of neural stem cell self-renewal and abnormal differentiation through activation of p38 MAP kinase signaling. Stem Cells, 24(2):292-298, 2006.

道川 誠
アポリポ蛋白E
老年期認知症ナビゲーター, メディカルレビュー社
pp226-227, 2006年9月.

道川 誠
アルツハイマー病とコレステロール代謝
生化学 第78巻,第9号, pp831-839, 2006

道川 誠
アルツハイマー病:ベッドサイドからベンチへ
医療 第60巻,第12号, pp752-759, 2006

道川 誠
アルツハイマー病:ベッドサイドからベンチへ
医療 第60巻,第12号, pp752-759, 2006

道川 誠、柳澤勝彦
コレステロールとAlzheimer病
医学のあゆみ 220巻、5号、pp439-444、2007年

道川 誠
Alzheimer病と脂質
Clinical neuroscience 25巻、2号、pp162-164、
2007年

2. 学会発表

1) Michikawa M.

Cholesterol and neurodegeneration: Metabolism and roles of cholesterol in the central nervous system. University Louis Pasteur, Strasbourg, France, June 8, 2006.

2) Michikawa M

Approaches to establish the "HDL-therapy" for Alzheimer's disease.
FORENAP Pharma. Rouffach, France, June 7, 2006

3) 丸谷寿裕、小亀浩一、道川 誠、駒野宏人

Herp is involved in the regulation of presenilin complex formation

第49回日本神経化学学会大会 国際ミニシンポジウム
「認知症」、2006年9月14日、名古屋

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2006年度大会・シンポジウム. 京都. 2006年3月25-28日(発表日28日)

道川 誠

アルツハイマー病モデル動物一病態解明と治療効果判定における有用性と限界. 第24回日本神経組織培養研究会・シンポジウム. 東京. 2006年3月11日

道川 誠

アルツハイマー病の病態・病因ならびに予防・治療戦略について:コレステロール代謝の側面から
神戸薬科大学大学院特論講義,神戸.2006年5月26日

道川 誠

神経組織培養研究会
「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」
2006年3月11日(土)
順天堂大学医学部講堂、東京

源川博久、きょう建生、ゾウクン、中村俊行、斎藤博幸、Sissel Lund-Katzm, Michael C. Phillips, 柳澤勝彦、道川 誠

アポリポ蛋白Eアイソフォーム依存的HDL産生機構の検討
第25回日本認知症学会、広島、2006年10月7日

ゾウクン、白石博久、駒野宏人、柳澤勝彦、

道川 誠

Deficiency in presenilin-1 and -2 promotes maturation and cell surface expression of integrin $\alpha 1$. 第25回日本認知症学会、広島、2006年10月6日

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： CYP46A1・mycを脳神経系で高発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作製するために、NSE（Neuron Specific Enolase）プロモーター下流にCYP46A1・myc cDNAを連結したTgマウス作製用ミニジーンを構築した。このミニジーンをマウス受精卵にマイクロインジェクションすることで、最終的にゲノム中にミニジーンが挿入された26個体のTgマウスを得た。これらのTgマウスの内、5個体のみが脳においてmCYP46A1・mycタンパク質を発現していた。しかし、NSEプロモーターを用いたにもかかわらず、2~3系統で脳以外の組織にmCYP46A1・mycの発現が認められた。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。また、マクロファージからも分泌されるアポEも高度にシアル酸修飾を受けることが明らかとなった。アポEのシアル酸修飾はレクチンプロット、イムノプロット及び点突然変異体の解析から、Ser290に付加するムチン型糖鎖に結合していることが強く示唆された。アポEのシアル酸修飾の意義を解析する目的で、リポソームに対する結合能及びリポタンパク受容体に対する親和性を解析したが、いずれもシアル酸修飾を受けていないアポEとの間に差は認められなかった。

A. 研究目的

脳神経系の脂質代謝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、脳神経系から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じ抜ける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。このcDNAをNSEプロモーター、SV40イントロン配列下流に組込み、cDNA下流にはSV40ポリA付加配列を連結し、Tgマウス作成用ミニジーンを構築した。このミニジーンをC57BL/6J・マウス受精卵の前核にマイクロインジェクションすることでTgマウスを作製した。ゲノム中にミニジーンが挿入されたTgマウスのスクリーニングはPCRによって行った。また、脳におけるmCYP46A1・mycタンパク質の検出は抗myc-tag抗体を用いたイムノプロットで行った。

ヒト・アポE2、E3、E4及び様々なアミノ酸置換変異体 cDNAを組み込んだアデノウィルスベクターを構築し、ヒト・グリオーマ細胞にて大量発現を行った。この培養上清から各アポEを均一にまで精製した。精製標品を様々なシアリダーゼによる処理、

レクチンプロット、イムノプロットを組み合わせ、シアル酸結合糖鎖の構造及び結合部位を解析した。これら精製アポEの脂質結合能はDMPCリポソーム・濁度クリアランスを指標に、リポタンパク受容体への結合能はリポタンパク受容体を発現させたCHO細胞への蛍光標識 α -VLDLの取り込みのアポE・リポソームの競合阻害活性から解析した。

（倫理面への配慮）

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。

研究結果

CYP46A1・myc cDNAをNSEプロモーター下流に連結したTgマウス作製用のミニジーンを構築した。このミニジーンをB6・マウス受精卵の前核にマイクロインジェクションすることで、Tgマウスを作製した。PCRによるスクリーニングの結果、最終的にゲノム中にミニジーンが挿入された26個体のTgマウスを得た。これらのTgマウス脳から調製した抽出液を用いて、抗myc-tag抗体を用いたイムノプロットにより、CYP46A1・mycタンパク質の発現を解析した。26系統のTgマウスの内、5系統でmCYP46A1・mycの発現が認められた。この5系統の内、比較的発現が高い4-1系統及び2-3系統の組織特異性を解析したところ、CYP46A1・mycは脳以外にも肺や心臓で脳と同程度の発現が認められた。また、9-6系統は繁殖が著しく悪く、系統を維持することが出来なかった。

ヒト・アポE2、E3、E4及び様々なアミノ酸置換変異体 cDNAを組み込んだアデノウィルスベクターを構築し、ヒト・グリオーマ細胞にて大量発現を行

った。この培養上清から各アポEを均一にまで精製した。また、このアデノウィルスをアポE-KOマウスより調製した腹腔マクロファージに感染させ、アポEを発現させたところ、グリア細胞と同様にシアル酸による修飾を受けることが明らかとなった。これまでの解析から、アポEのシアル酸修飾部位はC末端付近のSer/Thr残基に付加したムチン型糖鎖に結合していることが示唆された。これらの結果に基づいて、PCR-based突然変異導入によりC末端に存在する4箇所のSer/Thr残基をAlaに置換した。アポE・Ser 296 Alaでは全ての分子種がシアル酸結合型の分子量へシフトし、一方、ApoE・Ser/Thr 289/290 Ala/Alaではシアリダーゼ処理したアポEと同一分子量にシフトした。また、アポE・Ser 263 Alaでは野生型と同様であった。これらの結果は、アポEに見られる主要なシアル酸修飾はSer 290に付加するムチン型糖鎖への結合であることが示唆された。また、部位特異的ノイラミニダーゼとレクチンプロットを併用した解析から、その糖鎖構造はNeuAc α 2 β 3Gal α 1 β 3GalNAc α 1 β Ser/Thr、Gal α 1 β 3 (NeuAc α 2 β 6) GalNAc α 1 β Ser/Thrの混在であることが予測された。

アポEのシアル酸修飾の意義を解析する目的で、シアル酸修飾アポE及び未修飾アポEのDMPCリポソームに対する結合能を解析した。さらに、リポタンパク受容体 (LDL受容体、VLDL受容体、ApoER2受容体) を発現させたCHO細胞を用いて標識 α -VLDLの取り込みのシアル酸修飾アポE・DMPCリポソーム複合体による競合阻害活性から、リポタンパク受容体に対する親和性を解析した。しかし、いずれもシアル酸修飾を受けていないアポEとの間に差は認められなかった。

D. 考察

脳神経系で高発現するTgマウスを作製するために、NSEプロモーター下流にCYP46A1・myc cDNAを組み込んだ。最終的にゲノム中にインテグ

結論

CYP46A1・mycを脳神経系で発現するTgマウスを作製した。最終的に5系統のTgマウスのみが脳においてmCYP46A1・mycを発現していた。また、2~3系統では脳以外の組織に発現が認められた。この発現はそれほど高いものではなく、CYP46A1・mycの神経細胞における発現が生体にとって毒性を示すことが示唆された。脳神経系及びマクロファージで発現するアポ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が明らかとなった。このシアル酸修飾はC末端側のSer290に付加するムチン型糖鎖に結合していることが強く示唆された。リポソームに対する結合能及びリポタン

レーションされた26系統のTgマウスを得たが、5系統のみが脳においてmCYP46A1・mycを発現していた。しかし、この発現はそれほど高いものではなく、しかもNSEプロモーターを用いたにもかかわらず、2~3系統では脳以外の組織でもその発現が認められた。また、一部の系統では繁殖が著しく悪く、系統を維持することが出来なかった。これらの結果は、CYP46A1・myc cDNA組換えアデノウィルスの作製において、CYP46A1の発現が細胞にとって強い毒性を持つことが示唆されたことと一致する。

グリア細胞で発現するアポEは、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。このアポEに見られる主要なシアル酸修飾はC末端のSer 290に付加するムチン型糖鎖への結合であることが示唆された。また本研究により、マクロファージから分泌されるアポEもグリア細胞と同様にシアル酸による修飾を受けることが明らかとなった。これらの結果は、体循環におけるリポタンパク代謝に重要な肝臓由来のアポEと肝臓以外で発現するアポEでは糖鎖修飾が異なることを示している。この修飾の違いは機能の違いに因るものであることが考えられたため、シアル酸修飾アポEのDMPCリポソームに対する結合能及びリポタンパク受容体に対する親和性を解析したが、シアル酸修飾を受けていないアポEとの間に違いは見いだせなかった。マクロファージから分泌されるアポEは肝臓から分泌されるアポEとは異なり動脈硬化形成を増悪させることが報告されている。また、マクロファージ由来のアポEは肝臓にほとんど取り込まれない又は取り込まれるがそのままの形で再放出されることが示唆されている。今回の結果を考え合わせると、今後、細胞に取り込まれたアポEの安定性とリサイクリングを解析する必要がある。また、アポEはABCトランスポーターなどと協調して細胞からのコレステロール引き抜きにも機能しており、シアル酸修飾が与えるコレステロール搬出能への影響も検討する必要がある。

パク受容体に対する親和性を解析したが、いずれもシアル酸修飾を受けていないアポEとの間に違いは認められなかった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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った。

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。HPLC法を用いてHDL, LDL分画別での解析を現在進めており、血清と髄液との関連性を検討している。脈絡叢プロテオームではアルツハイマー病および正常加齢各4例での解析を終え、異常発現物質を同定中であるとともに、症例数を各10例以上に増やして追試を行っている。海外との共同研究でABCA2多型とADの関連性についての報告を行った。

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において髄液・血清での解析は今年度中に完了する予定である。脈絡叢プロテオーム解析も現在進行中であり、来年末までにまとまった成果を出す予定である。

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。

研究方法

我々はAD脳・髄液・血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。

研究結果

1. 発現遺伝子・蛋白解析；

海外との共同研究でABCA2多型とADの関連性が明らかとなった。

髄液、血清サンプルでの脂質解析ではHPLC法を用いてHDL, LDL分画での分析が終了し疾患との関連

性を検討中である。

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特異的に異常発現している因子を見出す事ができ、同定を進めるとともに、各10例以上に症例数を増やして追試を行っている。

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。

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。

健康危険情報

研究発表

論文発表

1) 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 (Berl). 111(2):109-14. 2006

2) Kimura R, Kamino K, Yamamoto M, Kida T, Akatsu H, Uema T, Kobayashi T, Hattori H, Nuripa A, Nessa BN, Kazui H, Ikejiri Y, Tanaka T, Tanii H, Kudo T, Yoneda H, Yamagata H, Miki T, Takeda M. Albumin gene encoding free fatty acid and beta-amyloid transporter is genetically associated with Alzheimer disease.

Psychiatry Clin Neurosci. 60 Suppl 1:S34-9, 2006.

3) 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. 22(3):216-22, 2006.

4) Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., Paraskevas, G.P., Lutjohann, D., von Eckardstein, A., Hock, C., Nitsch, R.M., Papassotiropoulos, A.

Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease.

Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 141(5):534-6, 2006.

5) Heese K, Akatsu H.

Alzheimer's disease--an interactive perspective.

Curr Alzheimer Res. 3(2):109-21, 2006.

6) Isojima D, Togo T, Kosaka K, Fujishiro H, Akatsu H, Katsuse O, Iritani S, Matsumoto T, Hirayasu Y.

Vascular complications in dementia with Lewy bodies: a postmortem study

Neuropathology. 26(4):293-7, 2006.

7) Mitsuda N, Yamagata HD, Zhong W, Aoto M, Akatsu H, Uekawa N, Kamino K, Taguchi K, Yamamoto T, Maruyama M, Kosaka K, Takeda M, Kondo I, Miki T.

A novel alternative splice variant of nicastrin and its implication in Alzheimer disease.

Life Sci. 78(21):2444-8, 2006.

8) Satoh K, Hata M, Takahara S, Tsuzaki H, Yokota H, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Yamada T.

A novel membrane protein, encoded by the gene

covering KIAA0233, is transcriptionally induced in senile plaque-associated astrocytes.

Brain Res. In press, 2006.

9) Waragai M, Wei J, Fujita M, Nakai M, Ho GJ, Masliah E, Akatsu H, Yamada T, Hashimoto M.

Increased level of DJ-1 in the cerebrospinal fluids of sporadic Parkinson's disease.

Biochem Biophys Res Commun. 345(3):967-72, 2006.

学会発表

1) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行、丸山将浩、田代学、舟木善仁、石川洋介、加藤元久、赤津裕康、山本孝之、成田勉、古川勝敏、岩田錬、伊藤正敏、谷内一彦、荒井哲行

アルツハイマー病の早期診断のためPETプローブの開発

東北大学先進行医工学研究機構第2回公開シンポジウム(2006.1.24)

2) 赤津裕康、松本光弘、宮本圭子、山本淑子、芦田欣也、高見正雄、小橋修

胃瘻造設患者へのタンパク質補給食品（メイプロテイン）の栄養介入による栄養改善効果

第21回日本静脈経腸栄養学会(2006.1.27)

3) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之

アミロイド β 蛋白の画像化によるアルツハイマー病の早期診断

痴呆を語る会(2006.2.18)

4) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之

PETによる β アミロイドイメージングの可能性

第35回日本神経放射線学会(2006.2.23)

5) 赤津裕康、宮本圭子、谷水清美、山本淑子、小橋修、山本孝之

栄養療法にて肝性脳症をコントロールし得た末期肝癌例

第6回愛知NST研究会(2006.2.25)

6) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之

β アミロイドイメージングAD研究会画像診断サブコミティ(2006.2.4)

7) 澤田徹、岡村信行、工藤幸司、谷内一彦、赤津裕康、山本孝之

アミロイドイメージング用PETプローブの開発とその臨床応用

第79回日本薬理学会年会(2006.3.10)

8) 山縣英久、鐘望涛、田口敬子、名倉潤、川尻真和、秦龍二、赤津裕康、紙野晃人、武田雅俊、三木哲郎

519候補遺伝子アプローチによるアルツハイマー病関連遺伝子の探索

日本内科学会総会(2006.4.14-16)

9) 山縣英久、鐘望涛、田口敬子、赤津裕康、紙野晃人、川尻真和、武田雅俊、三木哲郎

PE-305リンパ球特異的蛋白チロシンキナーゼはアルツハイマー病の新規リスク遺伝子である

日本神経学会(2006.5.11-13)

10) 三木哲郎、山縣英久、満田憲昭、鐘望涛、青木守、赤津裕康、紙野晃人、武田雅俊、小原克彦、小阪憲司

PE-306ニカストリン遺伝子スプライス変異と確実例アルツハイマー病の関連

日本神経学会(2006.5.11-13)

11) 赤津裕康、水上勝義、石井俊、山本孝之、小阪憲司、片桐拓也、内田和彦、朝田隆

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

日本精神神経学会(2006.5.11-13)

12) 赤津裕康、三室マヤ、中澤秀嘉、松川則之、山本孝之、堀映、吉田眞理、小阪憲司、橋詰良夫

Amyloid angiopathy を 伴 っ た Orthochromatic(sudanophilic) leukodystrophy の一例

第47回日本神経病理学会(2006.5.24-26)

13) Hiroyasu Akatsu, Hidehisa Yamagata, Jun Kawamata, Kouzin Kamino, Masatoshi Takeda, Takayuki Yamamoto, Tetsuro Miki, Ikuo, Shun Shimohama, Kenji Kosaka

Variations in the Brain-Derived Neurotrophic Factor(BDNF) Gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease(AD) or Dementia with Lewy bodies(DLB) in Japan

第一回国際ブレインバンク会議(2006.6.13-15)

14) Kazuki Satoh, Mitsumi Hata, Seiji Takahara, Tomoko Shimizu, Hidetoshi Tsuzaki, Hiroshi Yokota, Hiroyasu Akatsu, Takayuki Yamamoto, Kenji Kosaka and Tatsuo Yamada

Novel genes transcriptionally induced in senile-

plaque associated astrocytes

第20回国際生化学・分子生物学会議/第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議/第79回日本生化学会大会、第29回日本分子生物学会年会および第59回日本細胞生物学会大会との共同開催(2006.6.18-23)

15) Hiroyasu Akatsu, Masahiro Umezu, Takashi Ishii, Hideyuki Suzuki, Takayuki Yamamoto, Takuya Katagiri, Katsuyosi Mizukami, Takashi Asada, Kenji Kosaka, Kazuhiro Uchida

Proteome analysis of choroid plexus in Alzheimer's disease

第20回国際生化学・分子生物学会議/第11回アジア・オセアニア生化学者・分子生物学者連合会議/第79回日本生化学会大会、第29回日本分子生物学会年会および第59回日本細胞生物学会大会との共同開催(2006.6.18-23)

16) Saori Hata, Yoichi Araki, Hiroyasu Akatsu, Katsuya Urakami, Masaki Nishimura, Tadashi Nakaya, Toshiharu Suzuki

■-Alc■, metabolic products of Alcadein, as a novel diagnostic marker in CSF of Alzheimer's disease

国際アルツハイマー学会(2006.7.15-20)

17) Hiroyasu Akatsu, Masahiro Umezu, Takashi Ishii, Hideyuki Suzuki, Takuya Katagiri, Katsuyosi Mizukami, Takashi Asada, Kenji Kosaka, Kazuhiro Uchida

Choroid plexus proteome analysis in Alzheimer disease

ICGP 6th Annual Meeting(2006.10.3-6)

18) Ikuo Tooyama, Tomoko Kato, Yoshihiro Konishi, Shun Shimohama, Teruyuki Tsuji, Hiroyasu Akatsu

The interaction of ■1-chimaerin protein with ■-amyloid in culture cells

ICGP 6th Annual Meeting(2006.10.3-6)

19) Nobuyuki Okamura, Yukitsuka Kudo, Shozo Furumoto, Katsutoshi Furukawa, Manabu Tashiro, Motohisa Kato, Hiroyasu Akatsu, Tohru Sawada, Kazuhiko Yanai, Hiroyuki Arai

In vivo imaging of amyloid plaques in the brain: [11C]BF-227 PET study.

ICGP 6th Annual Meeting(2006.10.3-6)

20) Kazuki Satoh, Mitsumi Hata, Seiji Takahara, Tomoko Shimizu, Hidetoshi Tsuzaki, Hiroshi Yokota,

Hiroyasu Akatsu, Takayuki Yamamoto, Kenji
Kosaka and Tatsuo Yamada

Novel genes transcriptionally induced in senile-
plaque associated astrocytes

第36回米国ニューロサイエンス(2006.10.14-18)

21) 赤津裕康、三室マヤ、谷由章、山本孝之、堀
映、橋詰良夫

パーキンソニズムと認知症状を伴った1剖検例

第34回臨床神経病理懇話会(2006.11.18-19)

知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 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」

2. 共同発明者 「三浦 裕、川口誠、赤津裕康、
小阪憲司、西野仁雄」

3. 出願番号「特願2005-60654」

4. 出願日 平成17年4月4日

実用新案登録

なし

その他

なし