

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテラーメイド研究

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 道川 誠

平成20（2008）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	-----12
道川 誠	
2. 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	-----16
赤津裕康	
3. CYP46トランスジェニックマウス作製に関する研究	-----20
藤野貴広	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----24
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----28

# I.総括研究報告 (平成 19 年度)

アルツハイマー病発症の危険因子であり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

主任研究者 道川 誠

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：  
ヒトゲノムテラーメイド研究事業）

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

研究要旨

道川：ApoE は脳における主要なコレステロール輸送を担う蛋白であり、主にアストロサイトで産生される。コレステロールはニューロンの可塑性維持、修復のみならず A $\beta$  産生にも影響することが報告されている。昨年度、我々は ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構について解析し、①HDL 産生能は N 末端ドメインのみでアイソフォーム依存的であること、②C 末端ドメインは N 末端ドメインの HDL 産生能を相加的に修飾するが ApoE4 ではドメイン間相互作用により効果が消失することを報告した。しかし、①の分子機構は明らかではない。一方、他の危険因子である高ホモシステイン(HC)血症の AD 発症におけるメカニズムは不明である。HC は SH 基を持つことから、ApoE3 の持つシステインの SH 基と反応し、その HDL 産生作用に影響する可能性を考えた。本年度の研究から、①②については、ApoE3 の二量体化という分子間相互作用ならびにドメイン間相互作用という分子内相互作用の 2 つの作用の有無に起因することが明らかとなった。また AD 危険因子である HC は ApoE3 の二量体化を阻害し、ApoE3 の HDL 産生能を ApoE4 レベルまで下げてしまうことを明らかにした。以上の結果から、2 つの AD 危険因子 (ApoE4 と高ホモシステイン血症) は、同じ分子機構 (ApoE による HDL 産生能力の高低) によって AD 発症に関与している可能性が考えられる。赤津：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、A $\beta$  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った。方法：血液・髄液中のコレステロール、アンジオテンシン変換酵素 (ACE)、トロンビン活性化線溶阻止因子 (TAFI) の解析および脈絡叢凍結サンプルの発現蛋白解析を行った。結果：血液・髄液中でのコレステロール解析では疾患群間での傾向を得ることができた。血液での ACE 活性は現在データを解析中である。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 14 例での解析を終え、質量分析に入る予定である。考察：ヒト組織を用いてのコレステロール/A $\beta$  代謝を中心とした髄液・血液・脳組織での解析において髄液・血清での解析ではある程度のデータを得ることができた。脈絡叢プロテオーム解析も発現差異のある候補因子が終わり同定により病態解明の一助となることが期待できる。藤野：NSE (Neuron Specific Enolase) プロモーター下流に CYP46A1・myc cDNA を連結したトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。得られた 26 個体の 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。約 3 ヶ月齢及び 6 ヶ月齢の Tg マウス血清及び脳組織中のコレステロール含量を測定したが、同腹野生型との間に有意な差は見いだせなかった。また、組織解析でも異常は観察されなかった。24-水酸化コレステロールの 7 位を水酸化する CYP39A1 及び CYP7B1・cDNA を単離し、アデノウィルスベクターに組み込んだ。CHO 細胞に感染させ、25-水酸化コレステロールを基質として活性を測定したところ、非常に高い発現が観察された。しかし、CYP46A1 を CYP39A1 又は CYP7B1 を同時に CHO 細胞に発現させたが、7、24-水酸化コレステロール生成の増加は観察されなかった。脳神経系から余剰なコレステロールの排出においては CYP46A1 による 24-水酸化コレステロールの生成段階が律速になっていることを示唆した。

**A. 研究目的:**(道川)本研究では、脳内 HDL 産生制御を介して脳内コレステロール代謝の調節法を開発し、脳内コレステロール代謝を調節することでアルツハイマー病の予防・治療法の確立を目指す。本年度は、具体的に以下の2点について解明を進めた。1)N 末端ドメインのみで生じる ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構の主要メカニズムを検討した。2)もう一つの AD 危険因子である高 HC 血症の発症メカニズムを ApoE3 に対する影響の観点から検討した。(赤津)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抜けける 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は不十分である。また A $\beta$  代謝においてもネプリライシン(NEP)が重要な働きをしているが主任研究者と共に他の分解酵素の検討をヒトサンプルを用いて行う。

## B. 研究方法

(道川)ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構については、ApoE4 はシステインを持た

ないために二量体を形成できない点に着目し、ApoE3 の二量体を作製し、単体ならびに二量体による HDL 産生作用を検討した。また、HC の ApoE3 二量体形成に対する作用を生化学的に解析した。さらに HC 処理した ApoE3 による HDL 産生を、HC とインキュベーション(HC 処理)後に透析した ApoE を用いて検討した。(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) ACE 活性測定、d) 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。

(藤野)NSE プロモーター及び SV40 イントロン配列下流に CYP46A1・myc cDNA と SV40 ポリ A 付加配列を連結した Tg マウス作成用ミニゲンを 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作製した。Tg マウスのスクリーニングは特異的プライマーを用いた 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法で行った。組織中及び血清中のコレステロール濃度はコレステロール測定キットを用いて定量化した。また、Tg マウスの組織はパラホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋切片を作製し、組織染色及び免疫組織染色に供した。

マウス脳又は肝臓・mRNA を鋳型として RT-PCR 法によりマウス CYP39A1 及び CYP7B1・cDNA を増幅し、更に PCR 法により C 末に HA-tag を挿入した。シーケンスにより配列を確認後、アデノウイルスベクターに組み込み、CHO 細胞に感染させることで、CYP39A1 及び CYP7B1 活性を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。特に動物実験については当施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

### C. 研究結果

(道川)①ApoE3 二量体による HDL 産生作用は ApoE3 単体や ApoE4 (単体で存在)と比較して有意に強い。②HC 処理した ApoE3 の HDL 産生は、処理しない ApoE3 に比し有意に減少した。しかし、ApoE4 の作用には影響しなかった。③HC は濃度依存的に ApoE3 の二量体化を阻害した。アルツハイマー病(AD)の危険因子としてアポリポ蛋白 E(ApoE) 4 と高ホモシステイン(HC)血症が知られている。今年度は、この 2 つの異なる危険因子が同じ分子機構(ApoE による HDL 産生能力の高低)によって AD 発症に関与する可能性を示す結果を得た。ApoE3 型の人で高ホモシステイン血症を発症している場合、アルツハイマー病発症抑制の観点から積極的に治療する必要があると考えられた(テーラーメイド医療)。

(赤津) 1. 発現遺伝子・蛋白解析;

a) TAFI の正常人での解析を行い報告した。ACE に関してはヒト脳組織での遺伝子・蛋白レベルでの AD 症例での発現低下を認め主任研究者共に報告した。また血液中の活性測定も終了し解析中である。

c) 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た。d) 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し、一部同定が終了

した。(藤野)NSE (Neuron Specific Enolase) プロモーター下流に CYP46A1・myc cDNA を連結したトランスジェニック (Tg) マウスを作製した。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。この 2 系統において、約 3ヶ月齢及び 6ヶ月齢の Tg マウス血清及び脳組織中のコレステロール含量を測定したが、同腹野生型との間に有意な差は見いだせなかった。また、各マウス脳のパラフィン包埋切片を作製し、組織染色及び免疫組織染色により解析を行ったが、いずれのマウスでも異常は観察されなかった。

24-水酸化コレステロールの 7 位を水酸化する CYP39A1 及び CYP7B1・cDNA を単離し、HA-tag を付加した後にアデノウイルスベクターに組み込んだ。CHO 細胞に感染させ、抗 HA-tag 抗体を用いたイムノブロットによりタンパク質の発現、25-水酸化コレステロールを基質として活性を測定した。いずれの酵素も、その発現量の増加に伴って酵素活性の増加も観察された。一方、CYP46A1 と共に CYP39A1 又は CYP7B1 を同時に CHO 細胞に発現させた所、24-水酸化コレステロールから 7、24-水酸化コレステロール生成の増加は観察されたものの、コレステロールから 7、24-水酸化コレステロール生成の増加には繋がらなかった。

### D. 考察

(道川)アポリポ蛋白E(ApoE)4と高ホモシステイン(HC)血症が知られている。今年度は、この2つの異なる危険因子が同じ分子機構(ApoE)によるHDL産生能力の高低)によってAD発症に関与する可能性を示す結果を得た。ApoE3型の人で高ホモシステイン血症を発症している場合、アルツハイマー病発症抑制の観点から積極的に治療する必要があると考えられた(テーラーメイド医療)。(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をヒトサンプルで集積している。またA $\beta$ 分解代謝機構でもNEP以外の酵素の役割が明らかとなった。

(藤野)脳神経系でCYP46A1を高発現する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5系統のみが脳においてmCYP46A1・mycを発現していた。この発現はイムノブロットによる解析から、それほど高い発現量ではなかった。この結果は、Tgマウス血清及び脳組織中のコレステロール含量や組織染色及び免疫組織染色による解析で、同腹野生型マウスとの間で違いが見られなかった結果と一致する。通常、24-水酸化コレステロールはヒト及びマウス血中ではほとんど検出されない。24-水酸化コレステロールは更に水溶性の高い7、24-水酸化コレステロールへと素早く変換され、肝臓において胆汁酸へと代謝されるためである。一方、CYP7B1欠損患者では血清中の24-水酸化コレステロールと共に25-及び27-水酸化コレステロール値が高くなることが示されている。そこで、24-水酸化コレステロールの7位を水酸化し、7、24-水酸化コレステロールを生成するCYP7B1及びCYP39A1が、CYP46A1活性に及ぼす影響を観察するために、これらのcDNAを組み込んだアデノ

ウイルスベクターを構築し、CHO細胞に感染させた。25-水酸化コレステロールを基質として活性を測定したところ、非常に高い発現が観察された。しかし、CYP46A1をCYP39A1又はCYP7B1を同時にCHO細胞に発現させたが、7、24-水酸化コレステロール生成の増加は観察されなかった。これらの結果は、脳神経系から余剰なコレステロールの排出においてはCYP46A1による24-水酸化コレステロールの生成段階が律速になっていることを示唆した。

## E. 結論

(道川)(1) ApoEアイソフォーム依存的HDL産生機構は、ApoE3の二量体化という分子間相互作用ならびにドメイン間相互作用という分子内相互作用の2つの作用の有無に起因する。(2) AD危険因子であるHCはApoE3の二量体化を阻害し、ApoE3のHDL産生能をApoE4レベルまで下げてしまうためである。(3) 以上の結果から、我々は、2つのAD危険因子(ApoE4と高ホモシステイン血症)のAD発症機構における役割を、同じ分子機構(ApoE)によるHDL産生能力の高低)から説明できるのではないかと仮説を提案する。(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・A $\beta$ 分解代謝関連因子の検索を行い、その機構解明を行いAD発症因子の解明、診断・治療法に一石を投じることができるはずである。(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。比較的CYP46A1の発現が高い2系統において、約3ヶ月齢及び6ヶ月齢のTgマウス血清及び脳組織中のコレステロール含量を測定したが、同腹野生型との

間に有意な差は見いだせなかった。また、組織染色及び免疫組織染色により解析を行ったが、いずれのマウスでも異常は観察されなかった。24-水酸化コレステロールの7位を水酸化するCYP39A1及びCYP7B1・cDNAをCHO細胞に導入し、25-水酸化コレステロールを基質として活性を測定した。いずれの酵素も、その発現量の増加に伴って酵素活性の増加も観察された。一方、CYP46A1と共にCYP39A1又はCYP7B1を同時にCHO細胞に発現させた所、24-水酸化コレステロールから7、24-水酸化コレステロール生成の増加は観察されたものの、コレステロールから7、24-水酸化コレステロール生成の増加には繋がらなかった。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Zou K, Hosono T, Nakamura T, Shiraishi H, Maeda T, Komano H, Yanagisawa K, Michikawa M.

Novel role of presenilins in maturation and transport of integrin  $\beta$ 1.

*Biochemistry*, in press.

Zou K, Yamaguchi H, Akatsu H, Sakamoto T, Ko M, Mizoguchi K, Gong JS, Yu W, Yamamoto T, Kosaka K, Yanagisawa K, Michikawa M.

Angiotensin-converting enzyme converts amyloid  $\beta$ -protein1-42 ( $A\beta$ (1-42)) to  $A\beta$ (1-40), and its inhibition enhances brain

$A\beta$  deposition.

*J Neurosci.* 27(32):8628-8635, 2007.

Gong JS, Morita SY, Kobayashi M, Handa T, Fujita SC, Yanagisawa K, Michikawa M.

Novel action of apolipoprotein E (ApoE): ApoE isoform specifically inhibits lipid-particle-mediated cholesterol release from neurons.

*Mol Neurodegener.* 2:9, 2007.

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

A ganglioside-induced toxic soluble  $A\beta$  assembly. Its enhanced formation from  $A\beta$  bearing the Arctic mutation.

*J Biol Chem.* 282(4):2646-2655, 2007.

Akatsu, H. et al. Plasma levels of unactivated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) are down-regulated in young adult women: analysis of a normal Japanese population. *Microbiol Immunol* 51, 507-17 (2007).

Kanai, Y., Akatsu, H., Iizuka, H. & Morimoto, C. Could serum antibody to poly(ADP-ribose) and/or histone H1 be marker for senile dementia of Alzheimer type? *Ann N Y Acad Sci* 1109, 338-44 (2007).

Kimura, R. et al. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau

- phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 16, 15-23 (2007).
- Makino, S. et al. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet* 80, 393-406 (2007).
- Nakai, M. et al. Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 104-110 (2007).
- Waragai, M. et al. Plasma levels of DJ-1 as a possible marker for progression of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 425, 18-22 (2007).
- Wei, J. et al. Enhanced lysosomal pathology caused by beta-synuclein mutants linked to dementia with Lewy bodies. *J Biol Chem* 282, 28904-14 (2007).
- Zou, K. et al. Angiotensin-converting enzyme converts amyloid beta-protein 1-42 (Abeta(1-42)) to Abeta(1-40), and its inhibition enhances brain Abeta deposition. *J Neurosci* 27, 8628-35 (2007).
- Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada T, Arai H, Kudo Y and Yanai K.
- Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer's disease
- Geriatrics & Gerontology International*. 27, 393-400 (2007)
2. 学会発表  
道川 誠(アルツハイマー病研究部)  
名古屋市立大学大学院薬学部オープンキャンパス「アルツハイマー病研究の歴史と進展」  
名古屋市立大学大学院薬学部. 名古屋. 2007年6月16日.
- 道川 誠(アルツハイマー病研究部)  
東京医科歯科大学医学部臨床講義「アルツハイマー病」東京医科歯科大学医学部. 東京. 2007年7月6日.
- Akatsu H, Okazaki M, Itoh J, Yamamoto T, Micikawa M, Yokoyama S.
- Analysis of lipoprotein in cerebro-spinal fluid of Alzheimer's disease patients using HPLC.  
日本神経化学会大会、2007年9月10日、横浜
- Minagawa H, Gong J-S, Nakamura T, Zou K, Lund-Katz S, Phillips M, Saito H, Michikawa M.
- Isoform-dependent effect of apolipoprotein E on cholesterol efflux.  
日本神経化学会大会、2007年9月11日、横浜
- Michikawa M.

Apolipoprotein E-isoform-specific modulation of cholesterol metabolism in neurons.

日本神経化学会大会(シンポジウム発表)、2007年9月12日、横浜

K. ZOU, H. YAMAGUCHI, H. AKATSU, T. SAKAMOTO, M. KO, K. MIZOGUCHI, J.-S. GONG, W. YU, T. YAMAMOTO, K. KOSAKA, K. YANAGISAWA, MICHIKAWA M

Angiotensin-converting enzyme converts A $\beta$ 1-42 to A $\beta$ 1-40 and its inhibition enhances brain A $\beta$  deposition. San Diego Convention Center, USA, Nov 6, 2007

H. MINAGAWA, A. WATANABE, J.-S. GONG, K. ZOU, T. NAKAMURA, S. LUND-KATZ, M. C. PHILLIPS, H. SAITO, M. MICHIKAWA

Mechanism underlying apolipoprotein E isoform-dependent lipid efflux from cultured neurons

San Diego Convention Center, USA, Nov 6, 2007

N. YAMAMOTO, E. MATSUBARA, S. MAEDA, H. MINAGAWA, A. TAKASHIMA, M. MICHIKAWA, K. YANAGISAWA

A ganglioside-induced soluble A $\beta$  assembly causes neuronal death through NGF receptors

San Diego Convention Center, USA, Nov 5, 2007

H. Sun, Y. Okamoto, T. Kawarabayashi, T. Yokoseki M. Shibata, M. Morishimas, Y. Saito, S. Murayama, Y. Ihara, M. Shoji M. M Michikawa, E. Matsubara

Characterization of therapeutic antibody against A $\beta$  oligomers for Alzheimer's disease. San Diego Convention Center, USA, Nov 5, 2007

I. C. TESSEUR, Y. HUANG, J. CORN, J.-S. GONG, K. YANAGISAWA, M. MICHIKAWA, K. WEISGRABER, T. WYSS-CORAY

Transforming growth factor-beta1 associates with apoE-containing high-density lipoproteins: implications for neurodegeneration

San Diego Convention Center, USA, Nov 6, 2007

道川 誠

脳内コレステロール代謝制御とその破綻に起因する神経細胞障害

第30回日本分子生物学会年会および第80回日本生化学会大会、シンポジウム、2007年12月13日、横浜

Marutani T, Maeda T, Kokame K, Zou K, Michikawa M, Komano H.

ER stress inducible protein, Herp, is involved in the degradation of the cofactor of gamma-secretase complex.

第30回日本分子生物学会年会および第80回日本生化学会大会、シンポジウム、2007年12月14日、横浜

Zou K, Yamaguchi H, Akatsu H, Sakamoto T, Ko M, Mizoguchi K, Gong JS, Yu W, Yamamoto T, Koska K, Komano H, Yanagisawa K, Michikawa M.

Angiotensin-converting enzyme converts Abeta1-42 to Abeta1-40 and its inhibition enhances brain Abeta deposition.

第30回日本分子生物学会年会および第80回日本生化学会大会、シンポジウム、2007年12月14日、横浜

道川 誠

アルツハイマー病研究の最前線と未来(財)中部科学技術センター主催「プロジェクト形成研究会 E-アルツハイマー病の血液診断法の開発」第5回研究会  
名古屋、平成20年1月24日、

中井雅晶、藁谷正明、藤田雅代、魏建設、洲鎌秀永、赤津裕康、丸山千秋、岡戸晴生、橋本款

赤芽球および赤血球における $\alpha$ -シヌクレインの発現  
第143回日本獣医学会学術集会(2007.4.3-5)

赤津裕康、小川倫弘、水上勝義、石井俊、鈴木秀昭、片桐拓也、山本孝之、小阪憲司、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  
第3回日本臨床プロテオーム研究会(2007.4.28)

赤津裕康、山縣英久、和氣現人、渡部一郎、木村尚人、鎌田一億、宮崎龍彦、田邊敬貴、三木哲郎、山本孝之、堀映、三室マヤ、吉田眞理、橋詰良夫

プレセニン1遺伝子変異(G266S)を同定した家族性アルツハイマー病の初剖検例 第48回日本神経病理学会総会学術研究会(2007.5.30-6.1)

赤津裕康、小川倫弘、水上勝義、石井俊、鈴木秀昭、片桐拓也、山本孝之、小阪憲司、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  
日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第5回大会(2007.7.30-31)

赤津裕康、山本孝之、岡崎三代 道川誠、伊藤仁一、横山信治

ゲルろ過 HPLC 法によるアルツハイマー病患者髄液を中心とした蛋白質およびリポ蛋白質解析  
第50回日本神経化学会: Neuro2007(2007.9.10-12)

Hiroyasu Akatsu, Takeshi Kanesaka, Yoshiyuki Tani, Tokiko Ogawa, Hiroshi Kiyama, Ryuji Hata, Masayuki Sakanaka, Takayuki Yamamoto, Akira Hori

Tissue analysis of growth hormone (GH) and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ MSH) in pituitaries of Alzheimer's patients (AD) 第26回日本認知症学会: IPA 2007 Osaka Silver Congress(2007.10.17-18)

赤津裕康、石黒雅江、小川倫弘、兼坂岳 岡  
田則子、山本孝之、岡田秀親

トロンビン活性化線溶阻止因子(TAFI)の正常  
者血漿中濃度解析

第30回日本血栓止血学会(2007.11.15-17)

赤津裕康、松本光弘、越智基、谷由章、Ying  
Liu、吉田眞理、杵野謙次、山本孝之、堀 映、  
橋詰良夫

認知症を示した成人型Intranuclear inclusion  
body diseaseの一例検例

第35回臨床神経病理懇話会(2007.11.17-18)

堀 映、赤津裕康、谷由章、橋詰良雄

一側眼球摘出後の同側外側膝状体における  
transneuronal変性

第35回臨床神経病理懇話会(2007.11.17-18)

王衆、松田正司、劉明哲、田中ゆき、藤野貴  
広

中枢神経系に於けるリポタンパク受容体の機  
能解析

第 62 回 日本解剖学会 中国・四国支部学術  
集会

2007 年 10 月 27-28 日、倉敷

Takahiro Fujino, Mingzhe Liu, Zhong  
Wang, Yuki Tanaka

**Molecular Characterization of Xenobiotics  
Acyl-CoA Synthetases**

International symposium on biological  
responces to chemical pollutants

グローバル COE 国際シンポジウム

2008 年 3 月 6-7 日、松山

藤野貴広、西村豊樹、劉明哲、王衆、田中ゆ  
き、能勢真人

Fraser 症候群様表現型を示す新規変異マウス  
の解析

日本農芸化学会 2008 年度大会

2008 年 3 月 27-29 日、名古屋

王衆、松田正司、劉明哲、田中ゆき、藤野貴  
広

中枢神経系に於けるリポタンパク受容体の機  
能解析 第 113 回 日本解剖学会総会

2007 年 10 月 27-28 日、大分県由布市

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：  
ヒトゲノムテーラーメイド研究事業）

(分担)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

**研究要旨**

ApoE は脳における主要なコレステロール輸送を担う蛋白であり、主にアストロサイトで産生される。コレステロールはニューロンの可塑性維持、修復のみならず Aβ 産生にも影響することが報告されている。昨年度、我々は ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構について解析し、①HDL 産生能は N 末端ドメインのみでアイソフォーム依存的であること、②C 末端ドメインは N 末端ドメインの HDL 産生能を相加的に修飾するが ApoE4 ではドメイン間相互作用により効果が消失することを報告した。しかし、①の分子機構は明らかではない。一方、他の危険因子である高ホモシステイン(HC)血症の AD 発症におけるメカニズムは不明である。HC は SH 基を持つことから、ApoE3 の持つシステインの SH 基と反応し、その HDL 産生作用に影響する可能性を考えた。本年度の研究から、①②については、ApoE3 の二量体化という分子間相互作用ならびにドメイン間相互作用という分子内相互作用の 2 つの作用の有無に起因することが明らかとなった。また AD 危険因子である HC は ApoE3 の二量体化を阻害し、ApoE3 の HDL 産生能を ApoE4 レベルまで下げてしまうことを明らかにした。以上の結果から、2 つの AD 危険因子 (ApoE 4 と高ホモシステイン血症) は、同じ分子機構(ApoE による HDL 産生能力の高低)によって AD 発症に関与している可能性が考えられる。

**A. 研究目的：**本研究では、脳内 HDL 産生制御を介して脳内コレステロール代謝の調節法を開発し、脳内コレステロール代謝を調節することでアルツハイマー病の予防・治療法の確立を目指す。本年度は、具体的に以下の 2 点について解明を進めた。1)N 末端ドメインのみで生じる ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構の主要メカニズムを検討した。2)もう一つの AD 危険因子である高 HC 血症の発症メカニズムを ApoE3 に対する影響の観点から検討した。

**B. 研究方法**

1) ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構については、ApoE4 はシステインを持

たないために二量体を形成できない点に着目し、ApoE3 の二量体を作製し、単体ならびに二量体による HDL 産生作用を検討した。

2) HC の ApoE3 二量体形成に対する作用を生化学的に解析した。さらに HC 処理した ApoE3 による HDL 産生を、HC とインキュベーション (HC 処理) 後に透析した ApoE を用いて検討した。

**(倫理面への配慮)**

本研究は、当該施設の倫理委員会の承認を受けて行った。特に動物実験については当該施設の実験規則ならびに動物愛護の精神に則って行い苦痛の防止にも留意した。

### C. 研究結果と D. 考察

①ApoE3 二量体による HDL 産生作用は ApoE3 単体や ApoE4 (単体で存在) と比較して有意に強い。

②HC 処理した ApoE3 の HDL 産生は、処理しない ApoE3 に比し有意に減少した。しかし、ApoE4 の作用には影響しなかった。

③HC は濃度依存的に ApoE3 の二量体化を阻害した。

アルツハイマー病(AD)の危険因子としてアポリポ蛋白 E(ApoE) 4 と高ホモシステイン(HC)血症が知られている。今年度は、この 2 つの異なる危険因子が同じ分子機構(ApoE による HDL 産生能力の高低)によって AD 発症に関与する可能性を示す結果を得た。ApoE3 型の人で高ホモシステイン血症を発症している場合、アルツハイマー病発症抑制の観点から積極的に治療する必要があると考えられた(テーラーメイド医療)。

### E. 結論

1) ApoE アイソフォーム依存的 HDL 産生機構は、ApoE3 の二量体化という分子間相互作用ならびにドメイン間相互作用という分子内相互作用の 2 つの作用の有無に起因する。

2) AD 危険因子である HC は ApoE3 の二量体化を阻害し、ApoE3 の HDL 産生能を ApoE4 レベルまで下げてしまうためである。

3) 以上の結果から、我々は、2 つの AD 危険因子(ApoE 4 と高ホモシステイン血症)の AD 発症機構における役割を、同じ分子機構(ApoE による HDL 産生能力の高低)

から説明できるのではないかという仮説を提案する。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Zou K, Hosono T, Nakamura T, Shiraishi H, Maeda T, Komano H, Yanagisawa K, Michikawa M.

Novel role of presenilins in maturation and transport of integrin  $\beta$ 1.

*Biochemistry*, in press.

Zou K, Yamaguchi H, Akatsu H, Sakamoto T, Ko M, Mizoguchi K, Gong JS, Yu W, Yamamoto T, Kosaka K, Yanagisawa K, Michikawa M.

Angiotensin-converting enzyme converts amyloid  $\beta$ -protein 1-42 ( $A\beta(1-42)$ ) to  $A\beta(1-40)$ , and its inhibition enhances brain  $A\beta$  deposition.

*J Neurosci.* 27(32):8628-8635, 2007.

Gong JS, Morita SY, Kobayashi M, Handa T, Fujita SC, Yanagisawa K, Michikawa M.

Novel action of apolipoprotein E (ApoE): ApoE isoform specifically inhibits lipid-particle-mediated cholesterol release from neurons.

*Mol Neurodegener.* 2:9, 2007.

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

A ganglioside-induced toxic soluble A $\beta$  assembly. Its enhanced formation from A $\beta$  bearing the Arctic mutation.  
*J Biol Chem.* 282(4):2646-2655, 2007.

2. 学会発表

道川 誠(アルツハイマー病研究部)  
名古屋市立大学大学院薬学部オープンキャンパス「アルツハイマー病研究の歴史と進展」名古屋市立大学大学院薬学部. 名古屋.  
2007年6月16日.

道川 誠(アルツハイマー病研究部)  
東京医科歯科大学医学部臨床講義「アルツハイマー病」東京医科歯科大学医学部. 東京.  
2007年7月6日.

Akatsu H, Okazaki M, Itoh J,  
Yamamoto T, Michikawa M,  
Yokoyama S.

Analysis of lipoprotein in  
cerebro-spinal fluid of  
Alzheimer's disease patients  
using HPLC.

日本神経化学会大会、2007年9月  
10日、横浜

Minagawa H, Gong J-S, Nakamura  
T, Zou K, Lund-Katz S, Phillips M,  
Saito H, Michikawa M.

Isoform-dependnent effect of  
apolipoprotein E on cholesterol  
efflux.

日本神経化学会大会、2007年9月  
11日、横浜

Michikawa M.

Apolipoprotein E-isoform-specific  
modulation of cholesterol  
metabolism in neurons.

日本神経化学会大会(シンポジウム発表)、2007年9月12日、横浜

K. ZOU, H. YAMAGUCHI, H. AKATSU,  
T. SAKAMOTO, M. KO, K. MIZOGUCHI,  
J.-S. GONG, W. YU, T. YAMAMOTO, K.  
KOSAKA, K. YANAGISAWA,

MICHIKAWA M

Angiotensin-converting enzyme converts  
A $\beta$ 1-42 to A $\beta$ 1-40 and its inhibition  
enhances brain A $\beta$  deposition. San  
Diego Convention Center, USA, Nov 6,  
2007

H. MINAGAWA, A. WATANABE, J.-S.  
GONG, K. ZOU, T. NAKAMURA, S.  
LUND-KATZ, M. C. PHILLIPS, H. SAITO,  
M. MICHIKAWA

Mechanism underlying apolipoprotein e  
isoform-dependent lipid efflux from  
cultured neurons

San Diego Convention Center, USA, Nov  
6, 2007

N. YAMAMOTO, E. MATSUBARA, S.  
MAEDA, H. MINAGAWA, A.

TAKASHIMA, M. MICHIKAWA, K.  
YANAGISAWA

A ganglioside-induced soluble Abeta  
assembly causes neuronal death through  
NGF receptors

San Diego Convention Center, USA, Nov 5, 2007

H. Sun, Y. Okamoto, T. Kawarabayashi, T. Yokoseki M. Shibata, M. Morishimas, Y. Saito, S. Murayama, Y. Ihara, M. Shoji M. M Michikawa, E. Matsubara  
Characterization of therapeutic antibody against A $\beta$  oligomers for Alzheimer's disease. San Diego Convention Center, USA, Nov 5, 2007

I. C. TESSEUR, Y. HUANG, J. CORN, J.-S. GONG, K. YANAGISAWA, M. MICHIKAWA, K. WEISGRABER, T. WYSS-CORAY  
Transforming growth factor-beta1 associates with apoE-containing high-density lipoproteins: implications for neurodegeneration  
San Diego Convention Center, USA, Nov 6, 2007

道川 誠

脳内コレステロール代謝制御とその破綻に起因する神経細胞障害  
第 30 回日本分子生物学会年会および第 80 回日本生化学会大会、シンポジウム、2007 年 12 月 13 日、横浜

Marutani T, Maeda T, Kokame K, Zou K, Michikawa M, Komano H.  
ER stress inducible protein, Herp, is involved in the degradation of

the cofactor of gamma-secretase complex.

第 30 回日本分子生物学会年会および第 80 回日本生化学会大会、シンポジウム、2007 年 12 月 14 日、横浜

ZouK, Yamaguchi H, Akatsu H, Sakamoto T, Ko M, Mizoguchi K, Gong JS, Yu W, Yamamoto T, Koska K, Komano H, Yanagisawa K, Michikawa M.

Angiotensin-converting enzyme converts Abeta1-42 to Abeta1-40 and its inhibition enhances brain Abeta deposition.

第 30 回日本分子生物学会年会および第 80 回日本生化学会大会、シンポジウム、2007 年 12 月 14 日、横浜

道川 誠

アルツハイマー病研究の最前線と未来(財)中部科学技術センター主催「プロジェクト形成研究会 E-アルツハイマー病の血液診断法の開発」第 5 回研究会  
名古屋、平成 20 年 1 月 24 日、

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：  
ヒトゲノムテーラーメイド研究事業）

(分担)研究報告書

分担研究者 赤津 裕康 福祉村病院長寿医学研究所 副所長

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、 $A\beta$  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：血液・髄液中のコレステロール、アンギオテンシン変換酵素（ACE）、トロンビン活性化線溶阻止因子(TAFI)の解析および脈絡叢凍結サンプルの発現蛋白解析を行った。

結果：血液・髄液でのコレステロール解析では疾患群間での傾向を得ることができた。血液での ACE 活性は現在データを解析中である。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 14 例での解析を終え、質量分析に入る予定である。

考察：ヒト組織を用いてのコレステロール/ $A\beta$  代謝を中心とした髄液・血液・脳組織での解析において髄液・血清での解析ではある程度のデータを得ることができた。脈絡叢プロテオーム解析も発現差異のある候補因子が終わり同定により病態解明の一助となることが期待できる。

B. 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は不十分である。  
また  $A\beta$  代謝においてもネプリライシン (NEP) が重要な働きをしているが主任研究者と共に他の分解酵素の検討をヒトサンプルを用いて行う。

C. 研究方法

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) ACE 活性測定、d) 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。

D. 研究結果

1. 発現遺伝子・蛋白解析；

a) TAFI の正常人での解析を行い報告した。

b) ACE に関してはヒト脳組織での遺伝子・蛋白レベルでの AD 症例での発現低下を認め主任研究者共に報告した。また

血液中の活性測定も終了し解析中である。

c) 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た。

d) 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し、一部同定が終了した。

#### E. 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をヒトサンプルで集積している。また A $\beta$  分解代謝機構でも NEP 以外の酵素の役割が明らかとなった。

#### F. 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・A $\beta$  分解代謝関連因子の検索を行い、その機構解明を行い AD 発症因子の解明、診断・治療法に一石を投じることができるはずである。

#### G. 健康危険情報

なし。

#### H. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Akatsu, H. et al. Plasma levels of unactivated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) are down-regulated in young adult women:

analysis of a normal Japanese population. *Microbiol Immunol* 51, 507-17 (2007).

2. Kanai, Y., Akatsu, H., Iizuka, H. & Morimoto, C. Could serum antibody to poly(ADP-ribose) and/or histone H1 be marker for senile dementia of Alzheimer type? *Ann N Y Acad Sci* 1109, 338-44 (2007).

3. Kimura, R. et al. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum Mol Genet* 16, 15-23 (2007).

4. Makino, S. et al. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet* 80, 393-406 (2007).

5. Nakai, M. et al. Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 104-110 (2007).

6. Waragai, M. et al. Plasma levels of DJ-1 as a possible marker for progression of sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 425, 18-22 (2007).

7. Wei, J. et al. Enhanced lysosomal pathology caused by beta-synuclein

mutants linked to dementia with Lewy bodies. *J Biol Chem* 282, 28904-14 (2007).

8. Zou, K. et al. Angiotensin-converting enzyme converts amyloid beta-protein 1-42 (Abeta(1-42)) to Abeta(1-40), and its inhibition enhances brain Abeta deposition. *J Neurosci* 27, 8628-35 (2007).

9. Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada T, Arai H, Kudo Y and Yanai K.

Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer's disease

*Geriatrics & Gerontology International*. 27, 393-400 (2007)

## 2. 学会発表

1) 中井雅晶、藁谷正明、藤田雅代、魏建設、洲鎌秀永、赤津裕康、丸山千秋、岡戸晴生、橋本款

赤芽球および赤血球における $\alpha$ -シヌクレインの発現

第143回日本獣医学会学術集会 (2007.4.3-5)

2) 赤津裕康、小川倫弘、水上勝義、石井俊、鈴木秀昭、片桐拓也、山本孝之、小阪憲司、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

第3回日本臨床プロテオーム研究会 (2007.4.28)

3) 赤津裕康、山縣英久、和氣現人、渡部一郎、木村尚人、鎌田一億、宮崎龍彦、田邊敬貴、三木哲郎、山本孝之、堀映、三室マヤ、吉田眞理、橋詰良夫

プレセニン1遺伝子変異(G266S)を同定した家族性アルツハイマー病の初剖検例

第48回日本神経病理学会総会学術研究会 (2007.5.30-6.1)

4) 赤津裕康、小川倫弘、水上勝義、石井俊、鈴木秀昭、片桐拓也、山本孝之、小阪憲司、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

日本ヒトプロテオーム機構(JHUPO)第5回大会(2007.7.30-31)

5) 赤津裕康、山本孝之、岡崎三代道川誠、伊藤仁一、横山信治

ゲルろ過 HPLC 法によるアルツハイマー病患者髄液を中心とした蛋白質およびリポ蛋白質解析

第50回日本神経化学会 : Neuro2007 (2007.9.10-12)

6) Hiroyasu Akatsu, Takeshi Kanetsaka, Yoshiyuki Tani, Tokiko Ogawa, Hiroshi Kiyama, Ryuji Hata, Masayuki Sakanaka, Takayuki Yamamoto, Akira Hori

Tissue analysis of growth hormone (GH) and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ MSH) in pituitaries of Alzheimer's patients (AD)

第26回日本認知症学会 : IPA 2007 Osaka Silver Congress (2007.10.17-18)

7) 赤津裕康、石黒雅江、小川倫弘、兼坂岳 岡田則子、山本孝之、岡田秀親