

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21317

研究課題名(和文) コレステロール代謝異常によるアルツハイマー疾患発症の解析

研究課題名(英文) Analysis of Alzheimer's disease induced by abnormal cholesterol metabolism

研究代表者

山室 大介 (YAMAMURO, DAISUKE)

自治医科大学・医学部・リサーチ・レジデント

研究者番号：20739255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NCEH1が脳内CE量および24S-HC量を調節することで、A 沈着などのAD発症に関与するかどうかを細胞実験および動物実験から検証した。その結果、細胞レベルではNCEH1とADとの関連が実証されなかったが、in vivo レベルでのNCEH1欠損によるester体の蓄積がAD発症の原因因子であるA の沈着さらには記憶障害へと関連することが示唆された。今後、NCEH1 欠損におけるCEおよび24S-HC ester蓄積によるA 沈着のメカニズムを解明することにより、新規AD発症因子の発見、さらには新たな創薬ターゲットの提示に繋がることが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、in vivo レベルでのNCEH1欠損によるester体蓄積がアルツハイマー疾患発症の原因因子であるA 沈着さらには記憶障害へと関連することが動物実験から示唆された。脂質代謝酵素とAD発症との関連研究はまだ未開拓な領域であり、CE水解活性を触媒するNCEH1に着目した研究報告はないことから、本研究をさらに発展させることができれば、新たなアルツハイマー発症因子の発見、さらにはアルツハイマー疾患治療薬へと成り得る創薬ターゲットの提示に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether NCEH1 is involved in Alzheimer's disease (AD) development such as amyloid (A ) deposition by regulating brain CE and 24S-HC levels from both in vitro and in vivo experiments. As a result, the relationship between NCEH1 and AD was not demonstrated at in vitro experiments. In vivo experiments suggested that the accumulation of CE and 24S-HC ester induced NCEH1 deficiency was caused A deposition (which is the risk factor of AD) and memory impairment. In the future, it can be expected to lead to the discovery of new AD risk factors and the presentation of new drug targets by elucidating the mechanism of A deposition induced by CE and 24S-HC ester accumulation.

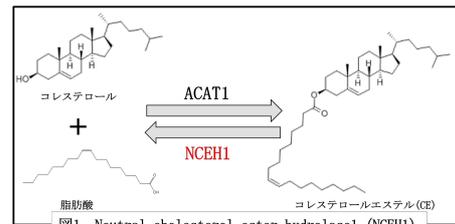
研究分野：内分泌代謝

キーワード：アルツハイマー アミロイド オキシステロール 24S-HC

1. 研究開始当初の背景

コレステロール酸化代謝物であるオキシステロール類はヒトを含むほ乳類の生体機能の調節に必須の役割を担っている。近年、多くの疾患と脂質代謝の関連については注目されているものの、まだその詳細は明らかにされていない。脳は血液脳関門によって肝臓からコレステロール供給を受けることはできないため、ニューロンは独自に合成したコレステロールを利用している。脳内オキシステロールは 24S-hydroxycholesterol (24S-HC) がほとんどの割合を占めており、24S-ヒドロキシラーゼ (CYP46A1) が血液脳関門を通過可能な 24S-HC に変換し、脳内コレステロールの過剰蓄積を防いでいる。24S-HC は核内受容体の Liver X Receptor (LXR) や Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 (SREBP2) の活性化を抑制して脂質代謝制御に関わる一方、アルツハイマー型認知症 (AD) や神経変性疾患のバイオマーカーとしても注目されている。AD 患者では、血漿中および脳脊髄液内での 24S-HC の上昇 (Lütjohann D. *et al.*, *J. Lipid Res.*, 41, 195-198, 2000、Jeitner T. M. *et al.*, *Curr. Med. Chem.*, 18, 1515-1525, 2011)、脳における 24S-HC の低下 (Heverin M. *et al.*, *J Lipid Res.*, 45, 186-93, 2004)、老人斑の周囲における CYP46A1 の発現増加 (Shafaati M. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 425, 78-82, 2007) が報告されている。また、AD 発症の一因とされるアミロイド前駆体蛋白 (APP) からのアミロイド (A $\beta$ ) 産生を ACAT1 阻害剤が抑制し (Hutter-Paier B. *et al.*, *Neuron.*, 14, 227-238, 2004)、AD モデルマウスの脳における A $\beta$  の沈着が ACAT1 欠損によって抑制され、さらに ACAT1 欠損 AD モデルマウスの脳では、コレステロールエステル (CE) の低下および 24S-HC が増加していることが報告された (Bryleva E.Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. US A.*, 16, 3081-3086, 2010)。これらの報告により、ACAT1 が AD マウス脳内 CE 量および 24S-HC 量を規定することで、A $\beta$  の沈着に関与している可能性が示唆された。しかし、他の脂質代謝酵素と AD 発症との詳細な関連はまだ未開拓な領域であり、特に ACAT1 の逆反応 (CE 水解活性) を触媒する NCEH1 に着目した研究の報告はない。

我々はマクロファージに豊富に発現し、脂肪滴が局在する細胞質の中性域に至適 pH を有するコレステロールエステル (CE) 水解活性を担う酵素を同定し、中性コレステロールエステル水解酵素 1 (Neutral cholesterol ester hydrolase1: NCEH1) を見出した (図



1)。この NCEH1 欠損マウスから採取した腹腔マクロファージの培養液中にオキシステロール類の一種である 25-ヒドロキシコレステロール (25-HC) を添加すると、小胞体ストレス関連分子の発現とアポトーシスが顕著に誘導された。この時、マクロファージ内の 25-HC エステル体の含量が小胞体で顕著に増加していた。一方、エステル化反応を触媒する酵素 (Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase1; ACAT1) の選択的阻害剤を添加すると、これらの現象はほぼ完全に阻止された。従って、NCEH1 欠損による 25-HC エステル体の小胞体における蓄積が小胞体ストレス誘導を仲介し、アポトーシスを引き起こすことを明らかとした (Sekiya M. *et al.*, *J. Lipid Res.*, 55, 2082-2092, 2014)。この研究を通じて、我々はコレステロール酸化代謝物であるオキシステロール類の細胞内 ester 濃度は NCEH1 および ACAT1 の活性比によって規定されることを確認した。そこで、オキシステロール類の生理的意義を解明することを目的に、オキシステロール類の蓄積が予想される NCEH1 欠損マウスの各臓器におけるオキシステロール類の生理作用について検討した。NCEH1 を高発現するマウス臓器 (特に脳、心臓、腎臓、副腎) のオキシステロール類を LC-MS/MS を用いて包括的に定量した。その結果、NCEH1 欠損マウスの脳では野生型マウス脳に比べて 24S-HC の有意な増加が確認された。NCEH1 も ACAT1 同様に脳内 CE 量および 24S-HC 量を規定し、AD 発症に関与していること可能性が期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、NCEH1 が脳内 CE 量および 24S-HC 量を調節することで、A 沈着などの AD 発症に関与するかどうかを細胞実験および動物実験から明らかとする。このメカニズムを解明することにより、新規 AD 発症因子の発見、さらには新たな創薬ターゲットの提示に繋がることが期待できる。

## 3. 研究の方法

### 細胞実験

SH-SY5Y 細胞(ヒト神経芽細胞)に NCEH1 阻害剤, ACAT1 阻害剤または 24S-HC を作用させ、A 産生分子を western-blotting 法にて、A 産生量を ELISA 法を用いて評価した。また、NCEH1 阻害剤と 24S-HC を SH-SY5Y 細胞に作用させ、TUNEL 染色法または MTT assay による細胞死の評価を行い、より細胞死が誘導されるかどうかを検証した。この際、アポトーシス関連分子の発現を real-time PCR 法を用いて解析した。また、細胞内 24S-HC の free 体と ester 体を分けて LC-MS/MS 定量解析を行い、24S-HC が惹起する神経細胞死と NCEH1 阻害による 24S-HC ester 体蓄積との関連を検証した。

### 動物実験

APP oligomer 過剰発現マウス (APP<sub>OSK</sub>Tg) と NCEH1 欠損マウス(NCEH1KO)を交配させ、NCEH1 欠損 APP oligomer 過剰発現マウス(NCEH1KO-APP<sub>OSK</sub>Tg)を作製した。作製した NCEH1 欠損 AD モデルマウスに関して、脳海馬における A oligomer の沈着を免疫組織化学染色法にて評価し、さらに Y 迷路試験にて空間作業記憶の評価を行った。また、APP<sub>OSK</sub>Tg および NCEH1KO-APP<sub>OSK</sub>Tg マウスにおける脳内 CE 量および 24S-HC 量を LC-MS/MS にて定量解析し、AD 発症分子の発現量との相関関係を検証し、動物レベルでの NCEH1 の AD 発症への関与を検証した。

## 4. 研究成果

### 細胞実験

SH-SY5Y 細胞に 24S-HC を作用させると A 分泌能の低下および神経細胞死が誘導されるが、これらは ACAT1 阻害剤によって抑制されることが報告された。そこで、NCEH1 阻害剤が 24S-HC によって誘発される A 分泌低下および神経細胞死へ影響を与えるかどうかを検証した。SH-SY5Y 細胞に NCEH1 阻害剤、ACAT1 阻害剤または 24S-HC を作用させ、A 産生分子である APP、ADAM10、BACE-1、PS-1 を western-blotting 法にて評価した。24S-HC 添加によって APP の発現増加が見られたが、NCEH1 阻害剤、ACAT1 阻害剤添加では有意な影響を与えなかった。また、ELISA 法にて A 分泌への影響を評価した結果、24S-HC 添加時に見られた A<sub>1-40</sub> 及び A<sub>1-42</sub> 分泌低下は ACAT1 阻害剤では抑制されたが、NCEH1 阻害剤では有意な変化は見られなかった (図 2)。

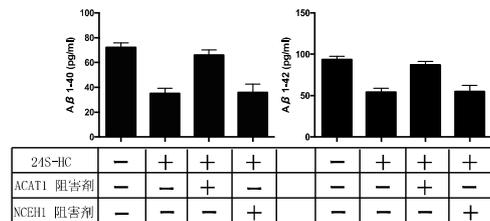


図 2. ACAT1 および NCEH1 阻害剤による Aβ 産生への影響

A 沈着による神経細胞死は AD 発症の一因となるが、脳内 24S-HC も神経細胞死を誘発する。そこで ACAT1 阻害剤および NCEH1 阻害剤と 24S-HC を SH-SY5Y 細胞に作用させ、TUNEL 染色法及び MTT assay にて細胞死を評価した。その結果、ACAT1 阻害剤では 24S-HC が誘発する細胞死を有意に抑制したが、NCEH1 阻害剤では有意な影響は見られなかった(図 3)。また、この際の細胞内 24S-HC 含量を LC-MS/MS を用いて測定した結果、ACAT1 阻害剤添加時には free 体が、NCEH1 阻害剤添加時には ester 体が有意に増加していた。以上の結果より、細胞レベルでは NCEH1 阻害による CE および 24S-HC ester 蓄積は A 分

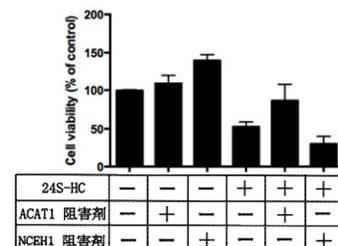


図 3. ACAT1 および NCEH1 阻害剤による細胞死への影響

泌能や神経細胞死に影響しないことが示唆された。

#### 動物実験

APP oligomer 過剰発現マウス (APP<sub>OSK</sub>Tg) と NCEH1 欠損マウス(NCEH1KO)を交配させ、NCEH1 欠損 APP oligomer 過剰発現マウス(NCEH1KO-APP<sub>OSK</sub>Tg)を作製し、これら 6、8、10ヶ月齢マウスの A 沈着評価(免疫組織化学染色法)および空間作業記憶評価(Y 迷路試験)を行った。10ヶ月齢マウスを使用した Y 迷路試験の結果、WT および NCEH1KO マウスと比較して APP<sub>OSK</sub>Tg および NCEH1KO-APP<sub>OSK</sub>Tg マウスでは有意に空間作業記憶が低下した(図 4)。

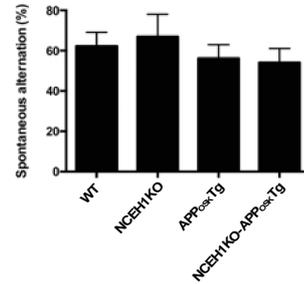


図4. 空間作業記憶の評価 (Y-迷路試験)

次に、脳パラフィン切片を作製し、抗 A oligomer 抗体による免疫組織化学染色法にて大脳皮質(cortex)および海馬(CA1、CA3 および DG 領域)における A oligomer 沈着を比較した。その結果、APP<sub>OSK</sub>Tg マウスで見られた海馬 CA1 領域の A oligomer 沈着は NCEH1KO-APP<sub>OSK</sub>Tg マウスで有意に増加した(図 5)。また、LC-MS/MS を用いて作製したマウスの脳内 24S-HC 含量を測定した結果、NCEH1 を欠損したマウス群では ester 体が有意に増加していた。

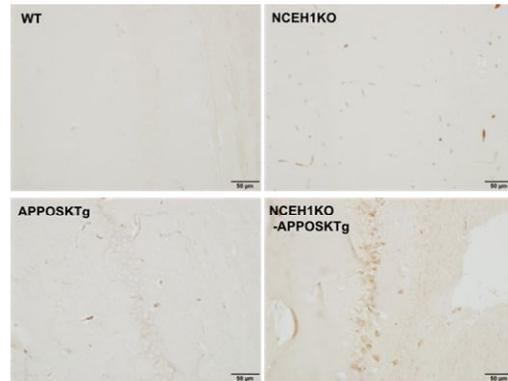


図5. 海馬 (CA1領域)におけるAβ oligomer 沈着の評価

本実験では、in vivo レベルでの NCEH1 欠損による CE および 24S-HC ester 蓄積は APP<sub>OSK</sub>Tg マウスにおける脳内 A oligomer の沈着を増悪させ、簡易的ではあるが短期的な空間記憶障害も誘発した。以上の結果から、細胞レベルでは関連が認められなかったが、in vivo レベルでの NCEH1 欠損による ester 体の蓄積が AD 発症の原因因子である A の沈着さらには記憶障害へと関連することが示唆された。今後、NCEH1 欠損による 24S-HC ester 蓄積の A 沈着のメカニズムを解明することにより、新規 AD 発症因子の発見、さらには新たな創薬ターゲットの提示に繋がることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----