

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K10995

研究課題名（和文）散発性アルツハイマー病解明に向けた脳におけるアポE含有リポタンパク代謝経路の解析

研究課題名（英文）Analysis of metabolic pathways of apoE-containing lipoproteins in the brain for elucidation of sporadic Alzheimer's disease

研究代表者

藤野 貴広（Fujino, Takahiro）

愛媛大学・学術支援センター・准教授

研究者番号：40292312

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：糖鎖修飾を受けたヒト・アポE2、3、4及び糖鎖修飾を受けない同様のアポE変異体の発現及び精製系を確立した。これらを用いてアポE-nHDLを調製し、神経損傷モデルのマウス脳室内に注入し、その動態を解析したが神経細胞へのアポE-nHDLの取込みは見られなかった。また、調製したアポE及び家族性変異タウ蛋白を線維化タウ蛋白シードと共に神経由来の培養細胞に導入したが、変異タウ蛋白の凝集体やリン酸化状態に変化は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでほとんど注目されてこなかったアポEの糖鎖修飾が与えるアポEアイソフォーム間の生理機能の違い、特に神経細胞への影響を解析した。本研究による中枢神経系におけるアポE含有リポタンパク代謝の解析を通じて、散発性アルツハイマー病発症におけるアポE4の役割を解明することで、病態解明や予防、さらには治療の基礎を築くためのいくつかの知見が得られたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Expression and purification systems were established for glycosylated human ApoE2, 3, and 4, as well as ApoE mutants without glycosylation. ApoE-nHDL was prepared using these systems. No uptake of ApoE-nHDL into neurons was observed when it was injected into the ventricles of a mouse model of nerve injury. Additionally, no change in aggregates or phosphorylation state of the mutant tau protein was observed when the ApoEs and familial mutant tau protein were introduced into cultured neuronal cells with fibrotic tau protein seeds.

研究分野：栄養科学

キーワード：アポE リポタンパク

1. 研究開始当初の背景

神経細胞の増殖、神経突起の進展、神経細胞膜の機能維持のためには細胞膜の主要構成成分であるコレステロールは不可欠である。しかし、中枢神経系は体循環系と脳血液関門によって隔てられているため、血漿リポタンパクは利用できない。そのため、脳内におけるコレステロールはアポE (アポリポタンパクE)・脂質複合体、いわゆるアポE含有リポタンパクとしてアストロサイトより供給され、アポEを認識する受容体を介して神経細胞に取り込まれると考えられている。中枢神経系におけるアポEをリガンドとするリポタンパク受容体はLDL受容体(LDLR)、VLDL受容体(VLDLR)、アポE受容体2(ApoER2)及びLDL受容体様タンパク質1(LRP1)などが知られている。この中でもVLDLR及びApoER2は神経細胞の移動及び配置決定を制御する液性因子であるリーリンの受容体としても機能しており、これら受容体を共に欠損するダブルノックアウト(DKO)マウスではリーラマウスと呼ばれる神経変異マウスに酷似した表現型を示す。

ヒトにおけるアポEは他の動物とは異なり3つのアイソフォーム(アポE2、E3及びE4)が存在する。このうちのアポE4は20年以上も前の疫学調査によって散発性アルツハイマー病の主要な遺伝性の危険因子として同定された。しかし、散発性アルツハイマー病発症におけるアポE4の役割については未だほとんど明らかにされていない。中枢神経系ではアストロサイトからアポEが分泌され、このアポEがABCA1を介してアストロサイトからコレステロールとリン脂質を引き抜くことでアポE含有リポタンパク、いわゆるアポE-nascent HDL(nHDL)が生成される。このアポE-nHDLは神経細胞に発現するリポタンパク受容体によって取り込まれることで、神経細胞の突起進展や障害時の修復、細胞膜の機能維持に重要なコレステロールを供給していると考えられている。ABCA1を介したアポEのアイソフォーム間におけるコレステロール排出能は見かけ上、アポE2 > アポE3 > アポE4の順であることが知られており、その分子メカニズムは今以て不明である。

2. 研究の目的

我々は、精製アポEを用いた解析から、アストロサイトによって分泌されたアポE-nHDLがLDL受容体に結合し、神経細胞に取り込まれることを見いだした。すなわち、アポEアイソフォーム間にコレステロール排出能の違いはなく、その見かけ上の違いはLDL受容体に対する結合親和性によって生じることを明らかにした(藤野貴広(2012)日本動脈硬化学会・シンポ)。アポE-nHDLがLDL受容体に結合し、取り込まれることはアポEとアルツハイマー病との関連に於いては大変重要で、LDL受容体とアポEアイソフォーム間の結合親和性の違いがApoE4の危険性のある程度説明できる。ただし、アポE3とE4はLDL受容体に対する結合親和性がほぼ同程度であるため、この2つのアイソフォーム間での機能性の違いを説明するには十分でない。

一方、神経細胞に取り込まれたアポE4が神経細胞で分解を受けるとそのペプチドの一部がミトコンドリアに障害を与えることを発見した(Nakamura T. et al. (2009) *Mol Neurodegener.*)。すなわち、細胞に取り込まれたアポEの細胞内における動態の違いがアポE4のアルツハイマー病発症において重要な役割を果たしていることが示唆された。通常、細胞内に取り込まれたアポE-nHDLは含有するコレステロールをエンドソームの低pH環境下で遊離し、アポEはリサイクリングされる。中枢神経系のアポEは体循環中のものとは異なり、高度にシアル酸修飾を受けていることが知られている。

本研究では、これまでほとんど注目されてこなかったアポEの糖鎖修飾が与えるアポEアイソフォーム間の生理機能の違い、特に神経細胞への影響を明らかにすることを目的としている。さらに最終的には、中枢神経系におけるアポE含有リポタンパク代謝経路の解析を通じて、散発性アルツハイマー病発症におけるアポE4の役割を解明することで、病態解明や予防、さらには治療の基礎を築くことを目指している。

3. 研究の方法

1) アポE及びアポE-nHDLの調製

ヒト・アポE2、E3又はE4のcDNAを組み込んだアデノウイルスを作成し、アポE欠損マウス由来のアストロサイト初代培養系又はグリオーマ細胞に感染させた。感染24時間後、無血清培地に交換し、48時間培養後に培養上清をタンパク質精製に供した。培養上清は硫酸分画、Heparin Sepharose 6 Fast Flow カラム、Sephacryl™ S-100 カラムにより精製した。精製標品はシアリダーゼ処理後、SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供し、単一バンドであることを確認した。糖鎖修飾を受けないアポE変異体の精製も同様の方法で行った。

アポE-nHDLは、LDL受容体欠損細胞を用いて調製した。LDL受容体欠損細胞の培地を無血清培地に交換し、精製アポEを加えて一晚培養した。培養上清は限外ろ過により濃縮し、KBrを加えて比重1.12に調製後、超遠心法によりアポE-nHDLを調製した。蛍光標識アポE-nHDLの調製は濃縮後にDiIを加え、一晚反応させた後に同様の方法で調製した。

2) 神経損傷マウスの作成とアポE-nHDLの脳室内注入

初代神経又はグリア細胞の調製は胎児脳の海馬又は大脳皮質部分から、それぞれをトリプシン処理することにより調製した。初代神経細胞はPEIコーティングしたディッシュ又はスライドガラス上で培養した。

野生型及びアポE欠損、LDL受容体欠損マウスを用い、カイニン酸投与による海馬神経損傷モデルマウス又は頭骨へのドライアイス圧着による脳神経損傷マウスを作成した。これらマウス

の脳室内に蛍光標識アポ E-nHDL を様々な濃度で注入した。3~12 時間ごと又は 1、3、7 日後に脳を取り出し、OCT コンパウンドで包埋し、組織解析用サンプルとした。このサンプルより凍結組織切片を作成し、ホルマリン固定後、蛍光観察や免疫組織染色に供した。

3) 変異タウ蛋白安定発現株の作成とその凝集・リン酸化状態の解析

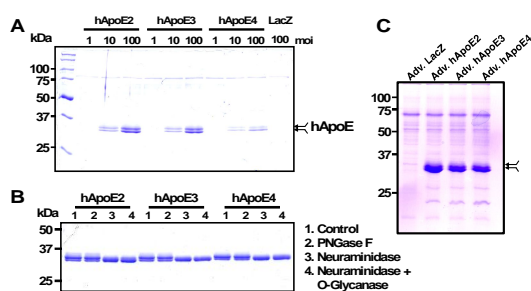
野生型及び家族性タウオパチー変異 (hTau P301L) をもつ 4R タウ蛋白 cDNA をレンチウィルス発現ベクターに組込んだ。4R タウ蛋白レンチウィルス発現ベクターはパッケージングベクターと共に 293T 細胞に導入することで培養上清に発現ウィルスを産生させた。培養上清は PEG 沈殿法により簡易精製を行い、4R タウ蛋白発現ウィルスとした。このウィルスを培養神経系細胞 (Neuro2A) に感染させ、抗生物質 (ピューロマイシン) 含有選択培地で培養することにより野生型及び家族性タウオパチー変異をもつ 4R タウ蛋白を安定的に発現する細胞を得た。本細胞に線維化変異タウ蛋白のシード及び/又はアポ E、アポ E-nHDL を同時に取り込ませた。48~72 時間後、細胞をホルマリン固定し、蛍光免疫組織染色などのサンプルとした。

4. 研究成果

1) アポ E のシアル酸修飾は LDL 受容体結合に影響を与えない

我々は、脳内に近い形の糖鎖修飾を受けたヒト・アポ E 及び糖鎖修飾を受けないアポ E 変異体の発現系を確立し、これらを大量に得る事に成功した。しかし、糖鎖修飾を受けないアポ E、

アデノウィルスを用いたアストロサイトにおけるアポ E の発現



・アデノウィルスにヒト・アポ E を組込み、グリア初代培養細胞 (A) 及び肝初代培養細胞に感染 (C)、72 時間後の培地中のアポ E 複数のバンドとして検出されるヒト・アポ E のシアルゲージ処理は単一バンドに収束する (B)

特にアポ E4 は培養中の培地 pH の低下で容易に変成し、アポ E4 の発現及びアポ E4 からアポ E4-nHDL への変換を低下させてしまう。そこで発現培地に様々な pH 安定化剤及びタンパク質安定化剤を加えて試験したところ大幅に発現効率を高める条件を見出した。培養条件を更に詳細に検討した結果、CO2 濃度を細かく設定することでアポ E4 の発現及びアポ E4 からアポ E4-nHDL への変換効率を大幅に引き上げることが出来た。また、糖鎖修飾を受けないアポ E4-nHDL を大量に得られたことで、これらを用いてリポタンパク受容体に対する結合親和性の解析を行った。そ

の結果、糖鎖修飾はアポ E-nHDL のリポタンパク受容体に対する結合と取込みに殆ど影響を与えないことが明らかになった。

2) 神経損傷マウス脳でのアポ E-nHDL の動態解析

マウス脳室内に様々な濃度の蛍光標識アポ E-nHDL を注入したところ、神経初代培養細胞とは異なり、in vivo においてアポ E-nHDL は神経細胞にほとんど取り込まれないことが明らかになった。そこで、これまでの報告を参考に神経損傷モデルを使用する必要があると考え、様々な濃度のカイニン酸投与による海馬神経損傷モデルを作成し、同様の実験を行ったが、蛍光標識アポ E-nHDL の神経細胞への取り込みは観察できなかった。そこでドライアイスによる脳損傷モデルを作成し、脳室内に注入するアポ E-nHDL の濃度、注入量、反応時間及び脳損傷後の修復期間のタイムコースなど、細かくパラメータを設定して同様の実験を行った。しかし、アポ E-nHDL の神経細胞への取込みは全く観察されなかった。これらの結果は生体脳では、たとえ神経細胞が損傷を受けてもアポ E-nHDL は殆ど取り込まない、若しくは極めて微量であることを示唆した。

神経細胞は定常状態ではほとんどアポ E-nHDL を取り込まないが、神経細胞の増殖、神経突起の進展、損傷修復等の時には盛んにアポ E-nHDL としてコレステロールを要求することが知られている。また、脳虚血・再灌流モデルのスナネズミ海馬では、損傷を受けた海馬神経細胞に多量のアポ E が沈着することが報告されている。しかしこれまでの結果は、in vivo におけるアポ E-nHDL 脳室内への注入による動態解析は極めて困難で、ノックインマウスの作成等による長期的な観察でなければ困難であることが示唆された。

3) グリア細胞における LDL 受容体の発現調節

野生型のグリア初代培養細胞では LDL 受容体を発現しているにも関わらず、アポ E3 及びアポ E4-nHDL の取り込みはほとんど観察されない。すなわち、生体脳の神経細胞でも同様のメカニズムでアポ E-nHDL が取り込まれない可能性が考えられた。そこで、グリア細胞における LDL 受容体の発現調節メカニズムやコレステロール生合成系の発現調節及び LDL 受容体を強制発現させた場合のアポ E-nHDL と取込みとコレステロール排出能を解析した。まず、海馬初代神経細胞における LDL 受容体の発現調節では、培地中へのコレステロール添加によって発現は抑制され、除去によって発現は誘導された。これに一致して、海馬及び大脳皮質由来の神経初代培養細胞ではアポ E3 及びアポ E4-nHDL を盛んに取り込むことが観察された。一方、グリア初代培養細胞から調整したアストロサイトでは培地中へのコレステロールの添加及び除去に LDL 受容体の発現は全く影響を受けなかった。興味深いことに、このアストロサイトから分化するミクログリアでは LDL 受容体のコレステロールによる発現調節が観察された。また一方で、このアストロサイト

にアデノウィルスを用いて LDL 受容体を過剰発現させると、アポ E3 及びアポ E4-nHDL を盛んに取り込むことが観察された。

4) アポ E 及びアポ E-nHDL による変異タウ蛋白の凝集・リン酸化状態に対する影響

アルツハイマー病患者の病理組織像で観察される神経原繊維変化の基本骨格は高度にリン酸化されたタウ蛋白である。アルツハイマー病においては何らかの機構によって、タウ蛋白のリン酸化の亢進又は脱リン酸化の減少が起こることによって神経原繊維変化が引き起こされると考えられている。そこでアポ E4-nHDL を取り込ませた神経細胞のタウ蛋白のリン酸化状態を特異抗体を用いて観察すると同時に、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子(アミロイド 、 及びセクレターゼなど)との機能的な関連を検討する目的で、家族性タウオパチー変異(hTau P301L)をもつタウ蛋白発現ベクターを構築した。さらに、神経由来の培養細胞だけでなく、リポタンパク受容体欠損マウス由来の初代培養細胞へも応用可能なように、レンチウイルスを介した家族性タウオパチー変異(hTau P301L)タウ蛋白の発現系を確立した。レンチウイルスによる家族性タウオパチー変異タウ蛋白を線維化タウ蛋白のシードと共に神経由来の培養細胞に発現させ、細胞内におけるタウ蛋白のリン酸化状態を観察した。アポ E 及びアポ E-nHDL を同時に取り込ませた際のタウ蛋白の変化(線維化やリン酸化状態)を観察したが、アポ E-nHDL を取り込んだ細胞でのタウ凝集体やタウ蛋白のリン酸化状態に変化は見られなかった。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------