

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 3月31日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500352

研究課題名（和文） 脳内コレステロール制御における A $\beta$  の生理作用研究課題名（英文） Physiological function of A $\beta$  in regulation of brain cholesterol

研究代表者

富山 貴美（TOMIYAMA TAKAMI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：10305633

研究成果の概要（和文）：本研究により、A $\beta$ はアポリポタンパク質様の生理作用を持ち、ABCA1と協同して細胞の余分なコレステロールをリポタンパク質の形で排出するために産生・分泌されていること、A $\beta$ はさらに、脳内の余分なコレステロールを末梢へと運び、肝臓で代謝するために機能していること、高コレステロール血症は A $\beta$  のこのような生理作用を促進することで結果的にアルツハイマー病の発症を高めていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found a novel, apolipoprotein-like function of A $\beta$  that mediates cholesterol efflux from cells in cooperation with the membrane cholesterol transporter ABCA1. A $\beta$  was also shown to promote cholesterol transport from the brain into the liver. These findings imply the biological significance of cholesterol-induced A $\beta$  production and explain why high levels of plasma cholesterol are a risk factor for Alzheimer's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：コレステロール、A $\beta$ 、アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

A $\beta$ はアルツハイマー病の脳に沈着する老人斑の主要構成成分である。A $\beta$ は膜に存在するアミロイド前駆体タンパク質 APP から、膜に存在する2つの酵素、 $\beta$ セクレターゼと $\gamma$ セクレターゼの働きによって切り出され、細胞から分泌される。凝集して不溶性の線維となった A $\beta$ をニューロンの培養に加えると細胞死が起こることから、A $\beta$ の凝集・沈着

がアルツハイマー病の原因であると考えられてきた。最近では、凝集前の可溶性の A $\beta$ オリゴマーにシナプス機能障害作用があることも報告されている。いずれにせよ、A $\beta$ はこれまでその悪い作用のみが強調されてきた。しかし、A $\beta$ や APP の本来の生理作用については、未だ未解明の部分が多い。

アルツハイマー病の危険因子として、高コレステロール血症が知られている。細胞にコ

レステロールを添加すると、細胞からの  $A\beta$  分泌が増加する。メチル $\beta$ サイクロデキストリンで細胞からコレステロールを引き抜いたり、コレステロール合成酵素 (HMG-CoA 還元酵素) 阻害剤のスタチンでコレステロール合成を止めたりすると、 $\gamma$ セクレターゼ活性が低下し、細胞からの  $A\beta$  分泌も減少する。また、APP を発現するトランスジェニックマウスに高コレステロール食を与えて高コレステロール血症にすると、脳へのアミロイド沈着が増加し、スタチンなどを投与してコレステロールを低下させると、脳の病理が改善される。これらの結果から、高コレステロールは細胞からの  $A\beta$  の分泌を高めることで、アルツハイマー病発症のリスクを高めていると考えられている。しかし、細胞のコレステロール含量を高めるとなぜ  $A\beta$  分泌が増加するのか、その生理的意義は不明であった。

これまで、細胞の余分なコレステロールは、アポAやアポEなどのアポリポタンパク質が外から細胞に作用して、そのコレステロールを引き抜くことにより、調節されていると考えられてきた。膜に存在する ABCA1 などのコレステロール・トランスポーターが、余分なコレステロールをアポリポタンパク質に引き渡す役割を担っている。コレステロールを受け取ったアポリポタンパク質は、HDL を形成し、別のニューロンやグリア細胞へコレステロールを運搬すると考えられている。 $A\beta$  はアポEなどと同様、両親媒性 (水に可溶であるとともに、脂質にも結合できる) であり、実際、脳脊髄液中ではアポEとともに HDL 中に存在することが知られている。これらのことから、本申請者は、 $A\beta$  はアポリポタンパク質様の生理作用を持ち、細胞から余分なコレステロールを排出するために産生されている可能性があると考えた。

この考えが正しいとして、 $A\beta$  により細胞から排出されたコレステロールはその後、どうなるのであろうか。脳内の  $A\beta$  のかなりの部分は、血液脳関門に存在する LDL レセプター-LRP の働きにより、血中へと排出されることが示されている。この現象は、 $A\beta$  は単なるゴミであり、脳から排泄されているのだと解釈されている。本申請者は、 $A\beta$  の血中への排出は、脳内の余分なコレステロールを末梢へと運び、肝臓で代謝するための重要な機構であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳における  $A\beta$  の生理作用を、脳内コレステロール制御の点から明らかにすることである。それにより、これまで

未解明であった以下の問題に対する解答を得ることができる。

(1) コレステロールはアルツハイマー病の危険因子として知られ、 $A\beta$  の分泌を促すことがその原因の1つではないかと考えられてきたが、細胞がなぜコレステロール負荷により  $A\beta$  の分泌を上げる必要があるのかは不明のままである。本研究は、 $A\beta$  の生理作用にその答えがあることを示すものである。

(2)  $A\beta$  が細胞から余分なコレステロールを汲み出し、さらに末梢へこれを排出することが明らかとなれば、脳から末梢への  $A\beta$  の排出という現象にも、生理的意義づけができる。

## 3. 研究の方法

APP を発現させた細胞へコレステロールを負荷した後、細胞内のコレステロール量を非発現細胞のそれと比較する。また、 $^{14}\text{C}$  標識したコレステロールを細胞に負荷し、培地中に出てきた放射活性を測定する。さらに、免疫電顕により、細胞から培地中に分泌されたリポタンパク質粒子に  $A\beta$  が結合していることを確認する。これにより、 $A\beta$  が細胞からのコレステロール排出に関わっていることを確認する。

続いて、 $A\beta$  によるコレステロール排出に ABCA1 などのコレステロール・トランスポーターが関与しているのかどうかを、siRNA を用いた実験により確認する。

次に、APP トランスジェニック (Tg) マウスや APP ノックアウト (KO) マウス脳より神経細胞を分離し、そのコレステロール量を測定する。Tg マウスでコレステロールが低下し、KO マウスで増加していれば、 $A\beta$  分泌による細胞内コレステロールの調節が脳でも確認されたことになる。

続いて、 $A\beta$  により細胞から排出されたコレステロールの代謝経路を調べるため、 $^{14}\text{C}$  標識したコレステロールで作製したリポタンパク質粒子に  $A\beta$  を取り込ませ、これをマウスの脳に注入する。その後、経時的に脳および末梢臓器を採取し、臓器内の放射活性を測定する。

最後に、家族性アルツハイマー病にリンクした  $A\beta$  の変異が  $A\beta$  のコレステロール排出作用に影響を与えるかどうかを培養細胞系で検討する。さらに、APP-Tg マウスに高コレステロール食を与えて高コレステロール血症とし、 $A\beta$  の蓄積とシナプスの消失を免疫組織化学により、マウスの記憶障害を Morris 水迷路により調べる。

#### 4. 研究成果

APP を発現させた細胞へコレステロールを負荷した後、細胞内のコレステロール量を非発現細胞のそれと比較したところ、有意に低い値を示した。 $\beta$ セクレターゼ阻害剤や $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で A $\beta$  の分泌を止めてやると、細胞内コレステロールの低下は見られなくなった (図 1)。

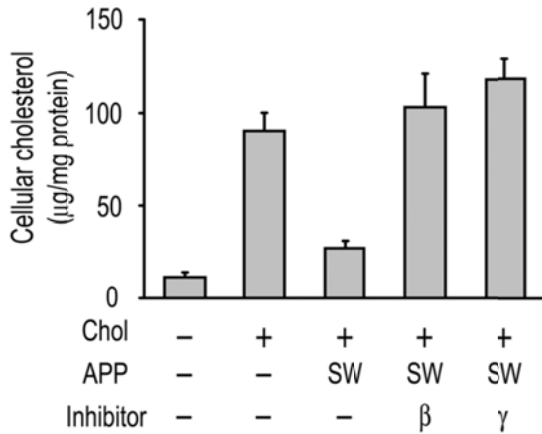


図 1. A $\beta$  による細胞内コレステロール低下。HEK 細胞に Swedish 変異型 APP を発現させ、コレステロールを負荷した。細胞内のコレステロールは APP 発現により低下した。 $\beta$ セクレターゼ阻害剤や $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で A $\beta$  の分泌を止めてやると、細胞内コレステロールの低下は見られなくなった。

次に、 $^{14}\text{C}$  標識したコレステロールを細胞に負荷し、培地中に出てきた放射活性を測定したところ、APP 発現細胞で有意に高く、さらにその培地を免疫電顕で調べたところ、多くのリポタンパク質様粒子が観察されるとともに、それらの粒子に A $\beta$  が結合していることが確認された (図 2)。

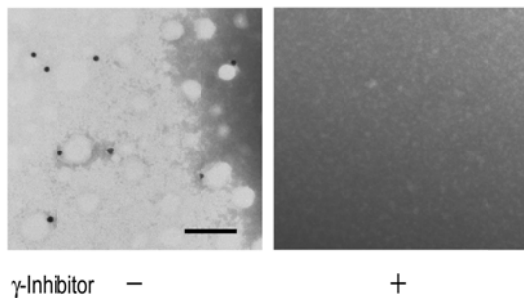


図 2. A $\beta$  による細胞からのコレステロール排出。(左) APP 発現細胞の培地中に分泌されたリポタンパク質様粒子。黒い点は A $\beta$  免疫陽性。(右)  $\gamma$ セクレターゼ阻害剤で A $\beta$  の分泌を止めてやると、リポタンパク質様粒子はみられなくなった。Scale bar = 100 nm.

これらの結果は、A $\beta$  は分泌される際に、コレステロールとともにリポタンパク質様の粒子を形成し、細胞から余分なコレステロールを排出することで、細胞内コレステロール量を調節していることを示唆している。

次に、A $\beta$  による細胞内コレステロールの排出に ABCA1 が関与しているかどうかを調べるため、siRNA により細胞の ABCA1 をノックダウンした。その後、細胞に APP を発現させてコレステロール負荷を行ったところ、A $\beta$  による細胞内コレステロール低下作用がみられなくなった。

培養細胞系で A $\beta$  の作用が確認できたので、次に、in vivo でこの作用を検証した。Swedish 変異型 APP-Tg マウス (Tg2576 マウス) および APP-KO マウスの脳から神経細胞を分離し、細胞内コレステロールを測定したところ、Tg マウスで低く、KO マウスで高かった。この KO マウスに野生型 APP-Tg マウスを交配してやると、細胞内のコレステロールは non-Tg マウス以下のレベルにまで低下した。

A $\beta$  /コレステロール複合体の代謝経路を解明するため、 $^{14}\text{C}$  で標識したコレステロールを用いて人工 HDL 粒子を作製し、A $\beta$  と混合後、APP ノックアウトマウスの脳室にインジェクションした。経時的に脳および末梢臓器を回収し、各臓器内の放射活性を測定したところ、脳に入れたコレステロールは速やかに肝臓へと移行し、A $\beta$  があるとこの移行が加速されることがわかった (図 3)。これにより、A $\beta$  は脳から末梢へとコレステロールを運ぶ働きをしていることが示された。

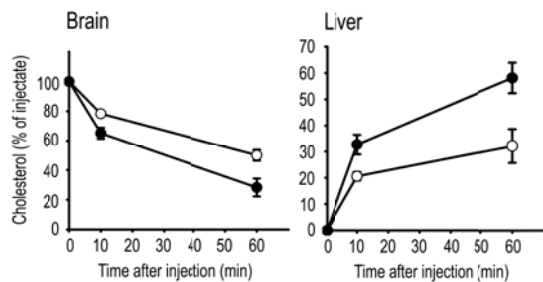


図 3. A $\beta$  による脳からのコレステロール排出。 $^{14}\text{C}$  標識人工 HDL 粒子を A $\beta$  と混合後、APP-KO マウスの脳室にインジェクションし、10 分後と 60 分後に脳および末梢臓器内の放射活性を測定した。A $\beta$  の存在により、脳から肝臓へのコレステロール輸送が促進された。● A $\beta$  (+) ; ○ A $\beta$  (-)。

続いて、野生型 A $\beta$  と変異型 A $\beta$  でコレステロール排出作用に差があるかどうかを、培養細胞系で検討した。野生型 APP および E693  $\Delta$  変異型 APP 発現細胞にコレステロールを負荷し、細胞内コレステロールを定量した。野生型 APP 発現細胞に比べ、E693  $\Delta$  変異型 APP 発現細胞では A $\beta$  分泌量が低く、細胞内コレステロール量は高かった。次に、コレステロールを負荷したこれらの細胞を固定・染色し、コレステロールが細胞内のどこに蓄積しているのかを調べた。野生型 APP 発現細胞では、A $\beta$  もコレステロールもほとんど細胞内に蓄積していなかったが、E693  $\Delta$  変異型 APP 発現細胞では、ER に A $\beta$  の蓄積がみられ、エンドソーム/リソソームと ER にコレステロールが蓄積していた。外から細胞に取り込まれたコレステロールはまずエンドソーム/リソソームに入り、NPC1 などの働きにより ER に輸送され、その後細胞膜へ移行することが知られている。E693  $\Delta$  変異型 APP 発現細胞では ER から細胞膜への A $\beta$  の輸送が障害されることから、コレステロールも A $\beta$  とともに ER に蓄積し、その影響でエンドソーム/リソソームから ER へのコレステロール輸送も障害されたと考えられる。この結果は、A $\beta$  が ER から細胞膜へのコレステロール輸送と細胞からのコレステロール分泌を担っている可能性を強く示唆している。

最後に、E693  $\Delta$  変異型 APP-Tg マウスに高コレステロール食を 1 ヶ月間与えて高コレステロール血症とし、A $\beta$  の脳内蓄積とシナプス消失、およびマウスの記憶障害を調べた。高コレステロール食負荷により、マウスの血中および脳内コレステロールレベルの上昇がみられた。これらのマウスでは、神経細胞内への A $\beta$  蓄積とシナプス消失が早期よりみられ、記憶障害も加速した。このような高コレステロールによる病理の加速は、Tg2576 マウスでも観察された。

以上の結果より、A $\beta$  はアポリポタンパク質様の生理作用を持ち、ABCA1 と協同して細胞の余分なコレステロールをリポタンパク質の形で排出するために産生・分泌されていること、A $\beta$  はさらに、脳内の余分なコレステロールを末梢へと運び、肝臓で代謝するために機能していること、高コレステロール血症は A $\beta$  のこのような生理作用を促進することで結果的にアルツハイマー病の発症を高めていることが示された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Umeda T., Tomiya T., Kitajima E., Idomoto T., Nomura S., Lambert M.P., Klein W.L., Mori H. Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A $\beta$  oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci.* 90, in press (doi:10.1016/j.lfs.2011.12.022), 2012. 査読有
- ② Umeda T., Mori H., Zheng H., Tomiya T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid  $\beta$  secretion. *J. Neurosci. Res.*, 88, 1985-1994, 2010. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① Nomura S, Umeda T, Tomiya T, Lambert MP, Klein WL, Mori H. The E693  $\Delta$  mutation in amyloid precursor protein impairs A $\beta$ -mediated cholesterol efflux from cells, leading to accelerated accumulation of intraneuronal A $\beta$  oligomers and memory disturbance in mice with hypercholesterolemia. 41st Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2011 年 11 月 12-16 日, Washington, DC, USA.
- ② 梅田知宙、野村幸子、富山貴美、森啓. The E693  $\Delta$  mutation in amyloid precursor protein impairs A $\beta$ -mediated cholesterol efflux from cells in vitro. 第 30 回日本認知症学会, 2011 年 11 月 11-13 日, 東京.
- ③ Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiya T. Regulation of cholesterol efflux by amyloid  $\beta$  secretion. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010, 2010 年 7 月 10-15 日, Honolulu, USA.
- ④ Kitajima E, Umeda T, Idomoto T, Lambert MP, Klein WL, Tomiya T, Mori H. Hypercholesterolemia accelerates memory impairment in a transgenic mouse model of A $\beta$  oligomers. International Conference on Alzheimer's disease (ICAD) 2010, 2010 年 7 月 10-15 日, Honolulu, USA.
- ⑤ 梅田知宙、森啓、Zheng Hui、富山貴美. A $\beta$  分泌によるコレステロール efflux の制御. 第 29 回日本認知症学会, 2009 年 11 月 20-22 日, 仙台.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富山 貴美 (TOMIYAMA TAKAMI)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：10305633

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし