
アミロイドβ蛋白蓄積におけるlipid raftsの役割

The role of lipid rafts on aggregation of amyloid β protein

岡山大学大学院医歯学総合研究科神経病態内科学／助手

瓦林 毅*

はじめに

Alzheimer病 (AD) はアミロイドβ蛋白 (Aβ) の凝集からなる脳アミロイド(Aβ amyloidosis) とリン酸化タウの凝集からなる神経原線維変化 (tauopathy) によって起こる疾患である。その発症機序としてAβの蓄積凝集がリン酸化タウを誘発し、神経細胞死を引き起こすというAβ cascade説が広く信じられている。しかし、Aβの産生、毒性発揮およびタウ誘発がどこで起こるのかは未解決であった。lipid raftsはglycosphingolipidとコレステロールに富み、それらの凝集によって形成されるmembrane microdomainである¹⁾。以前よりamyloid β protein precursor (APP), Aβ, presenilin-1 (PS-1) がlipid raftsに存在することが示され、ADとの関連が考えられてきた²⁾。我々はlipid raftsがAβの産生、蓄積凝集、神経毒性およびリン酸化タウ誘発に重要な部位であることを発見したため報告する。

1. 対象および方法

ヒトAPP695を安定して過剰発現するCHO cellが用いられた³⁾。hamster prion proteinのもとにSweden型遺伝子変異をもつヒトAPP695を過剰発現するtransgenic mouseであるTg2576マウス⁴⁾が3-28月齢33匹用いられた。このマウスにおけるAβ蓄積については我々が詳細に検討した⁵⁾。ヒト脳の検討は、コントロール (n=2)、びまん性老人斑

は多数認めるが認知障害がなく、初期のADの変化と考えられているpathological aging (n=2)、そしてAD (n=6) で行われた。

脳は蛋白分解阻害剤を含むMBS-T bufferでhomogenizeし、2,000 x g 10 min 4°Cの低速遠心をした後に上清を5%, 38%, 40%の不連続ショ糖勾配にかけ、100,000 x g 19時間4°Cの遠心によってlipid rafts, Triton可溶性分画, およびpelletの各分画を得た⁶⁾。各分画を2%SDSと70%ギ酸で連続抽出し、AβをELISA測定およびwestern blottingで解析した。CHO cellはsodium carbonateでhomogenizeした後に不連続ショ糖勾配による分画を行った³⁾。

マウスの行動実験はMorris water maze試験によって行った⁷⁾。免疫実験では9-11月齢Aβアミロイドの蓄積が始まる頃のTg2576が使われ、初回のMorris water maze試験の後に抗Aβ抗体BAM10を0.5mgずつ3回腹腔内投与し、再度試験を行った。その後解剖し、脳Aβ量を測定した。コントロールにはマウスIgG 0.5mgを腹腔内投与した⁸⁾。

2. 結果

1. Aβの産生部位の検討

APP過剰発現CHO cellにおいてAPP, APPのC-terminal fragment (CTF), γ-secretase complexの構成要素であるPS-1のN-terminal fragment (NTF)およびCTFがlipid raftsに存在した。CHO cellにγ-

* 現) 弘前大学大学院医学研究科脳神経内科学講座／講師

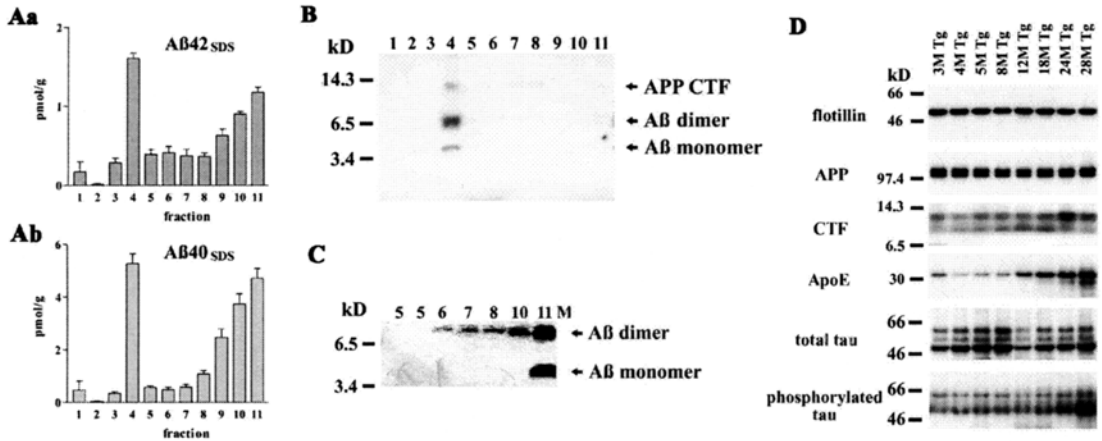


図1 A: 3月齢 Tg2576 の各分画中の Aβ 42(a) および Aβ 40(b)
 B: 11月齢 Tg2576 の全分画中の Aβ
 C: Tg2576 の lipid rafts 中の Aβ の加齢による増加
 D: Tg2576 の lipid rafts の flotillin, APP, CTF, ApoE, 総タウおよびリン酸化タウの加齢による変化

secretase 阻害剤を加えてから分画を行うと lipid rafts に CTF の著明な蓄積が認められた。一方、各分画を採取してから 37°C で incubate すると lipid rafts で最も多くの Aβ 40, Aβ 42 が産生された³⁾。以上の検討から Aβ 42 および Aβ 40 が lipid rafts で産生されることが示された。

2. Aβ 凝集部位の検討

脳アミロイド沈着前の 3 月齢の若年 Tg2576 mouse で各分画の Aβ 42 および Aβ 40 を ELISA で測定すると全 Aβ 42, Aβ 40 の約 25% が、第 3-5 分画の lipid rafts 分画に局在していた (図 1A)。lipid rafts は膜全体のごく一部であることから lipid rafts 中で Aβ は高濃度に濃縮されて存在すると考えられた。

加齢により 6-7 月齢から lipid rafts に可溶性 Aβ 42 が有意に増加した。Aβ 40 の増加はわずかであった。同時期に pellet には不溶性 Aβ 42 および Aβ 40 の蓄積を認めた。一方 Triton 可溶性分画には増加は認めなかった。その後も lipid rafts の Aβ は増加を続け、Aβ 42 は 500 倍、Aβ 40 は 300 倍まで増加した。Lipid rafts のほとんどの Aβ は可溶性で、不溶性 Aβ はほとんど pellet のみに認められた (図 2)。以上の検討から lipid rafts には 6-7 月齢から可溶性 Aβ 42 が細胞外の不溶性 Aβ と動的な相関関係を持って増加してくることが示された。Western blotting では 4kD の Aβ monomer および

8kD の dimer は第四分画の lipid rafts に特異的に認められ (図 1B)、加齢により増加した。最も初期の蓄積は 6 月齢から認められる Aβ dimer であった (図 1C)。

ヒト脳では pathological aging の段階からすでに lipid rafts に可溶性の Aβ 42 が蓄積した。Western blotting で pathological aging および AD の lipid rafts に Aβ dimer が認められた。よって Tg2576 と同様に AD 脳の超早期病変も lipid rafts における Aβ 42 による dimer の蓄積であった。以上の検討より、lipid rafts は Aβ の超早期凝集蓄積部位であることが示された。

3. Aβ の神経毒性の検討

Morris water maze 試験の mean probe score (記憶させた台の周囲を泳いでいる割合) は Tg2576 で NonTg に比べて加齢と共に低下した。記憶障害はアミロイド沈着がまだみられない 6 月齢の早期から始まり、これは lipid rafts に Aβ dimer が蓄積する時期に一致した⁷⁾。次に、抗 Aβ 抗体 BAM10 の腹腔内投与が Tg2576 の学習障害を改善するかどうかを検討した。抗体投与前の Tg2576 は学習獲得障害の低下を認めたのに対し、抗体投与後は 2-3 月齢の記憶障害出現前のマウスと同程度の学習の改善が認められた。さらにこの改善は抗体投与のわずか 3 日後から認められた。免疫療法の 17 日後

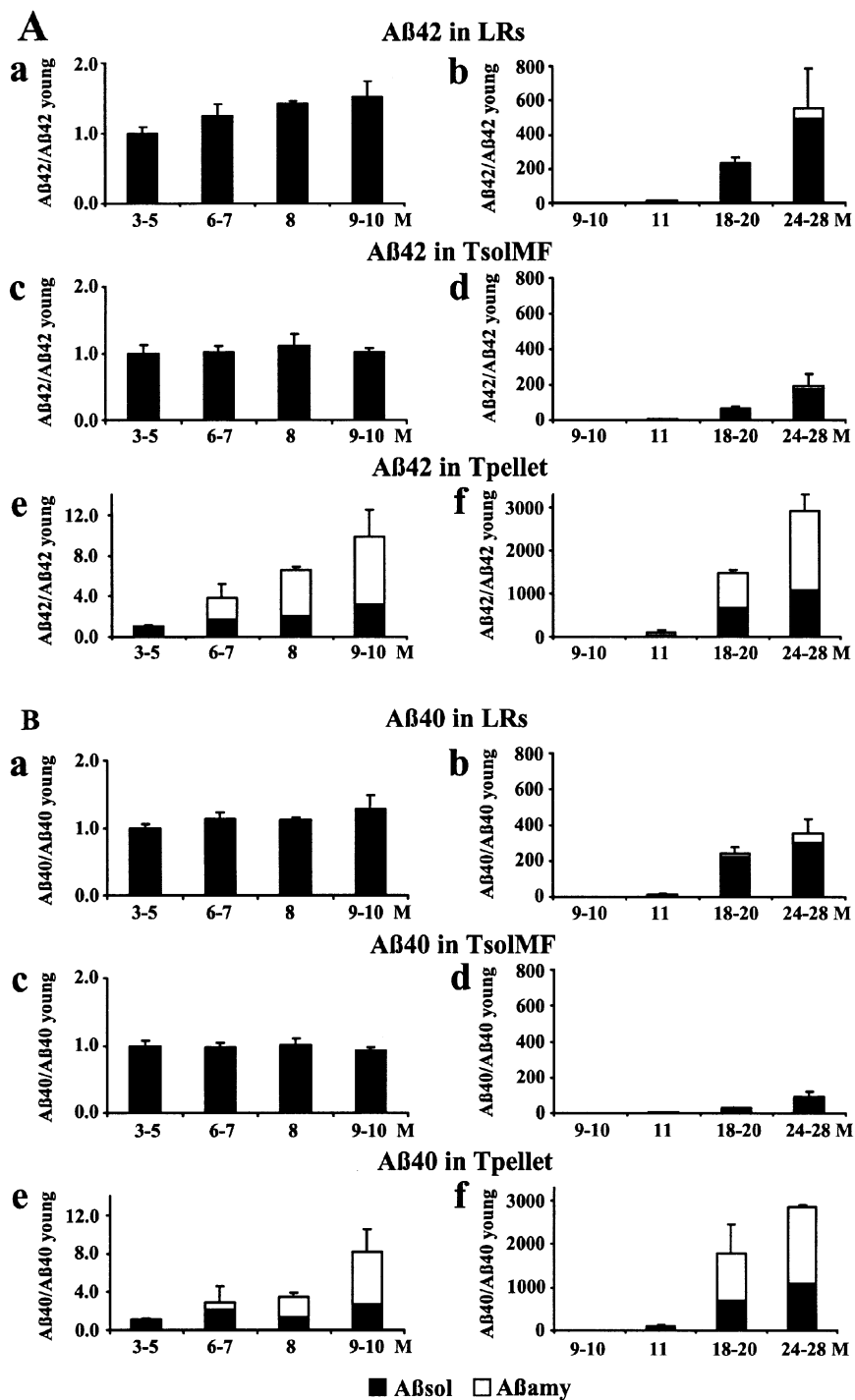


図 2

Tg2576 の lipid rafts (LRs), Triton-X 可溶性分画 (TsolMF), pellet (Tpellet) の Aβ42, Aβ40 の経時的検討

に解剖して脳内のA β を測定したが、抗体投与群とコントロール群でA β 量に変化を認めなかった⁸⁾。ELISAによるA β 測定では変化を検出できないこと、非常に短時間で改善が認められることから、BAM10は、老人斑として蓄積したA β アミロイドではなく、老人斑形成以前の小さなA β oligomerを中和することで記憶障害を改善することが示唆された。

4. Apolipoprotein E (ApoE) とリン酸化タウ誘発部位の検討

AD脳で蓄積するApoEやリン酸化タウとlipid raftsの関係を検討した。Tg2576でApoEおよびリン酸化タウはlipid rafts 分画に存在し、加齢によりA β dimerの蓄積に遅れてApoEは12月齢より、リン酸化タウは18月齢から蓄積した(図1D)。AD脳でも正常コントロール脳に比べてlipid raftsにApoEおよびリン酸化タウの蓄積が認められた。さらにAD脳のlipid raftsではTg2576には認められない神経原線推に特徴的な smear pattern を認めた。以上の検討からA β oligomerはTg2576およびAD脳のlipid raftsにおいてApoE蓄積やtauopathyを促進する可能性が示された。

3. 考察

Lipid rafts は γ -secretase 活性を持ち、ここでA β 42, A β 40 が産生されることが示された。これはVetrivelらによる追試によっても確認されており⁹⁾、さらにEhehaltらによつてlipid raftsに β -secretase活性も存在することが示されている¹⁰⁾。

Lipid rafts にはA β が高濃度に蓄積されて存在しており、Tg2576およびADで超急性期の蓄積がlipid raftsの可溶性A β 42 dimerの蓄積であったことより、lipid raftsがA β の凝集蓄積開始部位と考えられた。Lipid raftsの構成成分であるGM1 gangliosideおよびコレステロールにはA β 凝集促進作用があるが、さらにADではlipid raftsのGM1 gangliosideの量が増加することが報告されており、A β 凝集促進に働くと考えられる¹¹⁾。

一方、行動実験、免疫療法の結果から記憶障害は脳アミロイドではなく、小さなA β 凝集と考えられた。近年A β 毒性発現物質として可溶性のA β oligomerが考えられている¹²⁾。lipid raftsにはsignal transduction moleculeが集中しており、情報

伝達の重要な経路である。記憶障害の出現時期に一致してlipid raftsにA β dimerが出現したことから、A β oligomerはlipid raftsの機能障害を起こすことで神経障害作用を示すと考えられる。

従来細胞外蓄積であるA β が細胞内のタウをどのように誘発するかは不明であった。Lipid raftsでA β dimerとリン酸化タウが共存し、A β dimerに遅れてリン酸化タウが蓄積することより、lipid raftsはA β が二次的tauopathyを誘発する部位と考えられた。

以上の検討より、lipid raftsはA β の産生、凝集・蓄積開始、二次的tauopathyの誘発部位であり、A β oligomerはlipid raftsで神経毒性を起こすと考えられた。よつてlipid raftsにおけるA β の産生、凝集を制御することがAD根本的な治療法として重要と考えられた。

文献

- 1) Simons K and Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572, 1997
- 2) Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, et al: A detergent-insoluble membrane compartment contains A β in vivo. *Ned* 4: 730-734, 1998
- 3) Wahrle S, Das P, Nyborg AC, et al: Cholesterol-dependent γ -secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol Dis* 9: 11-23, 2002
- 4) Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al: Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99-102, 1996
- 5) Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, et al: Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 21: 372-381, 2001
- 6) Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, et al: Dimeric amyloid β protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24: 3801-3809, 2004

- 7) Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, et al: The relationship between A β and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 22: 1858-1867, 2002
- 8) Kotilinek LA, Bacskai B, Westerman M, et al: Reversible memory loss in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *J. Neurosci* 22: 6331-6335, 2002
- 9) Vetrivel KS, Cheng H, Lin W, et al: Association of γ -secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes. *J Biol Chem.* 279: 44945-4454, 2004
- 10) Ehehalt R, Keller P, Haass C, et al: Amyloidogenic processing of the Alzheimer-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* 160: 113-123, 2003
- 11) Molander-Melin M, Blennow K, Bogdanovic N, et al: Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. *J Neurochem.* 92: 171-182, 2005
- 12) Lambert MP, Barlow AK, Chromy BA, et al: Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β 1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6448-6453, 1998

この論文は、平成17年4月9日(土)第15回中・四国老年期痴呆研究会で発表された内容です。