

アルツハイマー病アミロイドβペプチドの脳からの排出輸送に低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1)が関与することを実証

JST 基礎的研究事業の一環として、東京大学大学院医学系研究科・薬学系研究科の岩坪 威教授と山田 薫博士研究員らは、東北大学・寺崎 哲也教授、ワシントン大学・David Holtzman 教授らとの共同研究により、脳血液関門を介した脳からのアミロイドβペプチド(Aβ)の排出輸送に、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1 (LRP1)が関与することを、不死化脳毛細血管内皮細胞 TR-BBB を用いて示しました。

アルツハイマー病は認知症の原因として最も頻度の高い神経疾患であり、その病因には Aβペプチドからなるアミロイド物質 (βアミロイド) の脳における蓄積が重要と考えられています。Aβペプチドは脳で産生された後、速やかに排出 (クリアランス) あるいは分解を受けるものと考えられてきましたが、特に排出のメカニズムについては、LRP1 の関与を示唆する少数の報告はあったものの、その分子機構はほとんど不明でした。このため、脳からの Aβ排出輸送を再現する実験系の確立と、そのメカニズムの解明は懸案となっていました。

今回研究チームは、寺崎教授らにより確立されたラット脳毛細血管内皮細胞由来の条件的不死化細胞系 TR-BBB を用いて、次のことを明らかにしました。(1)TR-BBB 細胞は ¹²⁵I 標識 Aβ (1-40) を急速かつ大量に取り込み、脳からの Aβ排出過程を再現する。(2)この取り込み過程は RAP タンパク質、LRP1 に対する中和抗体および siRNA で抑制されることから、LRP1 依存性と考えられる。(3)しかし LRP1 を発現し、組織プラスミノゲン活性化因子などのリガンドを取り込む他の細胞系では、Aβ取り込みは観察されず、また精製 LRP1 タンパク質は Aβと結合しないことから、LRP1 は直接 Aβを結合する受容体ではないと考えられる。これらの結果から、Aβを結合し、LRP1 と共役する受容体の存在などの新規なメカニズムが強く示唆される。

本研究の成果は、アルツハイマー病の病因に密接に関与する Aβのクリアランス機構解明に重要な手掛かりを与えるとともに、新規治療法の開発にも有用な実験系を提供するものとしてきわめて有意義と考えられます。

本研究成果は 2008 年 10 月 21 日 (米国東部時間) 発行の米国科学雑誌「The Journal of Biological Chemistry」電子版に掲載されました。

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

戦略的創造研究推進事業 チーム型研究 (CREST)

研究領域: 「精神・神経疾患の分子病態理解に基づく診断・治療へ向けた新技術の創出」

研究総括: 樋口 輝彦 (国立精神・神経センター 総長)

研究課題名: アルツハイマー病根本治療薬創出のための統合的研究

研究代表者：岩坪 威

研究期間：平成 19 年 10 月ー平成 25 年 3 月

J S Tはこの領域で少子化・高齢化・ストレス社会を迎えたわが国において社会的要請の強い認知・情動などをはじめとする高次脳機能の障害による精神・神経疾患に対して、脳科学の基礎的な知見を活用し予防・診断・治療法等における新技術の創出を目指しています。上記研究課題では、アルツハイマー病の分子病態を、病因タンパク質 β アミロイド(A β)の排出(クリアランス)に着目して解明し、初期段階で改善する新機軸の治療方策を創出しようとするものです。

<研究の背景と経緯>

アルツハイマー病(AD)では、脳にアミロイド β ペプチド(A β)が蓄積し、老人斑アミロイドを形成する過程が神経障害の原因となることが示唆されています。神経細胞から分泌されるA β は、脳内の分解酵素や貪食細胞によって速やかに分解・除去(クリアランス)を受けることが知られていましたが、近年これらの経路以外に、脳内のA β が末梢血液中に排出される新たなクリアランス経路の存在が注目されるようになりました。しかし、脳と血液の間には脳毛細血管内皮細胞などにより形成される脳・血液関門(blood-brain barrier; BBB)が存在するため、A β のように長いペプチドが通過することはできないと考えられます。従ってA β が脳から血液中に排出されるためには、A β を経細胞的に輸送(トランスサイトosis)するメカニズムがBBBに存在することが必要となります(図1)。BBBにおけるA β の排出輸送体を同定し、その分子機構を解明することができれば、その活性化により脳内のA β レベルを低下させる新たな治療法の開発にもつながるものと期待されます。

<研究の内容>

BBBにおけるA β 輸送を解明するためには、培養細胞を用いたA β 排出輸送の定量的なモデルの構築が不可欠です。しかし血管内皮細胞の培養は、非血管内皮細胞の混入やBBB活性の低下、さらに遺伝子導入効率の低さに起因する解析の困難さ、などの問題点が多く、BBBにおけるA β 輸送を測定する実験系の構築は難しいと考えられてきました。本研究チームは、BBBの輸送活性を保持した培養細胞を用いることにより、この問題の解決を試みました。TR-BBB細胞は、共同研究者の寺崎らにより開発された脳毛細血管内皮細胞由来の条件的不死化細胞株であり、BBBの機能が良好に保持されていることが知られています。そこで本研究チームは、TR-BBB細胞を用いることにより、A β の輸送を定量的に解析するとともに、BBBを介したA β 排出輸送の分子メカニズムの解明を試みました。

BBBを介したA β 輸送が成立するためには、まずA β が脳毛細血管内皮細胞に取り込まれることが必要です。この過程を解析するため、TR-BBB細胞に¹²⁵I標識したA β (1-40)を添加したところ、A β は10分以内の急速な経過で細胞内に取り込まれ、これは脳からのA β 排出の時間経過をよく再現するものでした(図1)。次に、A β の取り込み過程に関わる受容体としてLRP1を想定し、検証を試みたところ、LRP1の阻害タンパク質であるRAP、LRP1に対する中和抗体、ならびにLRP1に対するsiRNAの適用により取り込みが阻害されたことから、LRP1がTR-BBB細胞においてA β の取り込みに関与する主要な受容体であることが明らかになりました(図2)。

A β の細胞内への取り込みは1) A β の細胞表面への結合、2) 細胞内への取り込みの2段階から成ると考えられます。まずA β の細胞表面への結合にLRP1が関与するかについて、精製LRP1を用いた*in vitro*の結合実験により検討すると、LRP1とA β は直接結合しないことが分かりました(図3)。これは従来一部で定説となりつつあった概念を覆す結果です。またLRP1を発現する他種の培養細胞は、TR-BBB細胞とは異なり、A β を細胞内に取り込まないことも明らかになりました(図4)。

これらの結果は、LRP1は2)のA β の細胞内への取り込み過程には必要であるが、1)のA β の細胞表面への結合には関与しないことを示します。従って、BBBを構成する血管内皮細胞は、A β の取り込みに必要とされるLRP1以外に、A β の結合に関与する新規の受容体ないしメカニズムを有することが示唆されました。

<今後の展開>

A β のクリアランス経路の一つである、BBBを介したA β の排出輸送を解明することは、A β の脳内レベル低下を目指すAD治療法の開発にとって重要と考えられます。本研究グループは、TR-BBB細胞を用いることにより、LRP1がA β の細胞内取り込みを担うことを明らかにしました。しかしA β がLRP1に直接結合しないことから(図3)、BBBを構成する血管内皮細胞にはA β の結合に必要な未知の受容体ないしメカニズムが存在し、それがLRP1と共役することにより、A β の細胞内取り込みが生じるものと予想されます(図5)。今後、このような脳血管内皮細胞におけるA β 輸送の特異性を担う分子を同定することにより、A β の脳内代謝機構の詳細が明らかになるものと期待されます。本研究の成果は、アルツハイマー病の病因に密接に関与するA β のクリアランス機構の全容の解明に手掛かりを与えるとともに、新規治療法の開発にも有用な実験系を提供する点において重要と考えられます。

<参考図>

図1 TR-BBB細胞における¹²⁵I-A β (1-40)の取り込み実験

TR-BBB細胞に対し、¹²⁵I-A β (1-40)を添加、37°Cでインキュベート後、酸性の緩衝液で洗浄し、残存する放射活性を γ カウンターで測定した。細胞内取り込み量はCell/Medium ratioで評価した。

図2 LRP1に対する siRNA が ^{125}I -A β (1-40)細胞内取り込みに与える影響

TR-BBB 細胞に対し LRP1 に対する siRNA を添加し、LRP1 発現量 (A)、 ^{125}I -A β (1-40) 細胞内取り込み量 (B)、 ^{125}I -A β (1-40)の細胞表面結合量 (C)、LRP1 の代表的なリガンドである ^{125}I -tPA の細胞内取り込み量 (D) を調べた。LRP1 に対する siRNA により、tPA と同様、A β の細胞内取り込み量は抑制されることがわかった。

図3 精製 LRP1、リコンビナント LRP1 (sLRP2, sLRP4) を用いた *in vitro* A β 結合実験

精製 sLRP1 (A)、及びリガンド結合領域を含むリコンビナントの LRP1 (sLRP2, sLRP4) (B) を 96 well plate に固相化し、LRP1 の代表的なリガンドである tPA (C) 及び A β (D) の結合を調べた。tPA が精製 sLRP1、リコンビナント LRP1 の両者と結合するのに対し、A β はいずれにも結合しない。

図4 各種培養細胞における A β の取り込み

様々な種類の培養細胞において LRP1 の発現 (A) と ^{125}I -A β (1-40)の細胞内取り込み (B) の関係を調べた。TR-BBB 細胞は ^{125}I -A β (1-40)を取り込み、その取り込みは LRP1 アンタゴニスト RAP で阻害されたのに対し、その他の各種培養細胞では LRP1 の発現の有無に関わらず ^{125}I -A β (1-40)の取り込みは見られなかった。

図5 LRP1 を介した A β の細胞内取り込み機構に関する仮説

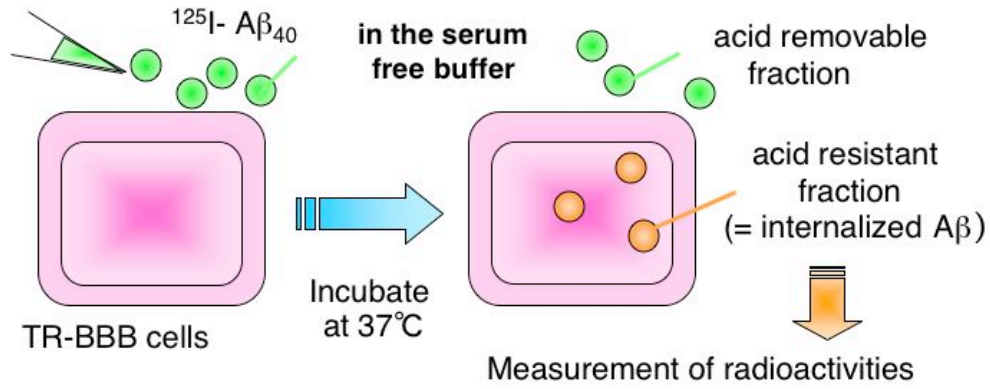
TR-BBB 細胞においては、A β 結合分子 (LRP1 の未知の共役受容体) に結合した A β が、LRP1 の作用により細胞内に取り込まれる可能性がある (A)。この細胞内取り込み過程は LRP1 アンタゴニスト RAP (B) や LRP1 に対する siRNA (C) により阻害される。一方 MEF 細胞を含む他の LRP1 発現細胞では、A β 結合分子が発現していないために、A β の細胞表面結合や細胞内取り込みが生じないものと予想される (D)。

<論文名>

The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid β peptides in an *in vitro* model of the blood-brain barrier cells. (低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 は血液脳関門の *in vitro* モデル細胞においてアミロイド β ペプチドの取り込みを媒介する)

Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, Nagae Y, Tachikawa M, Strickland DK, Liu Q, Bu G, Basak JM, Holtzman DM, Ohtsuki S, Terasaki T, Iwatsubo T. *Journal of Biological Chemistry* doi:10.1074/jbc.M801487200 (published Oct 21, 2008)

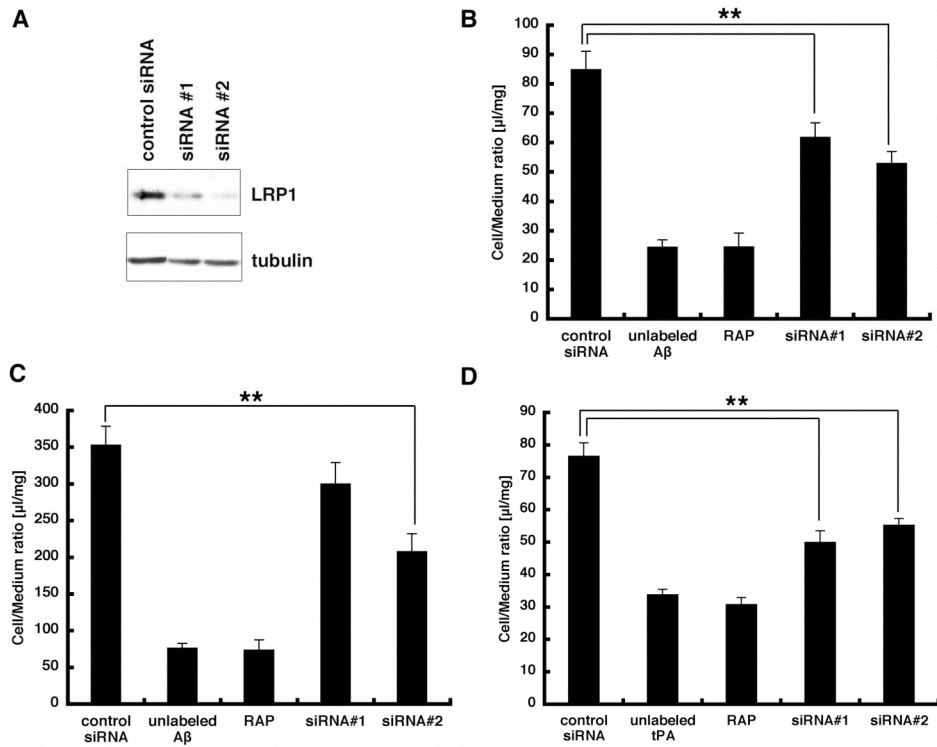
☒ 1



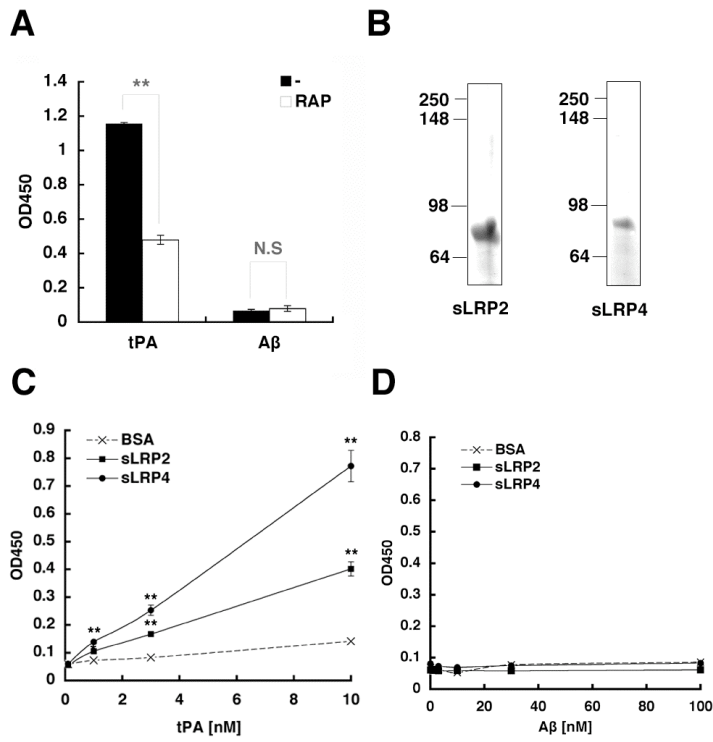
Cell/Medium ratio [μl/mg]

$$= \frac{(^{125}\text{I} \text{ counts in the acid resistant fraction [cpm]})}{(^{125}\text{I} \text{ counts in the incubation medium [cpm/ml]) \times (\text{protein amounts [mg]})}$$

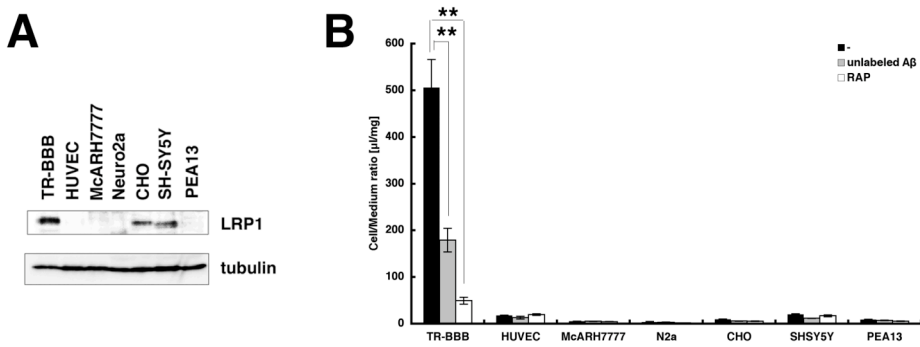
☒ 2



☒ 3



☒ 4



☒ 5

