

原

著

リポ蛋白受容体 LR11/SorLA による isoform 依存性 ApoE 代謝調節機構の解析

矢 島 隆 二

新潟大学大学院医歯学総合研究科

分子細胞医学専攻神経内科学分野

(主任：西澤正豊教授)

Isoform - dependent ApoE Metabolism Regulated by Lipoprotein Receptor LR11/SorLA

Ryuji YAJIMA

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science**Course for Molecular and Cellular Medicine**Molecular Neuroscience and Brain Disease Neurology**(Director: Prof. Masatoyo NISHIZAWA)*

要 旨

アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD) は最も頻度の高い認知症であり, その主要な病理変化の一つに β アミロイド ($A\beta$) の蓄積がある. AD の最大の遺伝的リスクとして *APOE* 遺伝子多型が知られている. $A\beta$ は, その代謝システムとしてアポリポ蛋白 E (ApoE) と複合体を形成し細胞内に取り込まれる機序が知られている. LR11/SorLA は $A\beta$ の産生・代謝を調節するリポ蛋白受容体であり, その細胞外領域に ApoE と結合するドメインを有している. 本研究では, 全長型 LR11 (full-length LR11: FL-LR11) が isoform 依存性に ApoE を細胞内に取り込む可能性について培養細胞を用いて検討した. HEK293T 細胞に ApoE-GFP を遺伝子導入し, その培養液を FL-LR11 を導入した N2a 細胞に添加し, 分泌 ApoE-GFP の N2a 細胞への取り込みを検討した. N2a 細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると, 培養液中の ApoE-GFP が LR11 を介して細胞内に取り込まれた. ApoE2, E3, E4 を遺伝子導入したドナー HEK293T 細胞と FL-LR11 を遺伝子導入したレシピエント N2a 細胞の共培養実験を行ったところ, LR11 の強制発現により分泌 ApoE3 及び ApoE4 のレシピエント N2a 細胞内への取り込みが亢進した. 一

Reprint requests to: Ryuji YAJIMA
Department of Neurology Brain Research
Institute Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8585 Japan

別刷請求先: 〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所神経内科学教室 矢島 隆二

方で、分泌 ApoE2 ではレシピエント N2a 細胞への取り込みの亢進は認めなかった。共免疫沈降解析を行ったところ、ApoE と LR11 は細胞の内外で複合体を形成した。ApoE-LR11 複合体形成量は、ApoE4 > ApoE3 > ApoE2 の順で増加していた。本研究により、FL-LR11 は ApoE isoform 依存性に ApoE と結合し、その親和性に応じて ApoE を細胞内に取り込むことが示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、LR11/SorLA、 β アミロイド、アポリポ蛋白 E

はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer disease: AD) は老年期に生じる認知症の中で最も頻度が高い疾患であり、人口の高齢化に伴って患者数が急増している¹⁾²⁾。AD 脳の主な病理学的特徴は、① β アミロイド (Amyloid- β : A β) を主要構成成分とする老人斑、② リン酸化タウを主要構成成分とする神経原線維変化、③ 大脳皮質や海馬を中心とする神経細胞脱落である。老人斑の出現は AD 病理の最も初期のイベントと考えられ、AD 病態の中心的な役割を A β が担うと考える「アミロイド仮説」が広く受け入れられている³⁾。A β はアミロイド前駆体蛋白 (amyloid precursor protein: APP) から産生される。APP は二つの経路によりプロテアーゼ切断を受ける。一つ目は後期エンドゾームにおいて β セクレターゼと γ セクレターゼ切断を受ける A β 産生経路、もう一つが細胞表面において α セクレターゼ切断をうける A β 非産生経路である。主な A β 分子種は A β 40 であるが、量は少ないものの凝集性が高い分子種は A β 42 であり⁴⁾、A β 42 のオリゴマーは神経毒性が高い⁵⁾。A β の分解システムは多様であるが、アポリポ蛋白 E (ApoE) との複合体形成を介し A β を除去する経路が最近注目されている。

AD の危険因子として APOE 遺伝子多型が知られている。APOE ϵ 2 は AD の発症リスクを減少させ、APOE ϵ 4 は AD の発症リスクを増加させる。APOE ϵ 3/3 を基準とした日本人での AD 発症のオッズ比は、 ϵ 3/4 で 5.6、 ϵ 4/4 で 33.1 となることが報告されている⁶⁾。ApoE は中枢神経系ではグリア細胞より主に分泌される⁷⁾。High-density lipoprotein (HDL) と結合した ApoE は A β と複

合体を形成し、リポ蛋白受容体を介して神経細胞に取り込まれる機構が提唱されている⁸⁾⁹⁾。ApoE をリガンドとするリポ蛋白受容体である LDL 受容体 (LDLR) を過剰発現させると、脳内 ApoE 及び A β が減少する¹⁰⁾。一方、LDLR を欠損したマウスでは脳内 A β 蓄積が亢進することから¹¹⁾、ApoE を介した A β の神経細胞内への取り込みは AD 病態に対して保護的作用があると推測される。一方で、細胞内において A β はライソゾームに輸送されて濃縮され¹²⁾、酸性環境下で濃縮された A β は凝集性が高まることと合わせると¹³⁾¹⁴⁾ 細胞内 A β は老人斑のシード形成を助長するという考えも提唱されている⁹⁾。このように A β の細胞内への取り込みが AD 病態にどう寄与するのかはまだ結論が出ていない。

A β の産生および代謝を調節する分子としてリポ蛋白受容体 LR11/SorLA が注目されている。LR11/SORL1 は LDL 受容体遺伝子ファミリー分子としてクローニングされた I 型膜蛋白トポロジーを有する ~ 250kDa のリポ蛋白受容体であり、神経細胞に強く発現している^{15)–17)}。LR11 は主にゴルジ体やエンドゾームを主体とした細胞質内に発現しており、約 10 % 程度が細胞表面に発現している¹⁸⁾¹⁹⁾。LR11 は、LDLR のリガンド結合領域に存在する 11 個の繰り返し配列 (complement-type repeats) と、後期ゴルジでの蛋白輸送に重要な vacuolar protein sorting 10 protein (VPS10) に類似したドメインを有している¹⁵⁾。全長型 LR11 (full-length LR11: FL-LR11) は N 末端近傍の VPS10 類似ドメイン内で furin による切断を受けて成熟型となり¹⁶⁾²⁰⁾、さらに成熟型 LR11 はメタロプロテアーゼである TNF- α 変換酵素 (TACE) によって膜貫通領域直上の細胞外

領域で切断を受ける²⁰⁾。TACEで切断されたN末断片は可溶型LR11 (soluble LR11: sLR11) として分泌される。また細胞表面に発現しているLR11はApoE含有リポ蛋白を細胞内に取り込む作用を有することから¹⁵⁾²¹⁾、LDLRと類似の機序でA β を神経細胞内に取り込むことが想定される。Sandwich ELISA法を用いたAD患者における髄液中sLR11の定量解析では、AD患者髄液中のsLR11は健常コントロールや前頭側頭葉変性症と比較して有意に高値を示すことが報告されている²²⁾。興味深いことに、APOE ϵ 4陽性のAD患者では、APOE ϵ 4陰性のAD患者に比してsLR11が有意に高かった²²⁾。また、LR11の遺伝子多型は孤発性ADの発病リスクになることが日本人を含めた相関解析により示されている²³⁾²⁴⁾。最近になり、LR11のミスセンス変異が家族性アルツハイマー病患者に同定された²⁵⁾。VPS10ドメイン内の二つのミスセンス変異 (Tyr141Cys, Gly511Arg) は *in silico* 解析で病原性が高いと推定されており、変異LR11がどのような機序でアルツハイマー病・病態に関与するかの解明が待たれる。

本研究では、APOE遺伝子多型がADの発症リスクとなることに着目し、LR11がApoE isoform 依存性にApoE代謝を調節している可能性について検討した。

材料と方法

1. プラスミドの作成

全長型ヒトLR11 cDNA プラスミドは、プライマーとしてFL-LR11 forward primer: 5'-GGGCTCGAGATGGCGACACGGAGCAGCAG-3' および FL-LR11 reverse primer: 5'-GGGGAATTCGGCTATCACCATGGGGACGTC-3'、鋳型として全長型ヒトLR11のcDNA ORF clone (Origene) を用いて、FL-LR11のcDNA (GeneBank accession number NM_003105) をPCR法で増幅させ作成した。得られたcDNAにXhoIおよびEcoRIで制限酵素処理を行い、DNA Ligation Kit (Takara) を用いてpcDNA3.1-myc his ベクター (Invitrogen)

に挿入した。ヒトApoE cDNA プラスミドは、ApoE3 (NM_000041) human cDNA clone (Origene) を制限酵素処理し、DNA Ligation Kit (Takara) を用いてpcDNA3.1+ベクター (Invitrogen) に挿入した。GeneTailer site-directed mutagenesis system (Invitrogen) を用い、ApoE2 cDNA および ApoE4 cDNA を作成した。EGFP発現ヒトApoE cDNA プラスミドは、プライマーとしてKozak-ApoE forward primer: 5'-GGGGAATTCAGATGAAGGTTCTGTGGGCTGC-3' および ApoE reverse primer: 5'-GGGGGATCCGTGATTGTCGCTGGGCAC-3'、鋳型としてApoE3-pcDNA3.1+cDNA プラスミドを用いて、ApoE3のcDNAをPCR法で増幅させた。得られたcDNAにEcoRIおよびBamHIで制限酵素処理を行い、DNA Ligation Kit (Takara) を用いてpEGFP-N3ベクター (Clontech) に挿入した。同様の実験をApoE2 cDNA, ApoE4 cDNA に対して行い、それぞれApoE2-GFP, ApoE4-GFP-N3 cDNAを得た。

2. 細胞培養と遺伝子導入

Neuro2a マウス神経芽腫細胞 (N2a細胞)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293T細胞) を使用した。N2a細胞は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) および Opti-MEM (Gibco) を等量混合し、ウシ胎仔血清 (Fetal bovine serum: FBS) 5%、非必須アミノ酸 (Non-Essential Amino Acids: NEAA) (Gibco) 1%を添加した培養液で培養した。ヒトApoE2, 3, 4を各々安定発現するN2a細胞を作成し、同様の組成の培養液にG-418 (Calbiochem) 200 μ g/mlを添加した培養液を用いて培養した。HEK293T細胞はDMEMにFBS10%を添加した培養液で培養した。遺伝子導入にはLipofectamine 2000 (Invitrogen) またはX-tremeGENE (Fugene HD) を用いた。

3. ウェスタンブロット

細胞培養液を回収した後、PBS (Phosphate buffered saline) で2回洗い、lysis buffer (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate, 5mM EDTA) を用い

て細胞を溶解し、遠心上清を細胞ライセイトとして回収した。細胞ライセイトに sample buffer (95 % Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD), 5 % 2-Mercaptoethanol (SIGMA)) を加え、96 °C で 5 分間処理した。サンプルを SDS (Sodium dodecyl sulfate) ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動により分離し、PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜 (Millipore) に転写した。FL-LR11 及び sLR11, ApoE, GFP, actin の検出には、それぞれ抗 LR11 抗体 (48/LR11) (BD Transduction Laboratories), 抗 ApoE 抗体 (E6D7) (Sigma), 抗 GFP 抗体 (1E4) (MBL), 抗 Actin 抗体 (I-19) (Santa Cruz Biotechnology) を 1 次抗体として用いた。HRP を標識した二次抗体を Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) により可視化し、densitometry による半定量化を行った。

4. 共焦点レーザー顕微鏡

X-tremeGENE 試薬を用いて ApoE3-pEGFP-N3 cDNA を HEK293T 細胞に対し一過性に導入した。また同時に N2a 細胞を glass bottom dish に撒き直し、FL-LR11 cDNA を遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後に N2a 細胞の培養液を破棄して、HEK293T の培養液と交換した。さらに 24 時間後に N2a 細胞の位相画像 (phase) と GFP 画像 (GFP) を共焦点レーザー顕微鏡で観察を行い、細胞内に取り込まれた ApoE3-GFP を Aqua Cosmos (Hamamatsu Photonics) で解析した。

5. 共培養システム

HEK293T 細胞をドナー細胞として 1.0 μ m pore の Cell Culture Inserts (BD Falcon) に培養し、レシピエント細胞である N2a 細胞と共培養を行った。HEK293T 細胞に ApoE2, ApoE3, ApoE4 の各種 ApoE cDNA または ApoE-pEGFP cDNA を一過性に遺伝子導入した。N2a 細胞には、mock もしくは FL-LR11 cDNA を遺伝子導入した。遺伝子導入 24 時間後、ドナー細胞 (HEK293T) とレシピエント細胞 (N2a) の共培養を開始した。共培養開始 24 時間後に培養液と細胞ライセイト

を回収してウェスタンブロットを行った。

6. 共免疫沈降

HEK293T 細胞に各 ApoE genotype に対応する ApoE cDNA と FL-LR11 cDNA を同時に遺伝子導入した。24 時間後に培養液を Opti-MEM に交換し、さらに 24 時間後に培養液と細胞ライセイトを回収した。培養液を用いた共免疫沈降は、バッファー (150mM NaCl, 50mM HEPES (pH7.5), 0.4 % CHAPS) を用い、細胞ライセイトには 150mM NaCl, 50mM HEPES (pH7.5), 1.0 % CHAPS を含んだバッファーを用いた。免疫沈降には抗 LR11 抗体 (48/LR11) (BD Transduction Laboratories), 抗 ApoE 抗体 (AB947) (Millipore) を用いた。その後 Protein G Mag sepharose (GE Healthcare) を加えて更に 2 時間反応させ免疫複合体を回収した。Sample buffer を加え、96 °C で 5 分間処理後に SDS-PAGE にてタンパクを分離後、免疫ブロットを行った。

7. 統計解析

解析データは平均±標準誤差で表示した。2 群間の統計解析は student の t 検定を行い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。免疫ブロットの定量は、対照群の平均を基準とした時の対象群の相対平均値を算出した。

結 果

1. FL-LR11 一過性導入による培養液および細胞内 ApoE 量変化

ApoE3 を安定発現する N2a 細胞に FL-LR11 cDNA を遺伝子導入し、培養液を交換後、培養液および細胞ライセイトに含まれる ApoE の経時的变化をウェスタンブロットで検討した (図 1A)。培養液中に分泌される 34kDa の ApoE3 は培養液を交換後、時間依存性に増加した。FL-LR11 導入細胞は、非導入細胞と比較すると細胞培養液中の分泌 ApoE 量が低下していた (図 1B)。次に、ヒト Apo2, 3, 4 を安定発現する N2a 細胞に FL-LR11 cDNA を遺伝子導入し、培養液および細胞

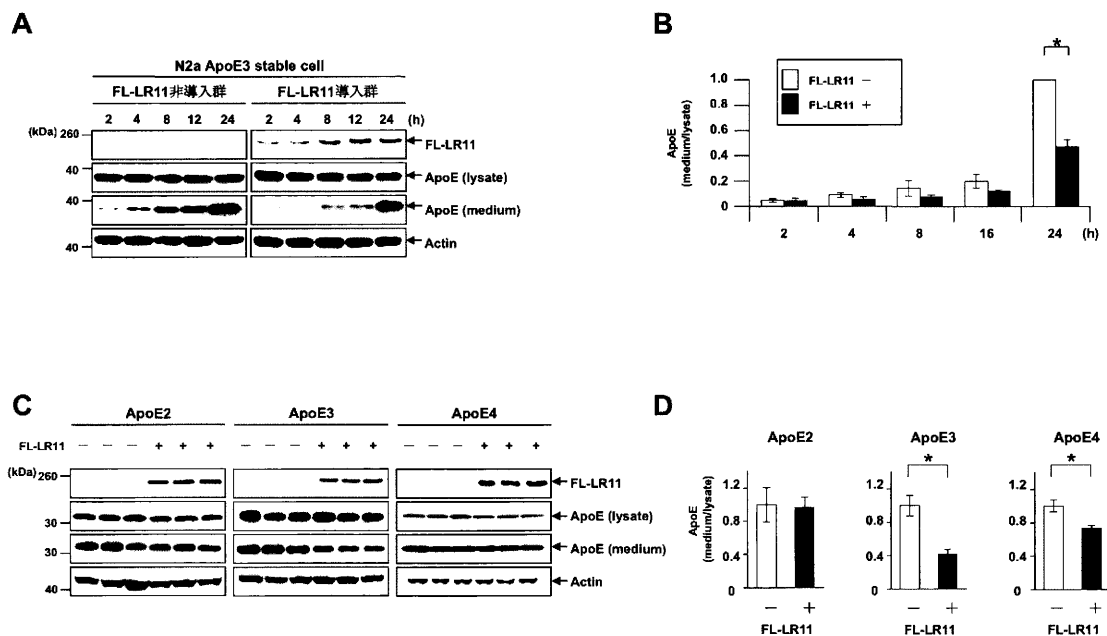


図 1 ApoE 安定発現細胞を用いた FL-LR11 による ApoE の変化

- (A) N2a ApoE3 安定発現細胞に FL-LR11 cDNA を一過性に導入し、24 時間後に培養液を交換後、培養液と細胞ライセイトを経時的 (2, 4, 8, 12, 24 時間) に回収してウェスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして抗アクチン抗体によるブロットを行った。
- (B) ApoE ブロットを densitometry により定量し、培養液/ライセイト ApoE 比率を算出した ($n = 3$)。FL-LR11 の導入により、培養開始 24 時間後の培養液/ライセイト ApoE 比率は有意に減少した (*, $p < 0.05$)。
- (C) ApoE2, 3, 4 を安定発現させた N2a 細胞に FL-LR11 cDNA を一過性に導入し、24 時間後に培養液と細胞ライセイトを回収してウェスタンブロットを行った。細胞培養液中の ApoE、細胞ライセイト中の FL-LR11 及び ApoE を免疫ブロットで検出した。
- (D) ApoE を densitometry により定量し、培養液/ライセイト ApoE 比率を算出した ($n = 3$)。FL-LR11 の導入により、ApoE3 および ApoE4 安定発現細胞の培養液/ライセイト ApoE 比率は有意に減少した (*, $p < 0.05$)。

ライセイトの ApoE 量をウェスタンブロットで検討した (図 1C)。ApoE3, ApoE4 安定発現細胞に FL-LR11 を遺伝子導入すると、FL-LR11 非導入細胞と比較して培養液/ライセイト ApoE 比率は有意に減少した。一方、ApoE2 安定発現細胞では FL-LR11 導入による培養液/ライセイト ApoE 比率の変化を認めなかった (図 1D)。

2. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた ApoE-GFP の細胞内取り込み解析

分泌された ApoE が細胞内に取り込まれる現象

を可視化するために、ApoE-GFP 融合タンパクを用いた共焦点レーザー顕微鏡による細胞の蛍光観察を行った。HEK293T 細胞に ApoE3-GFP cDNA を一過性に導入し、24 時間後に分泌 ApoE3-GFP を含む培養液を回収した。この培養液を、FL-LR11 cDNA を導入した N2a 細胞に添加し、ApoE3-GFP の細胞内への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察した (図 2A)。FL-LR11 を導入した N2a 細胞では、ApoE3-GFP の細胞内への取り込みが著明に増加した (図 2B)。

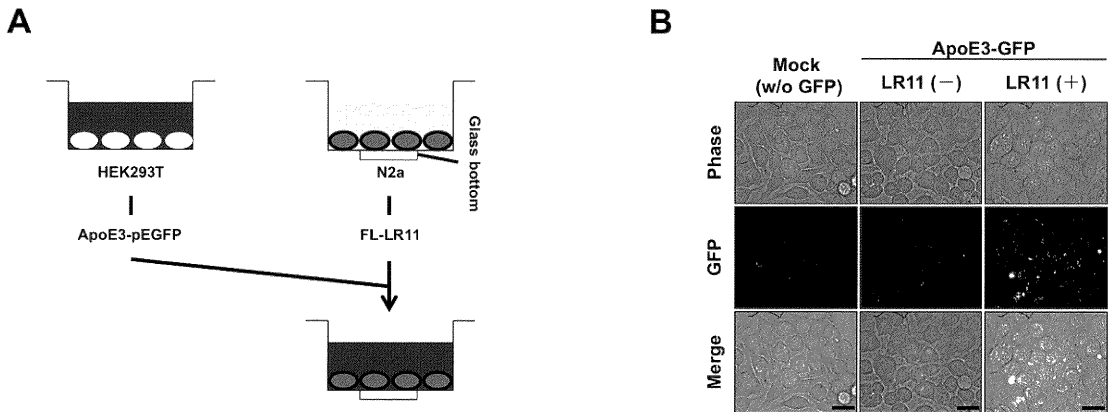


図 2 共焦点顕微鏡を用いた分泌 ApoE の細胞内取り込みの検討

- (A) 実験の模式図. HEK293T 細胞に ApoE3-pEGFP cDNA を一過性に導入した. また, glass bottom dish 上の N2a 細胞に FL-LR11 cDNA を一過性に導入した. 遺伝子導入 24 時間後, N2a 細胞に分泌 ApoE-GFP を含有する HEK293T の培養液を添加した. さらに 24 時間後, N2a 細胞の位相画像 (phase) と GFP 画像 (GFP) を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した.
- (B) 細胞内に取り込まれた ApoE3-GFP を共焦点レーザー顕微鏡で観察した. FL-LR11 を強制発現させた N2a 細胞では, ApoE3-GFP の N2a 細胞内への取り込みが著明に増加した (bar = 30 μ m).

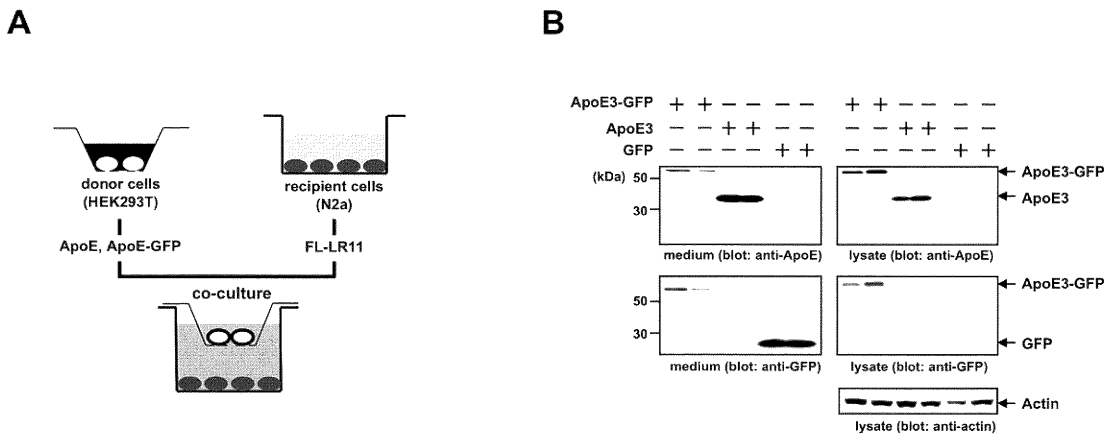


図 3 共培養システムの模式図と ApoE の細胞内取り込みの検討

- (A) 共培養システムを用いた実験の模式図. ドナー HEK293T 細胞に各 ApoE genotype に対応する ApoE cDNA を一過性に導入した. またレシピエント N2a 細胞には FL-LR11 cDNA を一過性に導入した. 遺伝子導入 24 時間後に共培養を開始し, さらに 24 時間後に培養液と N2a 細胞ライセートを回収してウェスタンブロットを行った.
- (B) ドナー HEK293T 細胞に ApoE3-pEGFP, ApoE3, GFP cDNA を一過性に導入し, レシピエント N2a 細胞への取り込みを評価した. ApoE および ApoE-GFP 発現細胞では, レシピエント細胞内に ApoE が取り込まれた. 一方, GFP 発現細胞では培養液中に GFP が検出されたが, レシピエント細胞への GFP の取り込みはみられなかった.

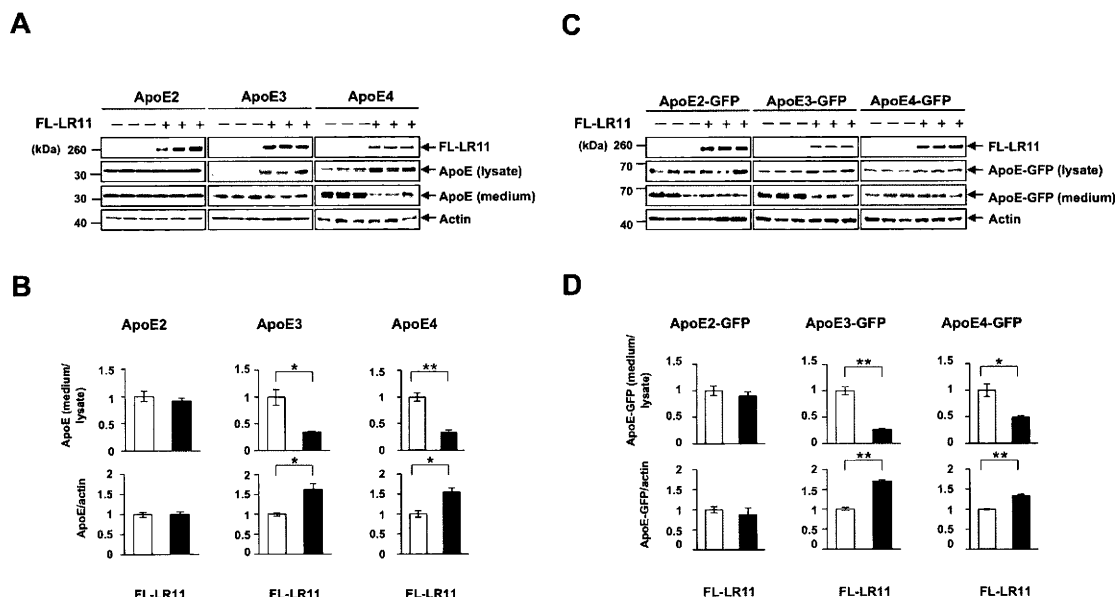


図4 共培養システムを用いた isoform 依存性の ApoE の細胞内取り込みの検討

- (A) ドナー HEK293T 細胞に各 ApoE genotype に対応する ApoE cDNA を一過性に導入し, FL-LR11 cDNA を一過性導入したレシピエント N2a 細胞への ApoE の取り込みを評価した. 細胞培養液中の ApoE, N2a 細胞ライセイト中の FL-LR11, ApoE, actin を免疫プロットで検出した.
- (B) 免疫プロットで検出した ApoE および actin を densitometry により定量した ($n = 3$). FL-LR11 の導入により ApoE3 および ApoE4 の培養液/ライセイト ApoE 比率は有意に減少した (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$). ApoE3 および ApoE4 のライセイト ApoE/actin 比率も有意に増加した (*, $p < 0.05$).
- (C) ドナー HEK293T 細胞に各 ApoE genotype に対応する ApoE-pEGFP cDNA を一過性に導入し, FL-LR11 cDNA を一過性導入したレシピエント N2a 細胞への ApoE-GFP の取り込みを評価した. 細胞培養液中の ApoE-GFP, N2a 細胞ライセイト中の FL-LR11, ApoE-GFP, actin を免疫プロットにより検出した.
- (D) 免疫プロットで検出した ApoE-GFP および actin を densitometry により定量した ($n = 3$). FL-LR11 の導入により, ApoE3 および ApoE4 の培養液/ライセイト ApoE-GFP 比率は有意に減少した (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$). また ApoE3 および ApoE4 のライセイト ApoE-GFP/actin 比率も有意に増加した (**, $p < 0.01$).

3. FL-LR11 を介した ApoE isoform 毎の細胞内取り込みの検討

FL-LR11 を介した ApoE の細胞内取り込みが ApoE isoform 依存性に生じるか否かを共培養アッセイにより検討した (図 3A). まず, 共培養アッセイでドナー細胞が分泌する ApoE が, レシピエント細胞に ApoE 依存性に取り込まれるか否かを検討した. ドナー HEK293T 細胞に GFP タンパクを発現させた場合, 分泌 GFP 単独ではレシピエント N2a 細胞に取り込まれなかった (図 3B).

一方, ドナー HEK293T 細胞に ApoE 単独もしくは ApoE-GFP 融合タンパクを発現させると, その分泌 ApoE はレシピエント N2a 細胞に取り込まれた (図 3B). このことから, レシピエント N2a 細胞の細胞内取り込みが ApoE 依存性に生じることが示唆された.

次に, ドナー HEK293T 細胞に ApoE2, ApoE3, ApoE4 の遺伝子導入を行い, ドナー細胞から分泌された ApoE のレシピエント N2a 細胞への取り込みを検討した (図 4A). FL-LR11 を遺伝子導

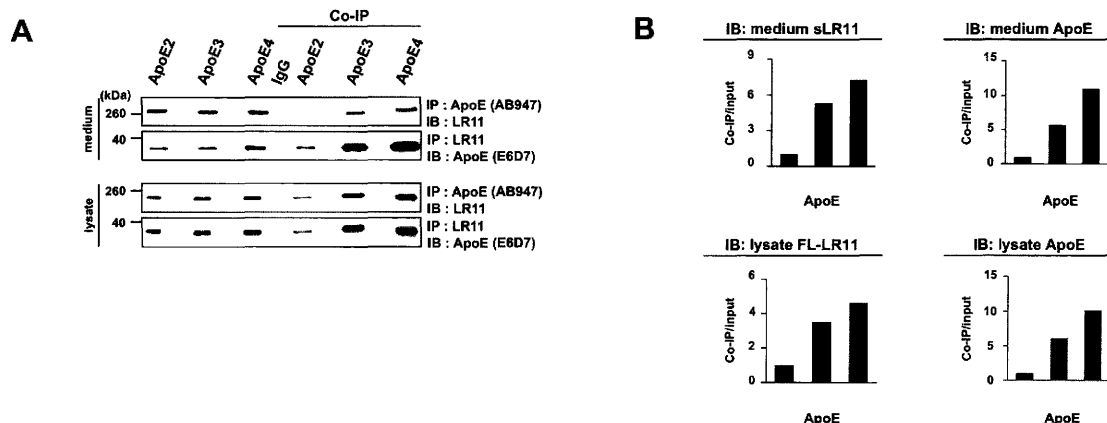


図5 共免疫沈降を用いた ApoE と LR11 の複合体形成の検討

- (A) HEK293T 細胞に、各 ApoE genotype に対応する ApoE および FL-LR11 cDNA を同時に導入し、培養液とライセイトを回収した。回収サンプルを抗 LR11 抗体および抗 ApoE 抗体 (AB947) を用いて共免疫沈降し、ウェスタンブロットを行った。免疫沈降の陰性コントロールとして非特異的 IgG 抗体を用いた。
- (B) 抗 ApoE 抗体と抗 LR11 抗体で検出されたバンドを densitometry で定量した。免疫沈降されたバンド/input ライセイトのバンドを算出し、共免疫沈降の効率を検討した。ApoE2 の免沈効率を基準に、ApoE3, ApoE4 の共免疫沈降の効率を算出した。

入したレシピエント N2a 細胞と ApoE3, ApoE4 を分泌するドナー HEK293T 細胞の共培養を行うと、培養液/ライセイト ApoE 比率は有意に減少した (図 4A, 4B)。またレシピエント N2a 細胞ライセイト中の ApoE も有意に増加した (図 4A, 4B)。一方で、ApoE2 を発現するドナー細胞との共培養では、レシピエント N2a 細胞の ApoE 量は有意な変化を認めなかった (図 4B)。同様の実験として、ドナー HEK293T 細胞に ApoE-GFP 融合タンパクを導入し、レシピエント N2a 細胞との共培養による解析を行った。図 4B で示された結果と同様に、ApoE3-GFP および ApoE4-GFP を分泌するドナー細胞との共培養では、レシピエント細胞の培養液/ライセイト ApoE-GFP 比率は有意に減少した一方で、ApoE2-GFP 分泌ドナー細胞との共培養では ApoE-GFP 比率に変化を認めなかった (図 4C, 4D)。

4. 共免疫沈降法を用いた ApoE と LR11 の複合体形成の検討

LR11 による ApoE の細胞内取り込みが ApoE isoform により異なることから、ApoE と LR11 の複合体形成が ApoE isoform により変化するかどうかについて共免疫沈降により検討した。HEK293T 細胞に ApoE2, ApoE3, ApoE4 cDNA それぞれと FL-LR11 cDNA を同時に遺伝子導入し、培養液および細胞ライセイトを用いて共免疫沈降を行った。培養液中および細胞ライセイトにおいて、抗 ApoE 抗体を用いた免疫沈降により回収された複合体は抗 LR11 抗体で検出され、また抗 LR11 抗体により回収された複合体は抗 ApoE 抗体で認識されたことから、ApoE と LR11 は細胞の内外で複合体を形成することが示唆された (図 5A)。ApoE-LR11 複合体形成量は、ApoE4 > ApoE3 > ApoE2 の順で増加していた (図 5B)。

考 察

ApoE および LR11 とともに AD 発症との関連が示唆されている分子であるが、これらの分子がどのような相互作用を有するかは明らかにされていない。本研究では、*APOE* 遺伝子多型が AD の発症リスクとなること⁶⁾、神経細胞に ApoE 受容体である FL-LR11 が強く発現していること¹⁷⁾、LR11 は ApoE 結合領域を有するという知見を背景に、ApoE isoform に着目した LR11 による ApoE 代謝調節を検討した。本研究により明らかになった点として、1) ApoE の細胞内取り込みが LR11 の強制発現により増強する、2) その効果は ApoE isoform により異なっている、3) 細胞内外で ApoE-LR11 複合体が形成され、その親和性が ApoE isoform により異なることがあげられる。

¹²⁵I-VLDL を用いた培養細胞の実験では、細胞表面の FL-LR11 は ApoE を細胞内に取り込む作用が報告されている¹⁵⁾²¹⁾。本研究の共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討においても、分泌 ApoE が LR11 依存性に細胞内に取り込まれることが観察された。一方、FL-LR11 と ApoE の相互作用を ApoE isoform に着目し検討した報告は今までにない。本研究で行った共培養システム解析では、分泌された ApoE3、ApoE4 に対して LR11 は有意に ApoE 細胞内取り込みを促進したが、ApoE2 に対してはその効果が乏しいことが示された。LDL 受容体ファミリー分子と ApoE isoform の親和性についての検討としては、LDLR が ApoE2 との親和性が低いという報告がある²⁶⁾。その理由として、ApoE2 では 158 番目のアミノ酸がシステインであるため、ApoE 分子内に生じる salt bridge の位置が他の isoform と異なり、その結果として受容体結合領域に存在する Arg150 が Asp154 と salt bridge を形成する機序が考えられている²⁷⁾。LR11 が ApoE を細胞内に取り込む機序は明らかでないが、共免疫沈降解析で ApoE-LR11 複合体形成が示唆されたことから、リガンド-受容体の相互作用により ApoE が LR11 を介して細胞内に取り込まれる可能性が考えられた。LDLR を介したエンドサイトーシスにクラスリン被覆が必要な

ことから²⁸⁾、LR11 を介したエンドサイトーシスにもクラスリンの関与が想定される。

本研究で示された isoform 依存性 ApoE-LR11 相互作用と AD 病態の関連については未だ不明な点が多い。生体内では ApoE は C 末端部で A β と結合し²⁹⁾³⁰⁾、ヒト ApoE は AD 病態に保護的に働くと考えられている³¹⁾。また、AD 患者剖検脳を用いた検討や³²⁾⁻³⁴⁾、LR11 のノックアウトマウスを AD モデルマウスと掛け合わせた際の脳病変の検討からは³⁵⁾、LR11 は AD 病態に対して保護的に働く想定されている³⁶⁾⁻³⁸⁾。本研究で示された LR11 による ApoE の細胞内取り込みの亢進は、細胞内への ApoE/HDL/A β 複合体の取り込みによって細胞内で凝集 A β のシード形成が促進することにより AD 発症に関与しているのかもしれない。

生体内の ApoE の多くは脂質化されており、髄液中の ApoE は主に HDL と結合している³⁹⁾。LDL 受容体ファミリー分子の中でも LDLR や lipoprotein receptor-related protein (LRP) は、ApoE との親和性の維持に ApoE の脂質化が必要であることが報告されている⁴⁰⁾⁴¹⁾。一方で、VLDLR は脂質化されていない ApoE とも親和性を有しており⁴¹⁾、LDL 受容体ファミリー分子の ApoE への影響には多様性がある事が示唆される。ApoE と A β の親和性にも、ApoE の脂質化が影響することが知られている。脂質化されていない ApoE3、ApoE4 はいずれも A β と結合し、ApoE4 の方が ApoE3 よりも結合速度が速い⁴²⁾。FBS を用いて脂質化すると、ApoE3 は ApoE4 の 20 倍以上の A β 結合親和性を有するようになる⁴³⁾。今回の研究では、FBS 非含有培養液を用いたアッセイ系を用いているため非脂質化 ApoE の挙動を観察していることが想定され、その結果がヒト中枢神経で実際に生じている ApoE の挙動を反映するか否かは今後の課題である。今後、ApoE を脂質化した上で LR11 や A β との親和性を ApoE isoform 毎に検討する必要がある。

本研究により、FL-LR11 が ApoE isoform 依存性に ApoE を細胞内に取り込む作用を有していることが示された。*APOE4* 遺伝子多型が AD の強

力な発症リスクになることは広く知られているが, ApoE4 がどのような機序で AD 発症を促進するかについては不明な点が多い. 今後は, ApoE の細胞内取り込みが $A\beta$ の挙動に及ぼす影響を明らかにすることで, ApoE isoform 依存性に生じる AD 病態解明の手がかりになることが期待される.

謝 辞

本研究の御指導をいただきました新潟大学脳研究所神経内科学分野教授 西澤正豊先生, 新潟大学脳研究所超域学術院准教授 池内 健先生に深謝いたします. また, 実験のご助言をいただきました新潟大学脳研究所超域学術院特任助教 小山哲秀先生, 新潟大学脳研究所神経内科学分野 徳武孝允先生に深謝いたします.

文 献

- 1) Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M and Alzheimer's Disease I: Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 366: 2112 - 2117, 2005.
- 2) Kalra RN, Maestre GE, Arizaga R, Friedland RP, Galasko D, Hall K, Luchsinger JA, Ogunniyi A, Perry EK, Potocnik F, Prince M, Stewart R, Wimo A, Zhang ZX, Antuono P and World Federation of Neurology Dementia Research G: Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. *Lancet Neurol* 7: 812 - 826, 2008.
- 3) Hardy JA and Higgins GA: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184 - 185, 1992.
- 4) Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N and Ihara Y: Visualization of A beta 42 (43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42 (43). *Neuron* 13: 45 - 53, 1994.
- 5) Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB Jr, Baker LK, Krafft GA and LaDu MJ: Oligomeric and fibrillar species of amyloid - beta peptides differentially affect neuronal viability. *J Biol Chem* 277: 32046 - 32053, 2002.
- 6) Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, Myers RH, Pericak - Vance MA, Risch N and van Duijn CM: Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta - analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA* 278: 1349 - 1356, 1997.
- 7) Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D and Mahley RW: Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E - containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 917: 148 - 161, 1987.
- 8) Kim J, Basak JM and Holtzman DM: The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron* 63: 287 - 303, 2009.
- 9) Holtzman DM, Herz J and Bu G: Apolipoprotein e and apolipoprotein e receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2: a006312, 2012.
- 10) Kim J, Castellano JM, Jiang H, Basak JM, Parsadanian M, Pham V, Mason SM, Paul SM and Holtzman DM: Overexpression of low - density lipoprotein receptor in the brain markedly inhibits amyloid deposition and increases extracellular A beta clearance. *Neuron* 64: 632 - 644, 2009.
- 11) Cao D, Fukuchi K, Wan H, Kim H and Li L: Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27: 1632 - 1643, 2006.
- 12) Hu X, Crick SL, Bu G, Frieden C, Pappu RV and Lee JM: Amyloid seeds formed by cellular uptake, concentration, and aggregation of the amyloid - beta peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20324 - 20329, 2009.
- 13) Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C and Glabe C: Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267: 546 - 554, 1992.

- 14) Gorman PM, Yip CM, Fraser PE and Chakrabarty A: Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta - amyloid peptide: Abeta association kinetics at endosomal pH. *Journal of molecular biology* 325: 743 - 757, 2003.
- 15) Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ and Saito Y: Elements of neural adhesion molecules and a yeast vacuolar protein sorting receptor are present in a novel mammalian low density lipoprotein receptor family member. *J Biol Chem* 271: 24761 - 24768, 1996.
- 16) Jacobsen L, Madsen P, Moestrup SK, Lund AH, Tommerup N, Nykjaer A, Sottrup - Jensen L, Gliemann J and Petersen CM: Molecular characterization of a novel human hybrid - type receptor that binds the alpha2 - macroglobulin receptor - associated protein. *J Biol Chem* 271: 31379 - 31383, 1996.
- 17) Motoi Y, Aizawa T, Haga S, Nakamura S, Namba Y and Ikeda K: Neuronal localization of a novel mosaic apolipoprotein E receptor, LR11, in rat and human brain. *Brain Res* 833: 209 - 215, 1999.
- 18) Jacobsen L, Madsen P, Jacobsen C, Nielsen MS, Gliemann J and Petersen CM: Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J Biol Chem* 276: 22788 - 22796, 2001.
- 19) Offe K, Dodson SE, Shoemaker JT, Fritz JJ, Gearing M, Levey AI and Lah JJ: The lipoprotein receptor LR11 regulates amyloid beta production and amyloid precursor protein traffic in endosomal compartments. *J Neurosci* 26: 1596 - 1603, 2006.
- 20) Hampe W, Riedel IB, Lintzel J, Bader CO, Franke I and Schaller HC: Ectodomain shedding, translocation and synthesis of SorLA are stimulated by its ligand head activator. *J Cell Sci* 113 Pt 24: 4475 - 4485, 2000.
- 21) Taira K, Bujo H, Hirayama S, Yamazaki H, Kanaki T, Takahashi K, Ishii I, Miida T, Schneider WJ and Saito Y: LR11, a mosaic LDL receptor family member, mediates the uptake of ApoE - rich lipoproteins in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1501 - 1506, 2001.
- 22) Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Ebinuma H, Takubo K, Kaneko H, Kasuga K, Kakita A, Takahashi H, Bujo H, Saito Y and Nishizawa M: Increased Levels of Soluble LR11 in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 30: 28 - 32, 2010.
- 23) Reitz C, Cheng R, Rogaeva E, Lee JH, Tokunishi S, Zou F, Bettens K, Slegers K, Tan EK, Kimura R, Shibata N, Arai H, Kamboh MI, Prince JA, Maier W, Riemenschneider M, Owen M, Harold D, Hollingworth P, Cellini E, Sorbi S, Nacmias B, Takeda M, Pericak - Vance MA, Haines JL, Yonkin S, Williams J, van Broeckhoven C, Farrer LA, St George - Hyslop PH and Mayeux R: Meta - analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68: 99 - 106, 2011.
- 24) Kimura R, Yamamoto M, Morihara T, Akatsu H, Kudo T, Kamino K and Takeda M: SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. *Neurosci Lett* 461: 177 - 180, 2009.
- 25) Pottier C, Hannequin D, Coutant S, Rovelet - Lecrux A, Wallon D, Rousseau S, Legallie S, Paquet C, Bombois S, Pariente J, Thomas - Anterion C, Michon A, Croisile B, Etchary - Bouyx F, Berr C, Dartigues JF, Amouyel P, Dauchel H, Boutoleau - Bretonniere C, Thauvin C, Frebourg T, Lambert JC, Campion D and Collaborators PG: High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early - onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry* 17: 875 - 879, 2012.
- 26) Simmons T, Newhouse YM, Arnold KS, Innerarity TL and Weisgraber KH: Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand - binding domain produced in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 272: 25531 - 25536, 1997.
- 27) Dong LM, Parkin S, Trakhanov SD, Rupp B, Simmons T, Arnold KS, Newhouse YM, Innerarity TL and Weisgraber KH: Novel mecha -

- nism for defective receptor binding of apolipoprotein E2 in type III hyperlipoproteinemia. *Nature structural biology* 3: 718 - 722, 1996.
- 28) Brown MS and Goldstein JL: A receptor - mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34 - 47, 1986.
 - 29) Phu MJ, Hawbecker SK and Narayanaswami V: Fluorescence resonance energy transfer analysis of apolipoprotein E C - terminal domain and amyloid beta peptide (1 - 42) interaction. *J Neurosci Res* 80: 877 - 886, 2005.
 - 30) Tamamizu - Kato S, Cohen JK, Drake CB, Kosaraju MG, Drury J and Narayanaswami V: Interaction with amyloid beta peptide compromises the lipid binding function of apolipoprotein E. *Biochemistry* 47: 5225 - 5234, 2008.
 - 31) Holtzman DM, Bales KR, Wu S, Bhat P, Parsadanian M, Fagan AM, Chang LK, Sun Y and Paul SM: Expression of human apolipoprotein E reduces amyloid - beta deposition in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Clin Invest* 103: R15 - R21, 1999.
 - 32) Scherzer CR, Offe K, Gearing M, Rees HD, Fang G, Heilman CJ, Schaller C, Bujo H, Levey AI and Lah JJ: Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 61: 1200 - 1205, 2004.
 - 33) Dodson SE, Gearing M, Lippa CF, Montine TJ, Levey AI and Lah JJ: LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65: 866 - 872, 2006.
 - 34) Sager KL, Wu J, Leurgans SE, Rees HD, Gearing M, Mufson EJ, Levey AI and Lah JJ: Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Ann Neurol* 62: 640 - 647, 2007.
 - 35) Dodson SE, Andersen OM, Karmali V, Fritz JJ, Cheng D, Peng J, Levey AI, Willnow TE and Lah JJ: Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 28: 12877 - 12886, 2008.
 - 36) Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CA, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjaer A and Willnow TE: Neuronal sorting protein - related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13461 - 13466, 2005.
 - 37) Spoelgen R, von Arnim CA, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry MC, Andersen OM, Willnow TE and Hyman BT: Interaction of the cytosolic domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta - secretase beta - site APP - cleaving enzyme. *J Neurosci* 26: 418 - 428, 2006.
 - 38) Schmidt V, Baum K, Lao A, Rateitschak K, Schmitz Y, Teichmann A, Wiesner B, Petersen CM, Nykjaer A, Wolf J, Wolkenhauer O and Willnow TE: Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in Alzheimer's disease. *EMBO J* 31: 187 - 200, 2012.
 - 39) DeMattos RB, Brendza RP, Heuser JE, Kierson M, Cirrito JR, Fryer J, Sullivan PM, Fagan AM, Han X and Holtzman DM: Purification and characterization of astrocyte - secreted apolipoprotein E and J - containing lipoproteins from wild - type and human apoE transgenic mice. *Neurochemistry international* 39: 415 - 425, 2001.
 - 40) Innerarity TL, Pitas RE and Mahley RW: Binding of arginine - rich (E) apoprotein after recombination with phospholipid vesicles to the low density lipoprotein receptors of fibroblasts. *J Biol Chem* 254: 4186 - 4190, 1979.
 - 41) Ruiz J, Kouliavskaja D, Migliorini M, Robinson S, Saenko EL, Gorlatova N, Li D, Lawrence D, Hyman BT, Weisgraber KH and Strickland DK: The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *J Lipid Res* 46: 1721 - 1731, 2005.
 - 42) Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak - Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D and Roses AD: Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform - specific

effects and implications for late - onset Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 8098 - 8102, 1993.

of apolipoprotein E to beta - amyloid. J Biol Chem 269: 23403 - 23406, 1994.

- 43) LaDu MJ, Falduto MT, Manelli AM, Reardon CA, Getz GS and Frail DE: Isoform - specific binding

(平成 25 年 1 月 16 日受付)
