

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成21年10月27日

財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 農学研究科

職 名・学 年 助 教

氏 名 松 尾 道 憲

事業区分	平成21年度・中期派遣助成	
研究課題名	中枢神経系における脂質恒常性維持の分子基盤	
受入機関	カナダ アルバータ大学	
渡航期間	平成21年4月1日 ~ 平成21年9月29日	
成果の概要	タイトルは「成果の概要/報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 無 有()	
会計報告	交付を受けた助成金額	1,275,000 円
	使用した助成金額	1,275,000 円
	返納すべき助成金額	0 円
	助成金の使途内訳 (使用旅費の内容)	滞在費(宿泊費) 1,275,000 円 ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----

成果の概要 / 松尾道憲

中枢神経系の神経細胞とグリア細胞の細胞内及び細胞間脂質輸送の分子機構を明らかにし、脂質恒常性の破綻によって引き起こされる神経変性疾患との関わりを明らかにすることを目的として、カナダアルバータ大学にて研究を行った。

派遣先の Vance 教授とその共同研究者である Campenot 教授は、神経細胞の分画培養システムという特殊な技術をこれまでに開発している。このシステムにより、神経細胞の細胞体と軸索を異なる条件下で培養することができ、さらに、軸索の再生を測定することもできる。このシステムで使える中枢神経細胞は、軸索の長さや伸長速度の観点より現在のところ網膜神経細胞に限られることから、派遣期間の前半はまずラット網膜神経細胞節の単離法と神経細胞分画培養法を習得した。後半は神経細胞分画培養システムを用いて、神経細胞とグリア細胞の細胞間脂質輸送の分子機構を解析した。また、派遣期間を通して脂質研究グループのセミナーに参加し、脂質代謝の先端的グループの知識を習得した。

これまでに、グリア細胞から分泌されるリポタンパク質(LpE)が中枢神経細胞の軸索を伸長させることが分かっていたが、その分子機構は不明であった。そこで、ラット大脳皮質アストログリア細胞を単離し、分泌される LpE を精製し、網膜神経細胞に作用させた。この際、神経細胞分画培養システムを用いて、神経細胞の軸索を切断後、軸索分画にのみ LpE を加えて、軸索の再生を調べた。その結果、LpE 依存的な軸索伸長の促進が観察された。グリア細胞の ABC タンパク質(ABCA1, ABCG1)がアポリポタンパク質(apoE)にコレステロールやリン脂質を排出することで LpE が形成されると考えられていること、LpE 中の脂質が軸索伸長を促進する可能性があることから、グリア細胞の内在性 ABC タンパク質の発現を調べ、さらに一過的に過剰発現させた。グリア細胞では、ABCA1 と ABCG1 の発現が確認され、核内受容体 LXR と RXR のアゴニスト添加により ABCA1 の発現が誘導された。また、ABCA1 と ABCG1 をそれぞれ一過的に過剰発現させたところ、ABCG1 のみが過剰発現した。これらの条件のグリア細胞から分泌された LpE を神経細胞に加えると、ABCG1 を過剰発現したグリア細胞由来の LpE で大幅な促進が見られた。また、機能を欠失した ABCG1-KM 変異体を過剰発現させてもこの効果は見られなかった。これらのことから、ABCG1 によって排出される脂質、あるいはそれによって誘導される LpE の構造変化が神経細胞の軸索伸長に重要であることが示唆された。

LpE による軸索伸長の促進は、LDL レセプターの阻害剤である RAP により阻害されることから、低密度リポタンパク質(LDL)レセプターファミリータンパク質が LpE の受容体と考えられたが、どのファミリータンパク質が受容体となるかは不明であった。LDL レセプターファミリータンパク質の一つである LRP1 の抗体で神経細胞軸索を処理もしくは LRP1 を発現抑制すると、軸索伸長の促進が阻害されたことから、LRP1 が受容体として働くことが明らかとなった。 $\alpha 2$ -macroglobulin は LRP1 のリガンドの一つであり、結合によ

って LRP1 の下流のシグナル伝達系路を活性化する。α2-macroglobulin を加えても軸索伸長を促進せず、むしろ LpE による促進を阻害することが分かった。このことから、リガンド結合によって誘起されるシグナル伝達のみでは軸索伸長の促進には不十分であり、LpE のエンドサイトーシスと脂質の作用が必要であることが示唆された。

ヒト apoE にはサブタイプが存在し、apoE4 タイプをホモで持つヒトは apoE3 タイプに比べてアルツハイマー病のリスクが高まることが知られている。そこで、apoE3 と apoE4 の軸索伸長における効果を調べた。マウスの apoE をノックアウトし、代わりにヒト apoE3 又は apoE4 をノックインした遺伝子改変マウスの大脳皮質グリア細胞から、分泌される LpE を精製し検討したところ、apoE3-LpE は軸索伸長を促進するのに対し、apoE4-LpE は促進しないことが分かった。このことは、apoE4 タイプを持つ人では、神経細胞の傷害が起こったときに、apoE3 タイプを持つ人に比べて修復が遅いことを示唆し、そのことがアルツハイマー病の病因となるのかもしれない。

最後に、LpE の作用が脂質に依存するのか、また脂質種の依存性を調べた。グリア細胞の ABCG1 が関与すること、ABCG1 はコレステロールとスフィンゴミエリンを輸送することから、精製 apoE 標品とホスファチジルコリン、コレステロールまたはスフィンゴミエリンで人工的に LpE を再構成した。これらを神経細胞に加えたところ、スフィンゴミエリンが軸索伸長の促進に重要であることが分かった。

以上をまとめると、本派遣助成により神経細胞の分画培養システムを習得した。そのシステムを利用して、グリア細胞由来の LpE が神経細胞の軸索にある LRP1 に結合し、おそらくエンドサイトーシスを介して軸索の伸長を促進することを明らかにした。また、apoE4-LpE では軸索伸長を促進しないことを示し、このことにより apoE4 がアルツハイマー病の危険因子となることが一部説明される。さらに、グリア細胞の ABCG1 がスフィンゴミエリンを排出し、生成した LpE 中のスフィンゴミエリンが神経細胞軸索の伸長促進を引き起こすことを示唆した。

以上の知見は、今後再生医療への応用が期待される。具体的には、幹細胞を神経細胞に分化させる際に、再構成した LpE を加えることにより軸索形成を促進させる可能性がある。また、中枢神経系が虚血その他で障害を受けた際に、脳内の ABCG1 の発現・活性を誘導することで、神経細胞の修復を促進できる可能性もある。今後は、得られた知見を証明するためにさらに実験を行うとともに、神経細胞に発現する ABC トランスポーターの機能についても分画培養システムを用いて検討する予定である。また、分画培養システムを海馬ニューロンなどにも適用できるよう、装置の改良にも挑みたい。