

## アストロサイトによる Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) の 発現とベータアミロイドペプチドの取り込み

山田友紀<sup>1)</sup> 加藤智子<sup>1)</sup> 佐藤晴久<sup>1)</sup> 田口弘康<sup>1)</sup> 遠山育夫<sup>1)\*</sup>

1) 滋賀医科大学・分子神経科学研究センター

### Clearance of amyloid $\beta$ peptide by astrocytes exerted through low density lipoprotein receptor-related protein

Yuki Yamada<sup>1)</sup>, Tomoko Kato<sup>1)</sup>, Haruhisa Sato<sup>1)</sup>, Hiroyasu Taguchi<sup>1)</sup>, Ikuo Tooyama<sup>1)\*</sup>

1) Molecular Neuroscience Research Center, Shiga University of Medical Science

\*Correspondence: kinchan@belle.shiga-med.ac.jp

〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町, Seta-Tsukinowa cho, Otsu, Shiga, 520-2192

#### 要旨

アストロサイトがアミロイドベータペプチド (A $\beta$ ) を取り込んで分解することが報告されているが、その取り込み機構についてはよくわかっていない。本研究では、マウスアストロサイトのセルラインを用いて、A $\beta$  の取り込みにおける low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) の関与について検討を行った。アストロサイトにおける LRP の発現を RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、免疫組織化学法で検討した。次に、アストロサイトの培養上清に蛍光標識 A $\beta$  (1-40) を投与し、共焦点レーザー顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察した後、LRP 免疫蛍光染色を行い、細胞内局在を比較した。さらに、A $\beta$  (1-40) と同時に LRP の競合的リガンドのラクトフェリンを種々の濃度で培養液中に加えた。その結果、培養アストロサイトが LRP を発現していた。アストロサイトに取り込まれた蛍光標識 A $\beta$  (1-40) は、LRP の存在部位とよく一致していた。A $\beta$  (1-40) の取り込みは、LRP の競合的リガンドであるラクトフェリンにより、量依存的に阻害された。以上の結果は、アストロサイトが LRP を介して A $\beta$  を細胞内に取り込んでいることを示唆している。鳥取臨床科学 1(1), 138-142, 2008

#### Abstracts

Although it has been suggested that astrocytes can participate in the uptake and degradation of amyloid  $\beta$  peptide (A $\beta$ ), the uptake mechanism remains unclear. We have previously shown that reactive astrocytes surrounding senile plaques express  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). In this study, therefore, we examined the involvement of LRP in A $\beta$  uptake by astrocytes. The astrocytic expression of LRP was estimated with RT-PCR, Western blot and immunohistochemical techniques. Next, we added fluorescently labeled A $\beta$  (1-40) into cultures of mouse astrocytic lined cells. The internalization of A $\beta$  was observed under a fluorescence microscope, then we conducted LRP immunofluorescence to compare the intracellular localization of A $\beta$  with that of LRP. Furthermore, different concentrations of lactoferrin, a competitive ligand for LRP, was added to the cultures to visualize a

dose-dependent inhibition of A $\beta$  uptake by lactoferrin in the cultured astrocytes. As a result, localization of the fluorescent A $\beta$  incorporated into the astrocytes matched well that of the immunofluorescence for LRP. The uptake of A $\beta$  into the astrocytes was inhibited by lactoferrin in a dose-dependent manner. The present results indicate LRP-mediated clearance of A $\beta$  by astrocytes. *Tottori J. Clin. Res.* 1(1), 138-142, 2008

Key words: アルツハイマー病, アミロイド $\beta$ タンパク, グリア細胞, ラクトフェリン, low density lipoprotein receptor-related protein (LRP); Alzheimer's disease, amyloid  $\beta$  peptide (A $\beta$ ), glial cells, lactoferrin, LRP

## 1. はじめに

最近, A $\beta$  の異常蓄積がアルツハイマー病の根本病態であるとする A $\beta$  カスケード仮説が注目されている<sup>1)</sup>. しかしながら一部の家族性アルツハイマー病を除くと, A $\beta$  の質的異常は明らかではない. 従ってアルツハイマー病の大部分を占める孤発性アルツハイマー病の発症には, A $\beta$  の質的異常よりも A $\beta$  の産生から分解に至る代謝過程の変化の方が重要と考えられる.

Wyss-Coray ら<sup>2)</sup>は, マウスアストロサイトが A $\beta$  を取り込んで分解することを報告した. しかしながら, アストロサイトが A $\beta$  を取り込むメカニズムの詳細については, 不明である. 我々は以前にアルツハイマー病患者の剖検脳で, 老人斑を取り囲む活性化したアストロサイトが, low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) を発現していることを報告した<sup>3)</sup>. LRP はニューロンやアストロサイトの細胞膜上, エンドゾーム, ライソゾームなどに存在し<sup>4)</sup>, APP を含む様々な物質と結合して取り込み, ライソゾームに運んで分解する役目を担う<sup>4,5)</sup>. こうした LRP の機能を勘案すれば, アストロサイトにおける A $\beta$  の取り込みに LRP が関与していることが推測される.

そこで本研究では, マウスのアストロサイトのセルラインを用いて, LRP の発現の有無を確認した後, アストロサイトの A $\beta$  の取り込みにおける LRP の関与について検討した.

## 2. 方法

### 2-1. 細胞培養

マウスのアストロサイトのセルライン (ATCC; CRL-2541) を用いた. 培養液は, 4 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose を添加した

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, UK) に 10% normal calf serum (大日本製薬) と抗生物質 penicillin and streptomycin を加えたものを基本培地とし, 37°C で 5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した.

A $\beta$  (1-40) および蛍光標識 A $\beta$  (1-40) は, AnaSpec (San Jose, CA, USA) から購入した. また, 滋賀医科大学実験実習機器センターで人工合成し, 高速液体クロマトグラフィーで精製したのもを用いた. 両者の間で結果に差は認められなかった. 滅菌した生理食塩水加 10 mM リン酸緩衝液 (-) PBS (pH 7.4) で 1 mg/ml の濃度に溶解後, 小分けして -80°C の冷凍庫に保存した.

蛍光標識 A $\beta$  (1-40) は, dimethyl sulfoxide (DMSO) で 1 mg/ml の濃度に溶解後, 小分けして -80°C の冷凍庫に保存した.

### 2-2. RT-PCR 法

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて, 培養アストロサイトの LRP mRNA の発現を解析した. 60 mm 組織培養デッシュ (Asahi Techno Co., Tokyo) にアストロサイトを 80% コンフルエントになるように, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の環境下で培養した. 実験直前にデッシュを PBS で 1 回洗浄を行い, 血清を除去した. 1 ml の 0.25% トリプシン液 (Nacalai, Osaka) を用いてアストロサイトを回収後, Trizol 溶液を用いて総 RNA を回収し, SuperScriptII (Life Technologies, USA) を用いて cDNA を作成した.

LRP の PCR は, upper primer を GTGCGGACT CAAGCCATCAAAAGG, lower primer を GTGCCC ATCTTCTCTGACACCTGA とし, denature を 95°C, 30 秒, annealing を 95°C, 30 秒, extension を 72°C, 60 秒の条件で, 35 サイクル増幅した. PCR 産物は, 2% のアガ