

平成11年度厚生科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業 研究報告書

老化関連疾患の病態形成における
生体内金属イオン調節機構の
役割に関する研究

2000・3

主任研究者 小川 紀雄

(岡山大学医学部教授)

平成11年度厚生科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業 研究報告書

老化関連疾患の病態形成における
生体内金属イオン調節機構の
役割に関する研究

2000・3

主任研究者 小川紀雄
(岡山大学医学部教授)

平成11年度厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究事業 研究報告書

研究課題名： 老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン
調節機構の役割に関する研究

主任研究者： 小川 紀雄（岡山大学医学部神経情報学部門 教授）

研究組織：

小川紀雄 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 教授

浅沼幹人 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 助手

岩井一宏 京都大学大学院生命医学研究科認知情報学講座 助教授

十川千春 岡山大学歯学部歯科薬理学講座 助手

難波正義 岡山大学医学部分子細胞医学研究施設細胞生物学部門 教授

三野善央 岡山大学医学部衛生学講座 助教授

目 次

<総括研究報告書>

「老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン調節機構の役割に関する研究」
小川 紀雄（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門） ... 5

<分担研究報告書>

「老化モデル動物の脳内金属代謝の解析」
小川 紀雄（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門） ... 11

「金属イオンによる細胞傷害の発現機構に関する検討」
浅沼 幹人（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門） ... 17

「鉄代謝のマスター蛋白 IRP2の神経変性疾患への関与に関する研究」
岩井 一宏（京都大学大学院生命医学研究科認知情報学講座） ... 23

「メタロチオネイン-IIIの発現様式と神経生存維持の検討に関する研究」
十川 千春（岡山大学歯学部歯科薬理学講座） ... 27

「老化を示すヒト正常線維芽細胞と不死化ヒト線維芽細胞とに対する
鉄イオンの影響に関する研究」
難波 正義（岡山大学医学部分子細胞医学研究施設細胞生物学部門） ... 31

「アルツハイマー病とアルミニウムに関する疫学研究のメタアナリシス」
三野 善央（岡山大学医学部衛生学講座） ... 36

総括報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

老化関連疾患の病態形成における生体内金属イオン調節機構の
役割に関する研究

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門教授

研究要旨

老化関連疾患の制御の端緒を拓くことを目指し、老化と金属イオン調節異常の共通の機序について検討した。鉄イオンによるフリーラジカル生成と脳脂質過酸化ならびにタンパク質酸化の間には強い相関があるが、銅では強いフリーラジカル生成はみられるものの生体内高分子による阻止効果により脂質過酸化、タンパク質酸化がみられないこと、鉄代謝制御因子 IRP2 の酸化依存的ユビキチン修飾に UbcH5s がユビキチン結合酵素として機能していること、トランスフェリン産生の少ない不死化細胞ではミトコンドリア障害を介した鉄添加による酸素濃度依存性の細胞死がより強く惹起されること、メタロチオネイン-III (MT-III) が加齢により特定の脳部位で増加し、酸化ストレスによる MT-III の発現誘導が加齢に伴い消失すること、この MT-III の発現動態がアポトーシス関連蛋白 caspase-3 と酷似していること、グリア細胞での MT-III 発現を抑制するとドパミン(DA)の細胞毒性が増強されること、アルミニウムが比較的少量の鉄存在下でフリーラジカル生成生成、脳脂質過酸化および神経細胞死を増強し、グリア細胞での MT-III mRNA 発現を減少させること、また DA がアルミニウムとの共存下で細胞障害性に作用すること、メタアナリシスにより飲料水によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病を惹起する可能性があること等を明らかにした。以上のように、老化関連疾患の病態には、鉄、銅、亜鉛、アルミニウムの調節機構の異常が深く関与していることを明らかにした。

分担研究者

浅沼幹人 岡山大学医学部分子細胞医学
研究施設神経情報学部門 助手
岩井一宏 京都大学大学院生命医学研究科
認知情報学講座 助教授
十川千春 岡山大学歯学部歯科薬理学講座
助手
難波正義 岡山大学医学部分子細胞医学
研究施設細胞生物学部門 教授
三野善央 岡山大学医学部衛生学講座
助教授

A. 研究目的

生体内金属イオン調節機構とその異常機序を明らかにすることによって老化および老化関連疾患の有効な制御法を開発することを目的として、これまで基礎的検討ならびに金属イオン代謝異常の役割に関する検討を行った。本年度は、さらに遺伝子、分子、細胞、臓器レベルでの金属イオンの特異的代謝制御機構と加齢による変化の解析を行った。具体的には、① 鉄、銅イオンによる水酸化ラジカル (HO \cdot)生成と、脳組織ホモジネートにおける過

酸化脂質ならびに carbonyl 化酸化修飾タンパク質(OMP)の経時的変化の検討, ② 鉄代謝制御因子である IRP2 の酸化依存的ユビキチン修飾に関与する酵素群の検索, ③ ヒト正常細胞と不死化細胞に対する鉄の傷害作用の差異と酸素環境条件の影響に関する検討, ④ 亜鉛結合タンパク質メタロチオン-III (MT-III), アポトーシス関連蛋白 caspase-3 と Bax の老齢ラット脳内における発現の変化と酸化ストレスを惹起する菌体毒素 lipopolysaccharide (LPS)投与の影響についての検討, ⑤ 培養グリア細胞における MT-III 遺伝子発現抑制のドパミン(DA)細胞毒性への影響, 鉄, 銅, アルミニウムの MT-III mRNA 発現に対する影響についての検討, ⑥ 鉄イオンによる HO \cdot 生成, 脳脂質過酸化および神経細胞死に対するアルミニウム添加の影響, DA とアルミニウムの共存による培養神経細胞生存率への影響についての検討, ⑦ 制酸剤および飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究のメタアナリシス, 等を行った.

B. 研究方法

① 鉄, 銅イオンによる HO \cdot 生成, 脳ホモジネートの脂質過酸化ならびにタンパク質 carbonyl 化の経時的変化を, 電子スピン共鳴装置による HO \cdot の検出, ラット前脳ホモジネートの自動酸化による過酸化脂質ならびに OMP の定量により検討した.

② バキュロウイルス発現系を用いて精製した IRP2 を用い, 酸化変化を受けた IRP2 の in vitro ubiquitination assay 系を樹立し, IRP2 のユビキチン修飾を指標に IRP2 のユビキチン修飾に関与する酵素群の検索を行った.

③ 正常ヒト線維芽細胞ならびに Co⁶⁰ γ 線照射で不死化した細胞に, NTA キレート鉄を添加し, 細胞増殖率, コロニー形成率, ミトコンドリア機能(MTT アッセイ), LDH 活性の変化を調べた. また, 鉄による細胞傷害への 1%低酸素環境ならびにフリーラジカル消去剤の影響も検討した.

④ 老齢および若齢ラットを用い, 脳, 脾臓での MT-III mRNA 発現を RT-PCR により, 脳内での MT-III, caspase-3, Bax 陽性細胞を免疫組織化学染色により検出した. また, LPS 投与によるこれらの変化についても検討した.

⑤ 培養グリア細胞に MT-III mRNA に対するアンチセンスオリゴDNA を導入し, DA 添加による細胞生存率の変化を調べた. また, 鉄, 銅, アルミニウムイオンを添加し, MT-III mRNA 発現の変化を検討した.

⑥ アルミニウムと鉄イオンの共存下での HO \cdot 生成ならびに脳ホモジネートの脂質過酸化を, 上述の方法で検討した. また, ラット DA 系神経細胞に鉄, 銅, 亜鉛, アルミニウムイオンを添加し細胞生存率の変化ならびに DA 同時添加の影響について検討した.

⑦ 「アルツハイマー病」, 「アルミニウム」, 「疫学, コホート研究あるいは症例対照研究」をキーワードとして文献検索し, 制酸剤・飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての症例対照研究, ecological 研究についてメタアナリシスを行った.

C. 研究結果

① 脳ホモジネートの自動酸化による過酸化脂質(TBARS 量), carbonyl 化酸化修飾タンパク質(OMP 量)は, Fe(II), Fe(III)の添加により経時的に著明に亢進し, HO \cdot 生成と TBARS ならびに OMP の間に強い相関がみられたが, Cu(II)添加では TBARS 量, OMP 量の増加はみられず著明な HO \cdot 生成と TBARS ならびに OMP の間に相関は認められなかった. 銅結合タンパクであるセルロプラスミンは銅イオンによる HO \cdot 生成を有意に抑制した.

② ヒト HeLa 細胞の S100 ライセートを用い, 鉄イオンにより酸化修飾を受けた IRP2 が選択的にユビキチン修飾を受ける in vitro ubiquitination assay 系を樹立した. ATP のかわりに ATP γ S を用いても酸化 IRP2 特異的なユビキチン修飾が観察された. ライセートを陰イオン交換カラム非結合分画(Fr I)と結合分

画(Fr II)に分画したところ、Fr IとFr IIを加えた場合にのみ酸化IRP2のユビキチン修飾が観察された。レコンビナントE2(ユビキチン結合酵素)とFr IIを用いた検討により、UbcH5a, b, cがIRP2のユビキチン修飾を触媒するE2であることが判明した。

③ トランスフェリン産生の少ない不死化細胞では正常細胞に比べ、鉄添加により細胞増殖ならびにコロニー形成がより強く抑制されていた。鉄による細胞傷害作用はMTTアッセイでは、不死化細胞において正常細胞よりも有意に強く認められたが、LDH活性については差異はみられなかった。この鉄による細胞傷害は、ビタミンE、マニトール、DMSOで軽減され、また活性酸素産生量が低下している1%低酸素条件下では認められなかった。

④ 老齢ラットの基底核のMT-III mRNAは若齢ラットに比べ増加していた。若齢ラットではLPS投与によりMT-III mRNAは著明に増加していたが、老齢ラットではLPS投与によるMT-III mRNAの発現誘導は消失していた。MT-III陽性細胞は加齢により大脳皮質、梨状葉、視床下部、扁桃核で増加しており、またLPS投与により若齢ラットのこれらの脳部位でみられた著明なMT-IIIの発現誘導は老齢ラットでは認められなかった。さらに、このMT-IIIの加齢に伴う分布ならびに発現動態の変化はcaspase-3のそれと酷似していた。

⑤ 培養グリア細胞にMT-IIIアンチセンスオリゴDNAを導入しても細胞生存率は不変であったが、DA添加による細胞生存率の低下はMT-IIIアンチセンスオリゴDNA導入細胞では有意に抑制されていた。Al(III)添加によりMT-III mRNAの発現はわずかであるが減少したが、Fe(III)、Cu(II)添加では不変であった。

⑥ Al(III)単独ではほとんどHO・生成はみられず、過酸化脂質をむしろ軽度減少させた。しかし、比較的少量のFe(II)が存在すると、Al(III)はFe(II)によるHO・生成と脂質過酸化を濃度依存的に有意に増加させた。ラットDA系神経細胞において、Al(III)は単独では高濃度

でも細胞生存率に影響を与えなかったが、鉄イオンFe(II)、Fe(III)と同時に添加すると鉄イオンによる細胞死を著明に増悪させた。また、生存率に影響しない程度の濃度のDAはFe(II)、Fe(III)による細胞死を明らかに抑制したが、DAとAl(III)が共存すると著明な細胞死が惹起された。DA系神経細胞への金属イオン単独添加による神経毒性は、Zn(II)が最も強く、ついでCu(II)、Fe(III)、Fe(II)の順であった。

⑦ 制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての症例対照研究(6件)の併合オッズ比(95%信頼区間)は1.11(0.85-1.44)であったが、飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究(3件)のそれは1.17(1.04-1.31)となり関連が認められた。

D. 考察

鉄イオンはFenton様反応によりHO・を生成し、脂質過酸化、タンパク質酸化、核酸分解などの反応を惹起し、細胞死を招くと考えられていたが、本検討によりはじめて鉄によるHO・生成と脳組織ホモジネートにおける脂質過酸化ならびにタンパク質carbonyl化の間に強い相関があることを明らかにした。これに対して、銅イオンでは過酸化脂質やOMPの増加は認められず、銅によるHO・生成はセルロプラスミンにより抑制された。銅によるHO・生成と脳脂質過酸化がDA添加により著明に抑制されたという昨年度の結果と併せると、通常の状態では銅イオンの強いHO・生成能はセルロプラスミン、アルブミン、DAなどの生体内高分子によって阻止されて組織傷害性に働きにくくなっていると考えられる。

ATP γ Sを用いたin vitro ubiquitination assayにおいても酸化IRP2特異的なユビキチン修飾が検出され、UbcH5a, b, cがIRP2のユビキチン修飾を触媒するユビキチン結合酵素となることを明らかにした。これらより、酸化修飾そのものが選択的ユビキチン修飾のシグナルとなることが強く示唆された。タンパ

ク質の酸化変化による凝集，封入体形成は種々の神経変性疾患において病因の一つとして注目されており，IRP2の酸化修飾を認識するユビキチン修飾系を検索することは，多くの神経変性疾患における封入体形成メカニズムの解析につながると期待される。

これまでに，老化を示すヒト正常線維芽細胞がその不死化細胞に比べ多くのトランスフェリンを産生していることをみいだした。今回の検討において，トランスフェリン産生の少ない不死化細胞ではミトコンドリア障害を介した鉄添加による細胞死がより強く惹起されたことから，不死化細胞は鉄が十分にキレートされないためにフリーラジカルに高感受性になっており，これが遺伝子を変異し易くする原因になっていると考えられる。また，この鉄による細胞傷害は組織の酸素濃度によって左右されることも明らかにできた。

脳特異的な亜鉛代謝調節タンパク質 MT-III およびその mRNA が加齢により特定の脳部位で増加していたが，MT-III はフリーラジカル消去能も有することから，加齢による酸化ストレス増大に対する防御機転と考えられる。また，加齢により LPS による MT-III 発現誘導が消失していたが，この誘導性の低下が加齢脳の酸化ストレスに対する脆弱性に結びついていると考えられた。さらに，MT-III と caspase-3 の脳内分布や加齢に伴う発現動態が酷似していることは，酸化ストレスによるアポトーシス様の脳細胞死に MT-III が密接に関与することを示唆するものとして注目される。培養グリア細胞に MT-III アンチセンスオリゴ DNA を導入し MT-III 発現を抑制すると DA による細胞死がより増強された。これは，DA の細胞障害性に対する MT-III の防御的役割を裏付けるものと考えられる。亜鉛イオンが銅，鉄イオンに比べはるかに強い細胞毒性を発揮したことから，亜鉛の強い神経細胞毒性とその防御機構に MT-III が密接に関与している可能性も考えられる。

外来性金属アルミニウムは単独では細胞傷

害作用を持たないことから，他の内在性物質と作用し合う可能性を想定した。アルミニウムが比較的少量の鉄イオンとの共存下で HO \cdot 生成，脳脂質過酸化および神経細胞死を著明に増強し，DA との共存下では著明な細胞死をもたらしたことは，アルミニウムが内在性の鉄イオンや DA などと作用し合って細胞障害性に作用し得ることを示唆している。さらに，培養グリア細胞においてアルミニウムは MT-III mRNA の発現を減少させた。昨年度報告したアルミニウムによる IRP2 の RNA 結合能の増加とそれに続く鉄の傷害性の増強を考え併せると，アルミニウムは金属イオンと金属調節タンパク質の 2 層にわたり金属による細胞傷害の増悪因子となり得ると考えられる。

メタアナリシスによる分析により，制酸剤によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病の危険要因とはならないが，飲料水によるアルミニウム摂取は危険要因となる可能性が示唆された。しかし，飲料水からのアルミニウム暴露は少量で慢性的であるので，今後より正確な暴露量の推定が求められる。

E. 結論

老化関連疾患制御の端緒を拓くことを目的として，遺伝子，分子，細胞，臓器レベルでの金属イオンの特異的代謝制御機構と加齢による変化の解析を行った。アルミニウムと鉄あるいは DA のように，金属イオンの相互連関あるいは生体内高分子によって金属イオンによる細胞傷害性は修飾されていることを明らかにした。トランスフェリン，セルロブラスミン，MT-III などの金属結合タンパク質が酸化ストレスによる細胞傷害に対して防御的に働いていること，また加齢により MT-III の誘導性が低下すること，さらに金属代謝制御因子の IRP2 は酸化修飾により選択的ユビキチン修飾をうけることを示した。これらの生体内金属イオン代謝調節機構の異常ならびに破綻が老化関連疾患の病態形成に密接に関与していることを明らかにした。

分担報告書

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化動物の金属制御タンパクの解析

主任研究者 小川 紀雄

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 教授

研究要旨

亜鉛代謝調節タンパク質であるメタロチオネイン(MT)-IIIの脳内発現と酸化ストレスによる誘導性の加齢に伴う変化を明らかにするために、MT-IIIを誘導する菌体毒素 lipopolysaccharide (LPS)を老齢ラットに投与し、脳内のMT-IIIとそのmRNAならびにアポトーシス関連蛋白 caspase-3, Baxの発現の変化について検討した。基底核のMT-III mRNAは加齢に伴い代償性に増加していたが、LPS投与によるMT-III mRNA発現誘導は消失していた。MT-III陽性細胞は加齢により大脳皮質、梨状葉、視床下部、扁桃核で増加すること、またLPS投与により若齢ラットのこれらの脳部位でみられた著明なMT-IIIの発現誘導は老齢ラットでは認められないこと、さらにこのMT-IIIの加齢に伴う分布ならびに発現動態の変化がcaspase-3のそれと酷似していることを明らかにした。以上、老齢脳においては酸化ストレスに対するMT-IIIの誘導性の低下が老化脳組織の酸化ストレスに対する脆弱性と易傷害性の基盤となっている可能性を示した。

A. 研究目的

生体はその代謝活動に種々の金属を利用しているが、その反面、これら金属が惹起する酸化ストレスを受ける危険に常にさらされている。老化による神経細胞死の原因として脳内の金属代謝の破綻による酸化ストレスの増加が想定される。老化に伴う脳内の金属代謝の変化を検討するために、これまで、老齢ラット脳内の微量元素（鉄、銅、亜鉛、アルミニウム）の含有量を測定し、鉄および銅が加齢によりいくつかの脳部位で増加していること、鉄結合タンパクであるトランスフェリン、フェリチン陽性細胞が増加していることを報告し、老化脳が酸化ストレスを生じやすい環境にあることを示した。また、神経伝達機構に重要である亜鉛は加齢により減少し、老化脳ではこれら金属の代謝に異常が生じている

可能性も明らかにした。さらに、Parkinson病モデルの黒質-線条体系において、levodopa投与による亜鉛代謝調節タンパクのメタロチオネイン(metallothionein; MT)-III mRNAの増加がみられず、生体の反応性が低下していることを明らかにした。MT-IIIは中枢神経系に特異的に発現し、神経成長抑制作用を有するgrowth inhibitory factorとして発見され、さらに正常老人脳に比べAlzheimer病脳で減少していることから、Alzheimer病をはじめ様々な神経変性疾患との関連が注目されている。しかし、その作用および発現調節などは未だ十分に解明されていない。そこで本研究では、MT-IIIの加齢に伴う脳内変化と酸化ストレスによる誘導性の変化を明らかにするために、MT-IIIを誘導する菌体毒素 lipopolysaccharide (LPS)を老齢ラットに投与し各脳部位での

MT-III mRNA の発現, さらには MT-III ならびにアポトーシス関連蛋白である caspase-3 と Bax の発現の変化を免疫組織化学的に解析した。

B. 研究方法

1. 老齢ラット脳, 脾臓での MT-III mRNA の RT-PCR

若齢(9 週齢), 老齢(24 ヶ月齢) Fischer 系ラットに LPS (20 mg/kg)あるいは生食を腹腔内投与し 2, 6 時間後に大脳皮質, 線条体, 視床+中脳の各脳部位, さらに対照の末梢組織として脾臓を取り出した。摘出した各組織から acid-guanidium-phenol-chloroform (AGPC) 法に従って total RNA を抽出し, 37°C で 30 分間 DNase I (0.05U/ μ g RNA) 処理を行った。MT-III mRNA 発現レベルは, total RNA (0.05 μ g), MT-III cDNA に特異的な primer set と [α - 32 P]dCTP を用いた reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) を 25 cycle で行い, PCR 生成物を 8% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し解析した。内部標準としては β -actin を用いた。

2. 老齢ラット脳の MT-III, caspase-3, Bax の免疫組織化学

若齢 (9 週齢), 老齢(24 ヶ月齢) Fischer 系ラットに LPS (20 mg/kg)あるいは生食を腹腔内投与し 6 時間後に, sodium pentobarbital 深麻酔下(70 mg/kg, i.p.)で 4% paraformaldehyde による経左心室灌流固定を行い, 脳を取り出し, 4% paraformaldehyde, 15% sucrose 中にそれぞれ 24, 48 時間静置し, その後 20 μ m 厚の凍結切片を作製した(各群 n=4)。脳切片での MT-III, caspase-3, Bax 陽性細胞の検出は, それぞれに対するポリクロナル抗体を用いた ABC 法による免疫組織化学染色で行い, シグナルは nickel-diaminobenzidine により増感した。

C. 研究結果

1. 老齢ラット脳, 脾臓での MT-III mRNA の変化と LPS 投与の影響

① MT-III は中枢神経系において特異的に発現すると報告されている。本検討においても MT-III mRNA の発現は各脳部位で認められたが (図 1), 脾臓では認められなかった。

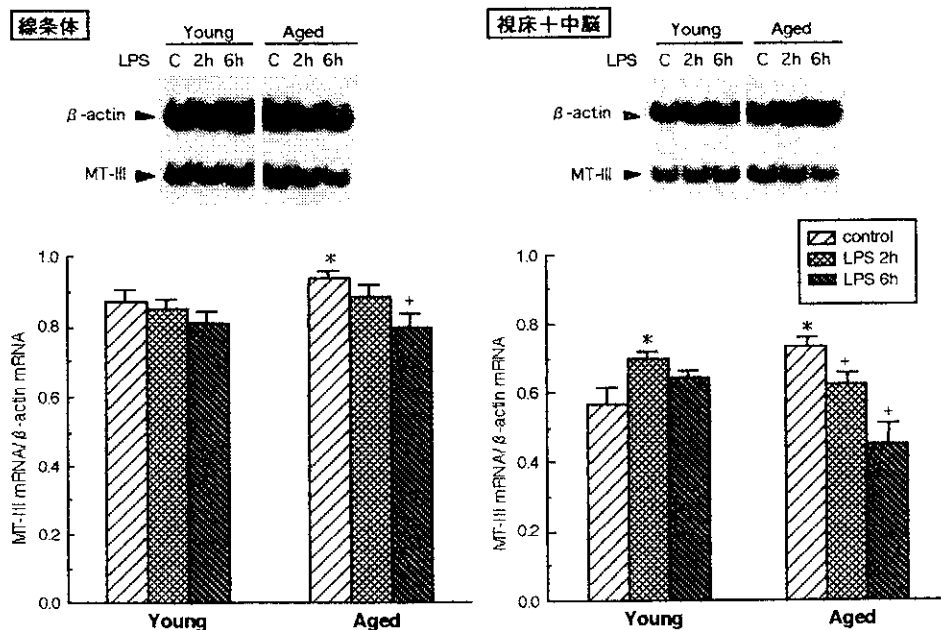


図1 若齢ラット(9週齢), 老齢ラット(24週齢)の線条体, 視床+中脳における MT-III mRNAの発現とLPS (20 mg/kg, i.p.)投与の影響

*p<0.05 compared with young control; +p<0.05 compared with aged control.

② 老齡ラットと若齡ラットのMT-III mRNA 基礎発現量は大腦皮質では差異はみられなかったが、線条体および視床+中脳では加齢に伴い増加していた(図1).若齡ラットの視床+中脳ではLPS投与2時間後にMT-III mRNA 発現量は有意に増加したが、老齡ラット脳では逆に2時間後から有意に減少した(図1右).また若齡ラットの線条体ではLPS投与によるMT-III mRNA 発現の有意な変化はみられなかったが、老齡脳で投与6時間後にMT-III mRNA 発現量が減少した(図1左). 大腦皮質では若齡,老齡に関わらずMT-III mRNA 発現はLPS投与によって影響されなかった.

2. 老齡ラット脳でのMT-III, caspase-3, Bax の変化とLPS投与の影響

① MT-III 陽性細胞(図2):若齡ラット脳内では帯状回, 頭頂~側頭皮質第3層, 梨状葉, 視床下部, 扁桃核, 海馬齒状回に局限してMT-III 陽性細胞がごく軽度発現していた. 老齡ラットではこれらの部位でのMT-III 陽性細胞の集積・増加が認められた. 特に前頭, 側頭皮質, 梨状葉, 視床外側核, 視床下部での発現増加が著明であった. LPS投与により若齡ラットの側頭皮質全層, 側頭皮質第3層, 梨状葉, 視床下部, 扁桃核では, 著明なMT-III 陽性細胞の集積がみられた. しかし, 老齡ラット脳では, 若齡ラットで見られるようなLPS投与によるMT-IIIの発現増加は認められず, 大腦皮質浅層ではむしろ陽性細胞数が減少した.

② Caspase-3 陽性細胞(図3):Caspase-3 陽性細胞も若齡ラット脳内では, 頭頂~側頭皮質第3層, 梨状葉, 視床下部, 扁桃核に局限してわずかに発現がみられた. 老齡ラットでは前頭皮質第3, 5層, 側頭皮質, 梨状葉, 視床下部, 扁桃核, 海馬齒状回でのcaspase-3 陽性細胞の著明な集積が認められた. LPS投与若齡ラットでは, 前頭~頭頂~側頭皮質浅層, 梨状葉, 視床外側核, 視床下部, 扁桃核において著明なcaspase-3 陽性細胞の集積が認められ, 線条体内側部においても軽度の発

MT-III immunoreactivity

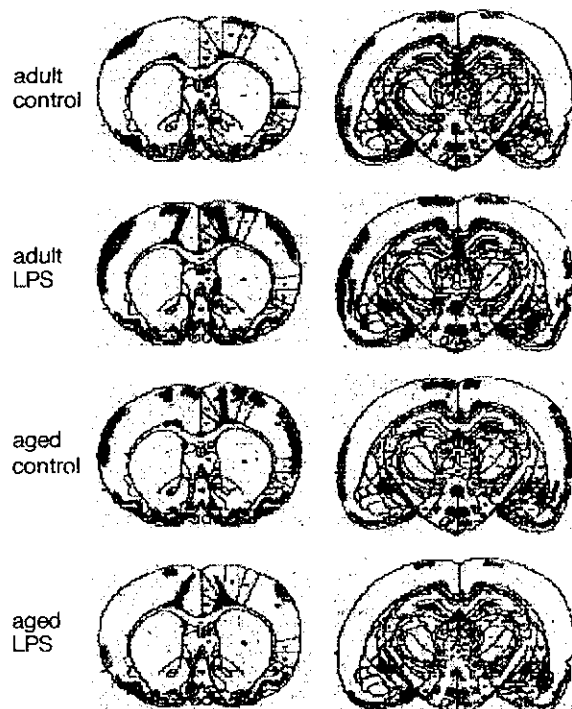


図2. 若齡・老齡ラットにおけるMT-III陽性細胞の脳内分布とLPS(20 mg/kg, i.p.)投与の影響

Caspase-3 immunoreactivity

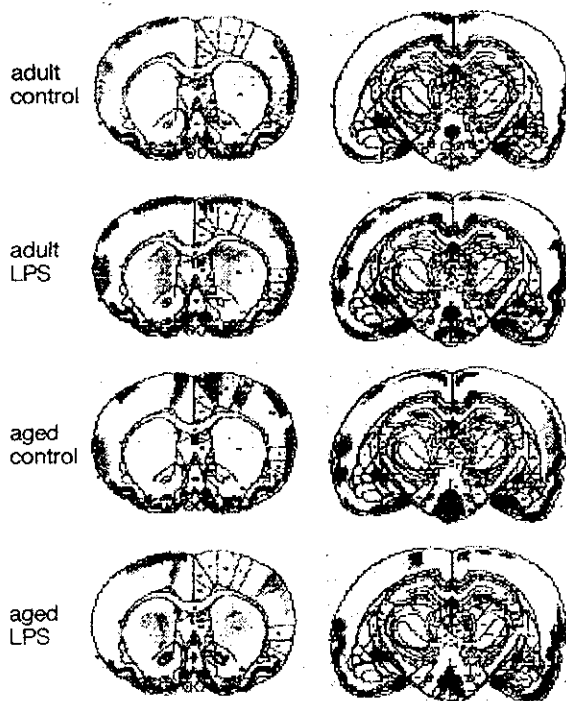


図3. 若齡・老齡ラットにおけるcaspase-3陽性細胞の脳内分布とLPS(20 mg/kg, i.p.)投与の影響

現増加が見られた。一方、老齡ラット脳では LPS 投与による caspase-3 陽性細胞の発現増加はみられず、前頭～頭頂皮質第 3 層では逆に減少した。

③ Bax 陽性細胞：Bax 陽性細胞の分布は前 2 者と異なり、若齡対照ラットでは線条体外側部と黒質に強い集積がみられ、頭頂～側頭皮質浅層、梨状葉、第 3 脳室周囲核、扁桃核にわずかに発現がみられた。老齡ラットでは線条体、黒質、梨状葉、前頭、側頭皮質浅層、扁桃核、海馬 CA3-4 領域において、Bax 陽性細胞の発現は著明に増加していた。LPS 投与により若齡ラットでは、線条体、黒質、梨状葉、前頭～頭頂～側頭皮質浅層、海馬 CA3-4 領域において若齡対照ラットに比して著明な Bax 陽性細胞の発現増加が認められたが、老齡ラット脳では LPS 投与による Bax 陽性細胞の発現増加は認められなかった。

D. 考察

脳は種々の金属イオンをエネルギーの産生、酵素の生成、神経伝達等に利用している。一昨年度われわれは老齡ラット脳内の微量金属（鉄、銅、亜鉛、アルミニウム）の含有量を原子吸光光度計を用いて測定し、鉄および銅は加齢によりいくつかの脳部位で成年対照ラットに比して増加していることを明らかにした。鉄や銅はフリーラジカルの発生素地となり得るため、老化脳が酸化ストレスを生じやすい環境にあることが示唆された。このような脳内に蓄積した過剰の金属は神経細胞にとって好ましくなく、加齢による神経細胞死の原因の一つになっている可能性がある。昨年度は、加齢により大脳皮質、海馬の鉄結合タンパク質であるトランスフェリン、フェリチン陽性細胞が増加し、これらの部位では遊離鉄、貯蔵鉄がともに増加し、フリーラジカルが発生しやすく神経細胞が傷害されやすい環境にあることを示した。加齢に伴う亜鉛代謝の変化については、一昨年度われわれは亜鉛が加齢により減少していることを、十川ら

はグリア細胞においてドパミンと levodopa により亜鉛代謝調節タンパクである MT-III mRNA の発現誘導が高まること、さらにその誘導がドパミンレセプターを介するものではなく、フリーラジカルによる制御機構を介していることを明らかにした。また、昨年度われわれは MT-III mRNA が Parkinson 病モデルの黒質-線条体系で down-regulate されており、levodopa 投与により正常であれば生じるはずの MT-III mRNA の増加がみられず、生体の反応性が低下していることを明らかにした。MT-III はそれ自身がフリーラジカル消去能を有していることから、MT-III が脳内での酸化ストレスに対する反応性に深く関与している可能性が示唆された。

そこで、本年度は MT-III の加齢に伴う脳内変化と酸化ストレスによるその誘導性の変化について検討した。MT-III mRNA の基礎発現量は、加齢に伴い線条体および視床+中脳において代償性に up-regulate されていた (図 1)。若齡ラット視床+中脳での LPS による MT-III mRNA の発現誘導は酸化ストレスに対する生体の防御反応と考えられるが、老齡ラットでは若齡ラットでみられる LPS 投与による MT-III mRNA 発現誘導が起こらず、むしろ抑制されていた(図 1)。免疫染色による MT-III 自体の加齢に伴う脳内変化についても詳細に検討したところ、MT-III の発現は大脳皮質(帯状回、前頭～頭頂～側頭皮質第 3 層)、梨状葉、視床下部、扁桃核の各脳部位において加齢により増加していた。さらに、LPS 投与により若齡ラットではこれらの脳部位で著明な MT-III の発現誘導がみられたが、この LPS による MT-III の発現誘導が加齢に伴い消失していることが明らかとなった(図 2)。この加齢に伴う MT-III の反応性の変化は、MT-III mRNA の動態と一致している。これらの結果より、老齡脳では酸化ストレスに対する MT-III の誘導性が若齡脳と比べると低下しており、この誘導性の低下が加齢脳の酸化ストレスに対する脆弱性に結びついているものと

考えられた。さらに、アポトーシスのキーファクターである caspase-3 の加齢に伴う脳内分布と LPS に対する誘導性の変化は MT-III の発現動態の変化と酷似していた(図 3)。これは、酸化ストレスによる脳組織における細胞死に MT-III が密接に関与していることを示唆するものとして注目される。

E. 結論

加齢に伴う MT-III の脳内発現の変化と酸化ストレスを惹起する LPS によるその誘導性の変化について検討した。MT-III およびその mRNA が加齢により特定の脳部位で増加すること、また LPS 投与によりこれらの脳部位で見られる著明な MT-III の発現誘導が加齢に伴い消失すること、さらにこの MT-III の加齢に伴う脳内分布ならびに酸化ストレスに対する発現動態の変化がアポトーシス関連蛋白の caspase-3 の脳内分布と酷似していることを明らかにした。この老齢脳における酸化ストレスに対する MT-III の誘導性の低下が、老化脳組織の酸化ストレスに対する脆弱性と易傷害性の基盤となっている可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Iwata-Ichikawa, E., Kondo, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Glial cells protect neuronal cells against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione system. *J. Neurochem.*, 72: 2334-2344, 1999.
- ② Kondo, Y., Asanuma M., Iwata, E., Kondo, F., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Early treatment with cyclosporin A ameliorates the reduction of muscarinic acetylcholine receptors in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurochem. Res.*, 24: 9-13, 1999.
- ③ Gómez-Vargas, M., Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Iwata, E. and Ogawa, N.: Nitric oxide modulated muscarinic acetylcholine receptor binding in the cerebral cortex of gerbils. *Neurochem. Res.*, 24: 629-635, 1999.
- ④ Kondo, Y., Nakanishi, T., Takigawa, M. and Ogawa, N.: Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor in the rat central nervous system. *Brain Res.*, 834: 146-151, 1999.
- ⑤ Miyazaki, I., Iwata-Ichikawa, E., Asanuma, M., Iida, M. and Ogawa, N.: Bifemelane hydrochloride protects against cytotoxicity of hydrogen peroxide on cultured rat neuroblastoma cell line. *Neurochem. Res.*, 24: 857-860, 1999.
- ⑥ Mogi, M., Togari, A., Tanaka, K., Ogawa, N., Ichinose, H. and Nagatsu, T.: Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF- α induction. *Neurosci. Lett.*, 268: 101-104, 1999.
- ⑦ Iida, M., Miyazaki, I., Tanaka, K., Kabuto, H., Iwata-Ichikawa, E. and Ogawa, N.: Dopamine D2 receptor-mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, a dopamine agonist. *Brain Res.*, 838: 51-59, 1999.
- ⑧ Kabuto, H., Yokoi, I., Iwata-Ichikawa, E. and Ogawa, N.: EPC-K1, a hydroxyl radical scavenger, prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depletion in the mouse striatum but up-regulation of catalase activity. *Neurochem. Res.*, 24: 1543-1548, 1999.
- ⑨ Sogawa, C.A., Miyazaki, I., Sogawa, N., Asanuma, M., Ogawa, N. and Furuta, H.: Antioxidants protect against dopamine-induced metallothionein-III (GIF) mRNA expression in mouse glial cell line (VR-2g). *Brain Res.*, 853: 310-316, 2000.

- ⑩ Kondo, F., Kondo, Y., Makino, H.* and Ogawa N.: Delayed neuronal death in hippocampal CA1 pyramidal neurons after forebrain ischemia in hyperglycemic gerbils: amelioration by indomethacin. Brain Res., 853: 93-98, 2000.

2. 学会発表

- ① Ogawa, N., Miyazaki, I., Tanaka, K., Iida, M. and Asanuma, M.: Dopamine D2 receptor mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, XIII International Congress on Parkinson's Disease, 1999.
- ② 十川千春, 十川紀夫, 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄, 古田裕昭: マウスグリア細胞株 (VR-2g) におけるドーパミンにより誘導されるメタロチオネイン-III (GIF) mRNA の発現制御機構, 第 72 回日本薬理学会年会, 1999.
- ③ 田中健一, 和田尚子, 堀 耕治, 野村正彦, 小川紀雄: 脳血流慢性低灌流ラットにおける免疫抑制剤の学習障害改善効果, 第 72 回日本薬理学会年会, 1999.
- ④ 小川紀雄, 浅沼幹人, 近藤文雄: 大脳基底核部におけるメタロチオネイン(MT)-III mRNA の発現: パーキンソニズムにおける変化と levodopa 投与の影響, 第 40 回日本神経学会, 1999.
- ⑤ 田中健一, 野村正彦, 小川紀雄: 慢性低灌流ラットの学習障害機序に関する行動薬理学的解析, 第 22 回日本神経科学大会, 1999.
- ⑥ 田中健一, 宮崎育子, 藤田尚子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 6-OHDA 投与後の脳内酸化ストレス消去系の経時変化, 第 29 回日本神経精神薬理学会年会, 1999.
- ⑦ 小川紀雄, 田中健一, 宮崎育子, 浅沼幹人, 飯田基之: D2 レセプターを介するドーパミンアゴニスト ropinirole の抗酸化作用ならびに神経保護効果, 第 29 回日本神経精神薬理学会年会, 1999.
- ⑧ 宮崎育子, 浅沼幹人, 十川千春, 田中健一, 東 洋一郎, 小川紀雄: 加齢による脳内 metallothionein-III mRNA 発現の変化, 第 42 回日本神経化学会, 1999.
- ⑨ 近藤文雄, 小川紀雄: 糖尿病ラットにおける一過性前脳虚血後の大脳皮質の進行性萎縮, 第 42 回日本神経化学会, 1999.
- ⑩ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 十川千春, 田中健一, 小川紀雄: ドパミン神経変性および加齢に伴う脳内 metallothionein-III mRNA 発現の変化, 第 2 回メタロチオネイン研究会, 1999.

研究協力者

浅沼幹人 (岡山大学医学部神経情報学部門 助手)
宮崎育子 (岡山大学医学部神経情報学部門)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

金属イオンによる細胞傷害の発現機構に関する検討

分担研究者 浅沼 幹人

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設神経情報学部門 助手

研究要旨

金属イオンによるフリーラジカル生成、脳脂質過酸化、タンパク質酸化さらに培養細胞における細胞傷害性について検討した。鉄イオンでは水酸化ラジカル(HO \cdot)生成と脳組織ホモジネートにおける過酸化脂質ならびに carbonyl 化酸化修飾タンパク質(OMP)の間に強い相関がみられたが、銅イオンでは過酸化脂質や OMP の増加は認められなかった。これは、銅の強い HO \cdot 生成による細胞障害性がセルロプラスミンなどの生体内分子により阻止されているためだと考えられる。また、アルミニウムは比較的少量の鉄イオン存在下では HO \cdot 生成、脳脂質過酸化および神経細胞死を著明に増強すること、またドーパミンがアルミニウムとの共存下で細胞障害性に作用することを明らかにした。これはアルミニウムが内在性の鉄イオンやドーパミンなどと作用し合って細胞障害性に作用し得ることを示している。さらに、金属イオン単独の培養神経細胞への傷害性は亜鉛、銅ついで鉄の順で強いことを明らかにした。

A. 研究目的

近年、活性酸素種やフリーラジカルは様々な外的・内的な傷害因子の蓄積により老化がもたらされるとする生体分子傷害説の主要な因子と考えられている。そのなかでも水酸化ラジカル(HO \cdot)は細胞膜の脂質過酸化、酵素の失活、核酸分解、タンパク質変性などを惹起することから、最も傷害性の高いフリーラジカルであると考えられている。一方、生体内微量金属は様々な代謝過程に関与しているが、フリーラジカルの生成過程にも関係しており、活性酸素と結びつくと生体傷害を招く原因物質となりうる。中枢神経系においても各種神経変性疾患では、蓄積した鉄やその他の金属イオンが自動酸化などの過酸化傷害を引き起こすと想定されている。このような金属イオンによる細胞傷害が、単に金属イオン自体の作用に基づくとは考えにくく、何らかの生体

成分と反応するかあるいは複合化合物を形成することで修飾を受けていると考えられる。

われわれは神経伝達物質のドーパミン(DA)をはじめとする DA 系化合物と活性酸素種の間関係を研究し、DA 系化合物と金属イオンの間わりが傷害を惹起する可能性について提唱してきた。一昨年度、河野らはフェントン反応を触媒する Fe(II)よりも Fe(III)の方が緩徐ではあるもののより多くの HO \cdot を発生すること、さらに鉄イオン単独、あるいは鉄イオンと過酸化水素(H₂O₂)による HO \cdot 生成が、DA、L-DOPA 添加により抑制されることを明らかにした。また、昨年度われわれは銅イオン(Cu(II))とドーパミン系化合物と H₂O₂ 添加の HO \cdot 生成ならびに脳脂質過酸化への影響について検討し、銅イオンは Fenton 様反応を介して鉄イオンよりも 10 倍以上強い HO \cdot 生成能を有すること、さらに銅イオンによる HO \cdot 生成と脳

脂質過酸化が DA, L-DOPA 添加により著明に抑制されることを明らかにした。

金属イオンによる細胞傷害におけるフリーラジカル生成と脳脂質過酸化およびタンパク質酸化の相関を明らかにするために、本年度は鉄、銅イオンによる HO \cdot 生成と、脳組織ホモジネートにおける過酸化脂質ならびに carbonyl 化酸化修飾タンパク質(OMP)の経時的変化について検討した。

外来性の金属であるアルミニウムのアルツハイマー病発症への関与が注目された時期があったが、今なお賛否両論意見が分かれている。このことは、ある特殊な条件下では、アルミニウムがアルツハイマー病をはじめとする様々な脳障害に関与してくる可能性を想定させるものである。一昨年度小川らはアルミニウムが脳内の中隔野や視床下部に特異的に高濃度存在することを報告した。また、河野らはアルミニウムは H₂O₂ 存在下ではゆっくりではあるが持続的な HO \cdot 生成発生能を持っていることを明らかにした。したがって、外来性金属であるアルミニウムが他の内在性金属イオンと作用し合って傷害的に働きうる可能性も想定される。そこで本年度われわれは H₂O₂ 非存在下での鉄イオンによる HO \cdot 生成、脳脂質過酸化および神経細胞死に対するアルミニウム添加の影響について検討し、さらに DA とアルミニウムの共存下での培養神経細胞の生存率の変化についても検討した。

B. 研究方法

1. 鉄、銅ならびにアルミニウムイオンによる HO \cdot 生成

最終濃度 25 μ M の FeCl₂, FeCl₃ あるいは CuCl₂ とフリーラジカル捕捉剤 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO; 最終濃度 222 mM) を混合し、37 $^{\circ}$ C で 0-30 分間インキュベートし、電子スピン共鳴装置(ESR; 日本電子製)により HO \cdot のスピンアダクト(DMPO-HO \cdot)を検出した。スピンアダクトの強度は Mn 標準アダクトに対する相対比として算出した。金

属に対する溶媒は 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)を用いた。

アルミニウムと鉄イオンの共存下での HO \cdot 生成については、25 μ M FeCl₂ あるいは FeCl₃ と 0-125 μ M AlCl₃ を混和し、40 秒後に DMPO-HO \cdot を測定した。

2. 鉄、銅ならびにアルミニウムイオンによる脳ホモジネートの脂質過酸化

雄性 SD ラットの前脳のホモジネートを過酸化脂質ならびに OMP 測定用の試料とした。ラットを pentobarbital 深麻酔下(70 mg/kg, i.p.)に左心室より冷生理食塩水で灌流し、脳を摘出し、前脳組織を 20 vol.の 50 mM Tris-HCl buffer でホモジナイズした。この前脳ホモジネートに、25 μ M FeCl₂, FeCl₃, CuCl₂ あるいは 0.1 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)を混合し、37 $^{\circ}$ C で 0-80 分間インキュベートした。これに TBA reagent (0.375% 2-thiobarbiturate, 15% TCA, 0.25N HCl, 0.1 mM EDTA \cdot Na)を加え沸騰水中に 15 分間置き、氷冷の後 3000 rpm, 10 分間遠沈し、上清の吸光度(535 nm)を測定した。段階希釈した malondialdehyde を標準として用い、その検量線から過酸化脂質量を thiobarbiturate reacting substance (TBARS)として算出した。

アルミニウムと鉄イオンの共存下での過酸化脂質量については、20 vol.の前脳ホモジネートと最終濃度 5 μ M の FeCl₂ あるいは FeCl₃ と 0-25 μ M AlCl₃ を 37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートし TBARS 量を測定した。

3. 鉄、銅イオンによるタンパク質 carbonyl 化の経時的変化

OMP 量は carbonyl 化試薬である DNPH を用いて定量した。前述の前脳ホモジネートの遠沈上清(タンパク量 0.6 mg)と、100 μ M FeCl₂, FeCl₃ あるいは 250 μ M CuCl₂ を 37 $^{\circ}$ C で 0-80 分間インキュベートし、等量の 10 mM DNPH を加えさらに室温で 30 分間インキュベートした後に、氷温で 30% TCA によりタンパクを沈殿させた。これを ethanol: ethyl acetate (1:1)での沈殿、超音波処理を繰り返し、6 M

guanidine で再懸濁し、370 nm, 280 nm におけるその吸光度をそれぞれ OMP, 総タンパク量として算出した。

4. 各種金属イオンの培養神経細胞の生存率への影響

ラット DA 系神経細胞 B65 を 10% ウシ胎児血清加ダルベッコ変法イーグル培地を用い $1.4 \times 10^4 / \text{cm}^2$ で 96well プレートへ播き、1 日後に $10 \mu\text{M}$ - 3mM FeCl_2 , FeCl_3 , CuCl_2 , ZnCl_2 および AlCl_3 を添加し、さらに 24 時間後に生細胞数を WST-1 を用いた定量法で計測した。また、 FeCl_2 ($500 \mu\text{M}$), FeCl_3 ($500 \mu\text{M}$), CuCl_2 ($10 \mu\text{M}$) と同時に $500 \mu\text{M}$ AlCl_3 あるいは $300 \mu\text{M}$ DA を添加した場合の 24 時間後の生存率についても検討した。

C. 研究結果

1. 鉄, 銅イオンによる HO・生成, 脳ホモジネートの脂質過酸化, タンパク carbonyl 化の相関

Fe(III) は Fe(II) よりも緩徐ではあるがより多くの HO・を生成していた。 Cu(II) は急速で著明な HO・生成を惹起し、これは Fe(II) , Fe(III) に比べて 10, 7 倍以上高かった。これらはいずれも本研究班の昨年度の成績を再現するものであった。

脳ホモジネートの自動酸化による脂質過酸化は、 Fe(II) , Fe(III) の添加により経時的に著明に亢進したが、 Cu(II) 添加では有意な増加はみられなかった。また、過酸化脂質と同様に、タンパク carbonyl 化も Fe(II) , Fe(III) 添加により著しく亢進したが、 Cu(II) 添加では軽微な増加にとどまっていた。これらの金属イオン添加による HO・生成と脳ホモジネートの過酸化脂質 (TBARS 量), carbonyl 化酸化修飾タンパク質 (OMP 量) の関係を図 1 に示した。鉄イオン Fe(II) , Fe(III) では HO・生成と TBARS ならびに OMP の間に強い相関がみられたが、銅イオンでは相関が認められなかった。

銅結合タンパクであるセルロプラスミン (2.5U/ml) を銅イオンによる HO・生成系に加

えると HO・生成は有意に抑制された。

2. 鉄イオンによる HO・生成, 脳ホモジネートの脂質過酸化および神経細胞死に対するアルミニウムイオンの影響

アルミニウムイオンと鉄イオンの共存下での HO・生成と脳組織ホモジネートの脂質過酸化について検討した (図 2)。 H_2O_2 非存在下では、 Al(III) 単独は明かな HO・生成を示さず、TBARS 量をむしろ軽度減少させた。しかし、比較的少量の Fe(II) ($25 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$) が存在す

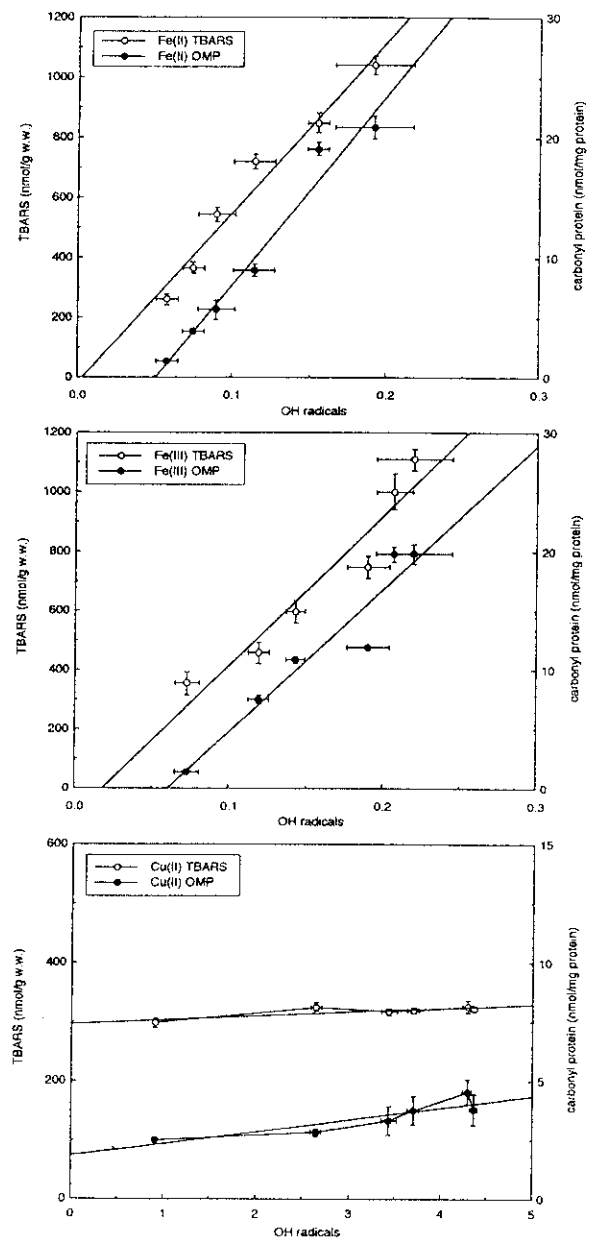


図 1 金属イオン Fe(II) , Fe(III) , Cu(II) 添加による HO・生成と脳ホモジネートの過酸化脂質 (TBARS 量), carbonyl 化酸化修飾タンパク (OMP 量) の関係

ると, Al(III)は Fe(II)による HO \cdot 生成と脂質過酸化を濃度依存的に有意に増加させた(図 2).

また, B65 細胞の生存率についても検討を加えた. Al(III)は単独では高濃度(500 μ M)でも細胞生存率に影響を与えなかったが, 鉄イオンと同時に添加すると, Fe(II), Fe(III) (500 μ M)による細胞死を著明に増悪させた. DA (300 μ M)は Fe(II), Fe(III) (500 μ M)による細胞死を明らかに抑制した. これに対して, 培養細胞の生存率に影響しない程度の濃度の DA (300 μ M)と Al(III) (500 μ M)が共存すると著明な細胞死が惹起された.

3. 各種金属イオンの培養神経細胞の生存率への影響

金属イオン単独を B65 細胞に添加した場合の細胞生存率の変化についても検討したところ, Zn(II)において著明な濃度依存的な細胞死が認められ, IC₅₀値は約 100 μ Mであった. Cu(II), Fe(II), Fe(III)では 300 μ M-3 mM の高濃度において生存率の低下が認められた. Al(III)単独では 3 mM までのいずれの濃度においても B65 細胞の生存率に影響しなかった.

D. 考察

一般に, HO \cdot は細胞膜の脂質過酸化, 酵素

の失活, 核酸分解, タンパク質変性などを惹起することで, その強い細胞傷害性を発揮すると考えられている. 本検討では金属イオンによる細胞傷害において HO \cdot 生成と脳脂質過酸化およびタンパク質酸化がどのように関連しているかについて検討した. 鉄イオンに関しては, HO \cdot 生成と脳組織ホモジネートにおける脂質過酸化ならびにタンパク質 carbonyl 化の間に強い相関が認められることを明らかにした. したがって, 従来考えられていたとおり, 鉄イオンは Fenton 様反応により HO \cdot を生成し, これにより脂質過酸化ならびにタンパク質酸化などの反応が引き起こされ, 細胞死を惹起すると考えられる. これに対して, 銅イオンでは著明な HO \cdot 生成はみとめられるものの, 過酸化脂質や OMP の増加は認められなかった. この銅イオンによる HO \cdot 生成はセルロプラスミンにより抑制された. また, 昨年度われわれは銅イオンによる HO \cdot 生成と脳脂質過酸化が DA, L-DOPA 添加により著明に抑制されることを明らかにした. これらのことから, 銅イオンは強い HO \cdot 生成能を有するものの, 生体内ではセルロプラスミン, アルブミン, DA など様々な生体内の分子によってその HO \cdot 生成能は阻止されて通常の状態では

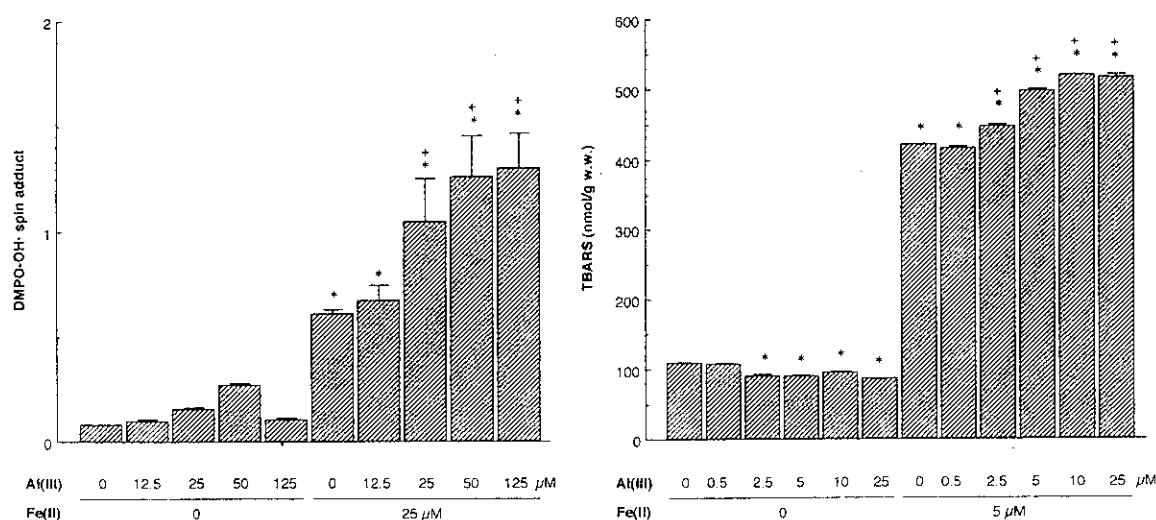


図 2 Al(III)とFe(II)の共存下でのOH \cdot 生成 (左) と脳ホモジネートの脂質過酸化(TBARS量) (右).
*p<0.01 compared with metal free control, +p<0.01 compared with Al(III) free control with Fe(II)

組織傷害性に働きたいものと考えられた。

外来性の金属であるアルミニウムが神経毒性を発揮することは透析患者におけるアルミニウム脳症でも明らかだが、アルツハイマー病発症への関与についてはいまだ異論の多いところである。アルミニウムが脳内の中隔野や視床下部に特異的に高濃度存在すること、また、アルミニウムがH₂O₂存在下で緩徐で持続的なHO・生成発生能を有することなどが昨年までの本研究班で明らかにされている。これらの知見は、ある特殊な条件下では、外来性金属であるアルミニウムが他の内在性物質と作用し合って様々な脳障害に関与し得る可能性を想定させるものである。アルミニウムイオンと鉄イオンの共存下におけるHO・生成、脳組織ホモジネートにおける脂質過酸化および神経細胞死について検討したところ、アルミニウム自体はH₂O₂非存在下ではHO・生成、脂質過酸化および神経細胞死を惹起しないが、比較的少量の鉄イオンとの共存下ではHO・生成、脂質過酸化および神経細胞死を著明に増強させることが明らかとなった。さらに興味深いことに、DAがアルミニウムと共存すると著明な細胞死が惹起された。これらの結果は、アルミニウムが内在性の鉄イオンやDAなどと作用し合って細胞障害性に作用し得ることを示している。アルミニウムの鉄イオンやDAとの作用機序を明らかにするためにはさらなる検討が必要である。昨年度岩井は鉄代謝の制御因子であるIRP2のRNA結合能がアルミニウムの存在により著しく増加することを明らかにし、これにより遊離鉄が増加し、鉄の傷害性が増強される可能性を示した。したがって、アルミニウムは鉄イオン自体と作用し合いHO・生成や脂質過酸化を増強するだけでなくIRP2に作用することによって鉄による細胞傷害性を増強していると考えられる。

一方、DAは鉄、銅イオンによる神経細胞死に対しては保護的に作用した。これは、一昨年、昨年度に河野らおよびわれわれが報告し

たDA添加が鉄、銅イオンによるHO・生成と脂質過酸化を著明に抑制することと合致している。これらのDAによる抑制効果は、DAが鉄、銅イオンと配位したためと考えられる。

培養神経細胞に対する金属イオン単独の細胞毒性について検討し、亜鉛イオンが銅、鉄イオンに比べはるかに強い細胞毒性を発揮することが明らかにした。本年度われわれは亜鉛代謝調節タンパク質であるメタロチオネイン-IIIが加齢に伴い脳内で増加していることを明らかにしたが、この亜鉛の強い神経細胞毒性とその防御機構にメタロチオネイン-IIIが密接に関与している可能性も考えられる。

E. 結論

鉄イオンによるHO・生成と脂質過酸化ならびにタンパク質酸化の間には強い相関がみられたが、銅では相関はみられなかった。試験管内での銅の強いHO・生成と、それによる細胞障害性は、in vivoでは生体内高分子により阻止されていると考えられる。アルミニウムが比較的少量の鉄存在下でHO・生成、脂質過酸化および神経細胞死を著明に増強すること、またDAがアルミニウムとの共存下で細胞障害性に作用することを明らかにした。このように、アルミニウムは内在性の鉄やDAと作用し合って細胞障害性に作用し得ることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Miyazaki, I., Iwata-Ichikawa, E., Asanuma, M., Iida, M. and Ogawa, N.: Bifemelane hydrochloride protects against cytotoxicity of hydrogen peroxide on cultured rat neuroblastoma cell line. *Neurochem. Res.*, 24: 857-860, 1999.
- ② Gómez-Vargas, M., Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Iwata, E. and Ogawa, N.: Nitric oxide modulated muscarinic acetylcholine receptor binding in