

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
総括研究報告書

アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究

主任研究者 武田雅俊

大阪大学大学院医学系研究科・神経機能医学・精神医学・教授

アルツハイマー病の環境危険因子であるアルミニウムの神経毒性はよく知られているが、その毒性機序については未だ解明されていない。本研究では、アルミニウムのヒト体内における動態と脳内移行の調節機構を明らかにし、さらに神経細胞内のアルミニウムの作用機序を分子細胞生物学的に明らかにしてアルツハイマー病におけるアルミニウムの毒性機序を解明するための研究を方向づけた。アルミニウムが軸索輸送障害による神経細胞のアポトーシスをもたらし、アルツハイマー病の原因遺伝子である変異プレセニリン1による中枢神経発達障害と脆弱性を増強し、小胞体ストレス応答を障害をすることが示唆された。また、実際のアルミニウム吸収量は、食品中のアルミニウム含有量あるいはアルミニウムの総摂取量とは相関せず、アルミニウムの化学種と結合状態により決定されることが示された。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、プレセニリン1、軸索輸送障害、ゼーマン補正原子吸光分析、小胞体ストレス応答

研究組織

主任研究者 武田雅俊

（大阪大学精神医学・教授）

分担研究者 柏木雄次郎

（大阪大学精神医学・助手）

分担研究者 飯塚舜介

（鳥取大学医療システム学・助教授）

分担研究者 遠山正彌

（大阪大学機能形態学・教授）

A. 研究目的

アルツハイマー病は神経変性による代表的痴呆疾患である。アルミニウムとアルツハイマー病発症との因果関係を示唆する研究報告は、実験的神経原線維変化の発見（1965年）、アルツハイマー病脳組織でアルミニウム濃度が高いことの指摘（1

973年)、慢性腎不全の人工透析治療において、痴呆症状を呈する患者(透析脳症)が頻発したが、透析液中のアルミニウム濃度が高いこと、さらに腎不全患者が高リン血症予防目的で水酸化アルミニウムゲルを内服していることにより、高アルミニウム血症(1.5  $\mu$ M以上)となっており、痴呆との因果関係の示唆(1976年)、水道水中のアルミニウム濃度とアルツハイマー病の因果関係が、疫学的調査結果からの示唆(1989年)などがある。

しかしながら、その毒性機序については未だ解明されていない。本研究では、アルミニウムのヒト体内における動態と脳内移行の調節機構を明らかにし、さらに神経細胞内のアルミニウムの作用機序を分子細胞生物学的に明らかにすることを目的としている。

## B. 研究方法

本研究では、アルミニウムとアルツハイマー病発症との因果関係について、臨床研究としてはアルミニウムの体内動態を明らかにし、基礎研究としては神経細胞内のアルミニウムの作用機序を分子細胞生物学的に明らかにして、これらの臨床研究と基礎研究が有機的に統合されるような班員構成とし、基礎・臨床の研究成果を総合して新たな知見を得るべ

くつとめた。

柏木は、初代培養神経細胞の培地中にアルミニウム塩を添加し、軸索細胞骨格蛋白の分布異常、軸索輸送障害、神経細胞死について検討した。武田は、アルツハイマー病の原因遺伝子変異導入動物の妊娠母体の腹腔内にアルミニウムを投与し、軸索細胞骨格蛋白の分布異常、大脳皮質形成異常、神経機能発達障害、遺伝子変異による脆弱性などに対するアルミニウムの影響について検討した。飯塚は、アルミニウムの1日摂取量及び尿中排泄量の測定、とくにアルミニウム含有量の多いヒジキ摂取後のアルミニウムの1日尿中排泄量とアルミニウム含有解熱鎮痛剤服用後の1日尿排泄量の測定を行った。遠山は、ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞での小胞体ストレス応答に与えるアルミニウムの影響を、細胞死とストレス応答蛋白のmRNA発現量により検討した。

## C. 研究結果

### (1) 遺伝子変異動物を用いたアルミニウム神経毒性の研究(武田雅俊)

生後7日目のラットの大脳各部位において、対照群ではneurofilament陽性の線維構造の形成が認められるのに対し、アルミニウム投与群ではそのような構造の形成はほとんど認められなかった。また生後16日目の

所見では、対照群でさらに線維構造が増加していたが、アルミニウム投与群では線維構造の形成が著しく遅延していた。また、神経機能発達検査を行ったところ、アルミニウム投与群では対照群に比べ中枢神経と筋の統合運動発達の遅延が認められた。

アルツハイマー病の原因遺伝子である変異プレセニリン1ノックイン・マウスの脳切片において、wild type と heterozygous では neurofilament 陽性の線維状構造物が認められたのに対して、homozygous では明らかな線維構造は認められず、大脳皮質形成過程の遅延を認めた。さらに、この変異プレセニリン1ノックイン・マウスの胎生 9 日目にアルミニウムを母体の腹腔内に投与すると、heterozygous でも、明らかな線維構造が認められなくなった。

また、変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの heterozygous 同士を交配させて出生するマウスの genotype を検討したところ、アルミニウムを母体の腹腔内に投与することで、heterozygous と homozygous の比率が減少し、特に homozygous の比率が著しく減少した。

#### (2)培養細胞を用いたアルミニウム毒性の研究 (柏木雄次郎)

250  $\mu$ M のアルミニウム濃度で死亡率が対照群と有為な差がない培

養 4 日目で、細胞骨格及び軸索輸送に変化がみられた。つまり、ニューロフィラメントが対照群で軸索遠位部まで分布が認められるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。これに対してアクチンでは、アルミニウム・パルス投与群でも軸索遠位部まで分布が認められた。チューブリンもアクチンと同様に、アルミニウム・パルス投与群でも軸索遠位部まで分布が認められた。モーター分子であるキネシンは、対照群で軸索遠位部まで分布がみられるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。膜蛋白質のシナプトフィジンと GAP43 でも、対照群で軸索遠位部まで分布がみられるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。軸索形成以前の培養開始 6 時間目にアルミニウムをパルス投与したところ、培養 4 日目には軸索輸送障害がみられ、その後に遅れて神経細胞死が生じていた。この神経細胞死はアポトーシスによるものであった。軸索輸送障害とアポトーシスの関連について、NGF の逆行性軸索輸送障害の関与が指摘されているため、逆行性軸索輸送へのアルミニウムの影響について検討したところ、対照群では、成長円錐から細胞体に至る

まで軸索上に NGF の分布を認めたのに対して、アルミニウム投与群では内在性 NGF が核周囲に分布したものの、軸索上には NGF が分布せず逆行性軸索輸送障害を認めた。

### (3)アルミニウムの吸収・代謝・排泄機構のシステム科学研究 (飯塚舜介)

日本人の平均的食生活におけるアルミニウム 1 日摂取量を推定したところ 4.2~5.9 mg であった。また、尿中アルミニウム 1 日排泄量は 12 から 24  $\mu$ g であった。アルミニウム含有量の多い食品の一つである海草のヒジキを摂取し、尿中排泄量を測定したところ、ヒジキ摂取群と対照群でアルミニウム排泄量に差は無かった。また、市販されているアルミニウム含有鎮痛剤服用後の尿中アルミニウム排泄量は対照群に比べて有意に増加した。吸収率は極めて低いが、アルミニウムが吸収されていることが分かった。

### (4)アルミニウムによる小胞体・ミトコンドリアに対するストレス障害機能の研究 (遠山正彌)

500  $\mu$ M までの濃度ではアルミニウム・マルトール混合液を培養液中に添加しても、LDH 活性を上昇させるような細胞死効果はみとめられなかった。トニカマイシンを 3  $\mu$ g/ml の濃度で添加すると SK-N-SH 細胞は添加後約 30 時間ごろから死に始め、

40 時間後には大多数の細胞が死滅した。あらかじめアルミニウム・マルトール混合液をトニカマイシン刺激前に 24 時間に渡って処理し、その後トニカマイシン刺激を同様に行うと、細胞死の進行を明らかに促進した。

また、アルミニウム・マルトール混合液を培養液中に添加し、6 時間後に RNA を回収してストレス応答蛋白である GRP78 の mRNA の発現変化をノーザンブロッティングにより検討したところ、各濃度のアルミニウムとも GRP78mRNA 発現に対してなんら影響は与えなかった。すなわち、アルミニウムは単独では GRP78 の発現誘導には変化を与えないことが明らかとなった。一方、アルミニウム・マルトール混合液添加 24 時間目にトニカマイシン刺激を行うと、GRP78mRNA の発現誘導はアルミニウム・マルトール混合液を処理しなかったものより減弱し、3分の1程度の誘導にすぎなかった。つまり、小胞体におけるストレス応答の障害を認めた。

### D. 考察

アルミニウム投与により、大脳各部位で軸索細胞骨格蛋白質のうち neurofilament が障害され、vimentin が残存して軸索形態維持を代償していた。つまり、アルミニウムが軸索細胞骨格蛋白質の形成に障害を与えて

いることが明かとなった。

神経機能発達検査を行ったところ、アルミニウム投与群では、新生児期早期において小脳および脳幹を含む前庭系と筋との統合運動発達の障害を認めた。

変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの変異が homozygous な場合、大脳皮質形成過程に遅延を認めた。プレセニリン 1 は、中胚葉系の発生分化に関与する Notch との相同部分を有している。そのノックアウト・マウスは中胚葉系細胞の分化異常を示し、胎生期に死亡するという報告がある。変異が homozygous に存在するとノックアウト・マウスほどではないが、中枢神経系細胞の発生分化に障害を与えると考えられた。

この変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスにアルミニウムを投与すると、wild type や heterozygous でも大脳皮質形成過程に障害を認めたことから、アルミニウムは変異プレセニリン 1 による脆弱性を増強させる事が示唆された。

また同様に、このノックイン・マウスの heterozygous 同士を交配させて出生するマウスの genotype を検討したところ、アルミニウム投与により genotype は、heterozygous と homozygous の比率が減少し、特に homozygous の比率が著しく減少

した。これは、プレセニリン 1 遺伝子の欠損または変異により胎生期に致死的变化がもたらされることが知られているが、アルミニウムの毒性により胎生期の死亡率をさらに増悪させたと考えられた。

軸索形成初期のアルミニウム・パルス曝露により、軸索の3種の細胞骨格蛋白のうち、スローコンポーネント a に属するニューロフィラメントのみが障害を認め、スローコンポーネント b に属するチューブリン、アクチンは障害を認めなかった。これは、スローコンポーネント b は可溶性のダイナミック型分子であり、神経損傷後、反応性に増加し、障害に対して抵抗性であるという報告に沿うものと考えられ、一方、スローコンポーネント a の安定重合型分子はアルミニウムなどによる障害に対して抵抗性に乏しい事を示唆していた。軸索輸送蛋白では、ファースト・コンポーネントに属するキネシン、シナプトフィジン、GAP43 がアルミニウムの影響を受けていた。また、このアルミニウム投与による軸索輸送障害に続いて、遅発性の神経細胞死が生じていた。この細胞死は、アポトーシスによるものであった。軸索輸送障害とアポトーシスの関連について、アルツハイマー病では NGF の逆行性軸索輸送障害の関与が指摘され

ているが、今回の結果でも、アルミニウム投与群により逆行性軸索輸送障害が生じていることが示された。

アルミニウム毒性によるニューロフィラメントの分布異常と軸索輸送障害およびその結果生じるアポトーシスがアルツハイマー病の病態に関与している可能性が示唆された。

日常の食生活におけるアルミニウム摂取量を検討した結果、日本人も外国の報告と同程度のアルミニウムを摂取をしていることがわかった。また、食物中のアルミニウムは腸管から吸収され尿中に排泄されていることが確かめられた。ヒジキから摂取されるアルミニウムの尿中排泄量は対照群と全く変らなかった。これは、アルミニウムが食物繊維と結合し吸収されにくいためと考えられた。また、鎮痛剤に含まれるアルミニウムは吸収されやすいことが分った。見かけの吸収率は制酸剤と比べて高かった。食物からのアルミニウムの摂取はある程度は避けられないが、摂食に伴うアルミニウムは人類が適応してきた環境条件の範囲内のもので、健康に有害な作用をすることは考えられない。これに対し、医薬品で使用するアルミニウム化合物については吸収率は非常に小さいが、人の健康状態や服用量によっては注意が必要かもしれない。アルミニウムはそ

の存在状態によって著しく吸収率が異なることがわかった。吸収量を推定する上で、食品中のアルミニウム含有量あるいはアルミニウムの総摂取量にはあまり意味がない。共存物質の存在が吸収に大きく影響があると推察された。どのような化学種で結合状態のものをいくら摂取するかが吸収量を決定すると考えられる。

我々は、プレセニン 1 変異体が小胞体の正常なストレス応答機構を障害し、分子シャペロン GRP78 の発現誘導を抑制することを明らかにしてきた。今回の研究結果から、アルミニウムも PS1 変異体と同様に GRP78 誘導機構に障害を与える可能性が強く示唆された。プレセニン 1 変異体による GRP78 誘導機構の障害は小胞体の膜上に存在するストレスセンサー Ire1 のリン酸化抑制に基づくことがすでに明らかにされている。本研究ではストレスセンサーに対するアルミニウムの効果については未解決であるが、アルミニウムがリン酸基に強く結合することから、Ire1 のリン酸化障害を起こす可能性は強い。今後、アルミニウムによる GRP78 誘導障害の分子メカニズムに関して詳細に解析していく必要がある。

#### E. 結論

本年度の研究により以下のことを明らかにした。

1) アルミニウムが軸索細胞骨格蛋白の形成に障害を与えている。神経機能発達において、アルミニウム投与群で発達障害を認めた。変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの変異が homozygous な場合、大脳皮質形成過程に遅延を認めた。さらに、アルミニウムを投与すると、wild type や heterozygous でも大脳皮質形成過程に障害を認めた。変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの heterozygous 同士を交配させて出生するマウスの genotype を検討したところ、アルミニウム投与により genotype は、heterozygous と homozygous の比率が減少し、特に homozygous の比率が著しく減少した。

2) 神経細胞の培養初期にアルミニウムをパルス曝露することにより、ニューロフィラメントの分布異常と軸索輸送障害が生じ、次いで神経細胞がアポトーシスに至る現象がみられた。

3) ヒジキから摂取されるアルミニウムの尿中排泄量は対照群と全く変わらなかった。鎮痛剤に含まれるアルミニウムは吸収されやすいことが分かった。吸収量を推定する上で、食品中のアルミニウム含有量あるいはアルミニウムの総摂取量にはあまり意味がない。アルミニウムの化学種と結

合状態が吸収量を決定すると考えられる。

4) アルミニウムが小胞体ストレス応答機構に障害を与える可能性が示された。また、アルミニウムによる神経細胞死はこのストレス応答機構の抑制に基づいて起こる可能性がある。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1) Nakamura Y, Takeda M, Aimoto S, et al : Acceleration of bovine neurofilament L assembly by deprivation of acidic tail domain. Eur. J. Biochem. 212 : 565-571, 1993

2) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Miyamae Y, Shinosaki K, Nishikawa T, Hattori H, Kudo T, Takeda M : Abnormal distribution of neurofilament L in neurons with Alzheimer's disease. Neurosci. Lett. 225 : 201-204, 1997

3) Hashimoto R, Nakamura Y, Tsujio I, Tanimukai H, Takeda M : Quantitative analysis of neurofilament proteins in Alzheimer brain by enzyme linked immunosorbent assay system. Psychiatry Clin. Neurosci. 53 : 587-591, 1999

4) Nakano Y, Kondo G, Kudo T,

- Imaizumi K, Kato M, Miyazaki J, Toyama M, Takeda J, Takeda M : Accumulation of murine amyloid beta 42 with a gene-dosage dependent manner in PS1 'knock-in' mice. *Eur J Neurosci* 11;1-5, 1999
- 5) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Wada Y, Sakoda S, Miyamae Y, Kudo T, Takeda M : Casein kinase 2 is responsible for phosphorylation of NF-L at Ser 473. *FEBS Lett* 455 ; 83-86, 1999
- 6) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Aimoto S, Fukusho E, Matsumoto N, Kudo T, Takeda M : Major phosphorylation site (Ser<sup>55</sup>) of neurofilament L by cyclic AMP-dependent protein kinase in rat primary neuronal culture. *J Neurochem* 74(3) ; 949-959, 2000
- 7) Kashiwagi, Y., Nakamura, Y., Miyamae, Y., Hashimoto, R., Takeda, M. : Pulse exposure of cultured rat neurons to aluminum-maltol affected the axonal transport system. *Neurosci Lett*, 252(1): 5-8, 1998
- 8) Meshitsuka S, Inoue M : Urinary excretion of aluminum from antacid ingestion and estimation of its apparent biological half-time. *Trace Elem Elect* 15:132-135, 1998.
- 9) 松島文子, 飯塚舜介, 能勢隆之 : 茶葉及び茶浸出液中のアルミニウムおよびマンガン含有量. *日本衛生学雑誌* 48 : 864 '872, 1993.
- 10) 松島文子, 飯塚舜介, 能勢隆之 : 海草中のアルミニウム含有量と調理による影響, *日本衛生学雑誌* 51 : 763 ・ 769, 1993.
- 11) 松島文子, 飯塚舜介, 船川一彦, 能勢隆之 : 食器および調理器具からのアルミニウム, シリコンの溶出. *日本衛生学雑誌* 43:969 ・ 978, 1988.
- 12) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, Peter St George-Hyslop, Takeda M, Tohyama M : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of unfolded-protein response. *Nature Cell Biol* 1; 479-485, 1999

#### 学会発表

- 1)第4回日本神経精神医学会 (東京)  
平成11年5月12-13日  
Kashiwagi, Y., Nakamura, Y., Takeda, M.  
Pulse exposure of cultured rat



neurons to aluminum-maltol  
affected the axonal transport  
system.

脳 21, 2 (4) : 405-406, 1999

2) 第 41 回日本老年医学会 (京都)

平成 11 年 6 月 16 - 18 日

柏木雄次郎、中村 祐、武田雅俊

軸索形成初期におけるアルミニウムの  
軸索輸送への影響

日本老年医学会雑誌, 36:S132, 1999

3) 第 18 回日本痴呆学会 (熊本) 平

成 11 年 10 月 7 - 8 日

柏木雄次郎、中村 祐、武田雅俊

軸索形成初期におけるアルミニウムの  
軸索輸送への影響

Dementia Japan, 13(2):124, 1999

## 遺伝子変異動物を用いたアルミニウム神経毒性の研究

武田雅俊 大阪大学教授・大学院医学系研究科神経機能医学講座（精神医学）

**研究要旨** アルツハイマー病の環境危険因子のひとつと考えられているアルミニウムの神経毒性はよく知られているが、その毒性機序については未だ解明されていない。これまで、我々は神経細胞の初代培養系でアルミニウムによる軸索輸送障害と細胞骨格蛋白の異常を示してきたが、同様の結果がアルミニウムを妊娠母体の腹腔内に投与することで、出生仔の脳において *in vivo* 系でも再現することを認め、さらに、その神経機能発達においても遅延を認めた。さらに、変異プレセニリン1 遺伝子導入マウスにおいて、homozygous では heterozygous よりも neurofilament 陽性の線維構造に乏しく、corticogenesis の異常ないしは遅延が疑われたが、アルミニウム投与により、heterozygous や wild type においても neurofilament 陽性の線維構造の減少が認められた。変異プレセニリン1 遺伝子導入マウスの heterozygous 同士を交配させて出生した仔マウスの genotype 構成比を検討したところ、アルミニウム投与群では heterozygous と homozygous の占める比率がともに対照群より減少していた。このうち、homozygous の占める比率がより大きく減少していた。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、遺伝子変異動物、プレセニリン1

### A. 研究目的

アルツハイマー病の環境危険因子のひとつと考えられているアルミニウムの神経毒性はよく知られているが、その毒性機序については未だ解明されていない。この毒性機序を検討するために、種々の動物モデルが検討されてきた。これまで、

我々が神経細胞の初代培養系で示したアルミニウムによる軸索輸送障害と細胞骨格蛋白の異常が、アルミニウムを妊娠母体の腹腔内に投与することで、出生仔の脳において *in vivo* の系においても同様に起こり得るのかどうかを、ラットおよびアルツハイマー病の原因遺伝子変異導入

マウスを用いて検討した。

## B. 研究方法

### 1) アルミニウムの投与：

塩化アルミニウムと植物由来のアルミニウム有機リガンドあるマルツールを等モル比で混合したアルミニウム・マルツールを、neurofilament 発現以前の胎生9日目に妊娠母体の腹腔内に投与した。

なお、この胎生9日目頃には、中間径線維では主として vimentin が存在しているが、その後次第に減少して、胎生12日目より neurofilament が発現し始め、胎生14日目には vimentin が消失するという、神経細胞における中間径線維のスイッチングが生じると報告されている。

アルミニウムの投与量は、予備実験において新生児の脳切片に病理組織学的変化がみられ、かつ出産可能であったアルミニウム量、つまり母体キログラム体重当たりラットでは11mg、マウスでは18mgとした。

### 2) 免疫組織化学：

凍結切片を anti-neurofilament L (R-2-1, 1:1000)、anti-vimentin (V9, 1:250)により免疫染色し、retrosplenial granular cortex、海馬の CA3 region、dorsal lateral geniculate nuclei、external capsule、parietal cortex area 1などの各部位について、免疫組織学的検討を行った。

### 3) 神経機能発達検査：

righting reflex は、動物を仰向けに置き

たのち、直ちに指を離して、動物の四肢が接地するまでの時間を測定した。つまり、仰向けから「寝返り」をうって四つんばいになるまでの時間を測定した。これは、小脳および脳幹を含む前庭系と筋との統合運動の発達程度を検出するものであり、一般的に生後早期より観察される。

negative geotaxis は、動物を45度の傾斜板に頭を下方に向けて置き、身体を反転させて登攀(とうはん)すれば成功(強反応)とした。つまり、動物が本能的に斜面で高い方へ登ってゆく行動をみた。これは前述の righting reflex と同様に小脳および脳幹を含む前庭系と筋との統合運動の発達程度を検出するものだが、よりやや高度な機能のために、少し righting reflex より遅い時期に完成する。

### 4) 変異遺伝子導入：

遺伝子変異は、大阪で発見された OS-2 家系においてみられた、プレセニン1の exon7 にある 213 番目のイソロイシンがスレオニンに置換された変異である。

変異遺伝子導入の様式は、多数の変異遺伝子をランダムに組み込むトランスジェニック・マウスではなく、内在性の遺伝子をノックアウトし同部位に変異遺伝子を挿入するノック・イン・マウスを用いた。ポジティブ・セレクション・マーカーとして Neo 遺伝子を挿入したプレセニン1 変異遺伝子を含むコンストラクトをターゲッティング・ベクターとして、

相同組み換えを行い、Neo により相同組み換え体を選択した。この際、Neo 遺伝子によるプレセニリン 1 変異遺伝子の発現の低下を認めることがあるが、Neo 遺伝子を 2 個の loxP 配列で挟んでおいて、Cre リコンビネース発現トランスジェニック・マウスと交配させると、Cre リコンビネースの作用で loxP 配列に挟まれた Neo 遺伝子は除去されて、Neo 遺伝子によるプレセニリン 1 変異遺伝子の発現の低下を防ぐことができるようになる。実際、Neo 遺伝子がゲノム内に残ったアレルではプレセニリン 1 変異遺伝子の発現は内在性プレセニリン 1 の 40%であったが、Neo 遺伝子を除去すると内在性プレセニリン 1 とほぼ同等の発現量であった。

### C. 研究結果

ラットの retrosplenial granular cortex を neurofilament-L の抗体で免疫染色したところ、生後 7 日目の対照群においては、neurofilament 陽性の線維構造の形成が認められるのに対し、アルミニウム投与群ではそのような構造の形成はほとんど認められなかった。また生後 16 日目の所見では、対照群でさらに線維構造が増加していたが、アルミニウム投与群では線維構造の形成が著しく遅延していた。

同様のことが海馬の CA3 region や dorsal lateral geniculate nuclei、external capsule、parietal cortex area 1 などでも認

められた。

とくに external capsule において、対照群では neurofilament 陽性の線維状構造物が認められるにも関わらず、アルミニウム投与群では neurofilament の抗体に反応せず帯状の空白となる部位を認めた。同部位を vimentin の抗体で免疫染色したところ、濃く染色された。

神経機能発達検査を行ったところ、righting reflex では、生後 3 日目・7 日目ではアルミニウム投与群は対照群に比べ、反転するのに約 2 倍の時間を要した。生後 16 日目になると対照群とアルミニウム投与群の差は無くなっていた。

また、negative geotaxis でも同様に、アルミニウム投与群では新生児期早期に反転して坂道を高い方へ登るという事が十分にできる個体が少なく、多くの個体で中枢神経と筋の統合運動発達の遅延が認められた。

変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの脳切片を neurofilament の抗体を用いて免疫組織染色したところ、wild type と heterozygous では neurofilament 陽性の線維状構造物が認められたのに対して、homozygous では明らかな線維構造は認められず、大脳皮質形成過程の遅延を認めた。さらに、この変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの胎生 9 日目にアルミニウムを母体の腹腔内に投与すると、heterozygous でも、明らかな線維構造が認められなくなった。

また、変異プレセニリン1ノックイン・マウスの heterozygous 同士を交配させて出生するマウスの genotype を検討したところ、genotype の比率はアルミニウムを母体の腹腔内に投与することで、heterozygous と homozygous の比率が減少し、特に homozygous の比率が著しく減少した。

#### D. 考察

アルミニウム投与により、大脳各部位で neurofilament の線維構造が減少・消失していた。一方、external capsule などの大脳白質において、対照群では neurofilament 陽性の線維状構造物が認められるにも関わらず、アルミニウム投与群では neurofilament の抗体に反応せず帯状の空白となる部位を認めた。この部分は大脳白質の radial glial fiber の下縁に相当する。この radial glial fiber の下縁の空白部位を vimentin の抗体で免疫染色したところ、濃く染色された。これは、生後7日目で形成されているべき neurofilament の線維構造が、アルミニウム投与により neurofilament の遠位部への軸索輸送が障害されることにより、減少または消失し、逆に本来この時期には消失しているはずの vimentin が残存して軸索形態維持を代償していると考えられた。

神経機能発達検査を行ったところ、righting reflex では、生後3日目・7日目ではアルミニウム投与群は対照群に比べ、

反転するのに約2倍の時間を要した。生後16日目になると対照群とアルミニウム投与群の差は無くなっていた。righting reflex は仰向けから「寝返り」をうって四つんばいになるまでの時間であるが、これは、小脳および脳幹を含む前庭系と筋との統合運動の発達程度を示すものであり、一般的に生後早期より観察される。原始反射の一種であるため、時間の経過とともにすべての個体でほとんどかわり無く達成できてしまうので生後16日目になると対照群とアルミニウム投与群の差は無くなってしまいが、新生児期早期において小脳および脳幹を含む前庭系と筋との統合運動の発達の遅延がアルミニウム投与群に認められた。また、negative geotaxis でも同様に、アルミニウム投与群では新生児期早期に多くの個体で中枢神経と筋の統合運動発達の遅延を認めた。

今回用いた遺伝子変異は、プレセニリン1変異導入であるが、プレセニリンは、家族性アルツハイマー病家系の連鎖解析によって同定されたアルツハイマー病の原因遺伝子のひとつであり、8回膜貫通蛋白をコードしており、現在40種類以上のミスセンス変異が報告されている。このうち大阪で発見された OS-2 家系においてみられる、プレセニリン1の exon7 にある 213 番目のイソロイシンがスレオニンに置換された変異を導入した。この家系では、この遺伝子変異が強いほど、つまり wild type よりも heterozygous、

heterozygous より homozygous となるほど、自己凝集能が強く老人斑を形成しやすいアミロイド蛋白 A $\beta$ 42 が A $\beta$ 40 に比較して増加する傾向を有しているが、この変異導入ノックイン・マウスのアミロイド蛋白を調べたところ、同様の A $\beta$ 42 の増加傾向がみられた。

変異遺伝子導入の様式は、多数の変異遺伝子をランダムに組み込むトランスジェニック・マウスではなく、内在性の遺伝子をノックアウトし同部位に変異遺伝子を挿入するノックイン・マウスを用いた。過剰に遺伝子発現するトランスジェニック・マウスとは異なり、ノックイン・マウスの場合はミスセンス変異が導入されること以外は遺伝子の発現量や染色体上の位置などは内在性遺伝子と同じであるため、ミスセンス変異のみの影響をより生理的条件に近い状態で検討できる。

この変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスにおいて、アルミニウム非投与の条件下で、wild type と heterozygous では neurofilament 陽性の線維状構造物が認められたのに対して、homozygous では明らかな線維構造は認められず、大脳皮質形成過程の遅延を認めた。さらに、この変異プレセニリン 1 ノックイン・マウスの胎生 9 日目にアルミニウムを母体の腹腔内に投与すると、wild type でも、明らかな線維構造が認められなくなった。つまり、アルミニウムの有無に関わらず、プレセニリン 1 にミスセンス変異が

homozygous に存在すると大脳皮質形成過程に遅延を認めた。ここに、アルミニウム投与が加わると、さらに wild type でも大脳皮質形成過程に遅延を認めた。プレセニリン 1 は、中胚葉系の発生分化に関与する Notch との相同部分を有しており、そのノックアウト・マウスは脊椎を形成する体節を含む中胚葉系細胞の分化異常を示して胎生期に死亡することなどから、ミスセンス変異が homozygous に存在するとノックアウト・マウスほどではないが、中枢神経系細胞の発生分化に障害を与え、大脳皮質形成過程に遅延をもたらすものと考えられた。

また、このノックイン・マウスの heterozygous 同士を交配させて出生するマウスの genotype を検討したところ、genotype の比率はアルミニウムを母体の腹腔内に投与することで、heterozygous と homozygous の比率が減少し、特に homozygous の比率が著しく減少した。これは、プレセニリン 1 遺伝子の欠損または変異により胎生期に致死的变化がもたらされることが知られているが、アルミニウムの毒性により胎生期の死亡率をさらに増悪させたと考えられた。

## E. 結論

1) アルミニウム投与により、大脳各部位で neurofilament の線維構造が減少・消失し、大脳白質の radial glial fiber の下縁にビメンチンの線維構造の免疫反応性

が増強していた。これは、アルミニウムにより neurofilament の遠位部への軸索輸送が障害されて、代償的にビメンチンが残存したことによって生じたものと考えられた。

2) 神経機能発達において、アルミニウム投与群では対照群よりその発達の遅延を認めた。

3) 変異プレセニリン1遺伝子導入マウス的大脑灰白質において、homozygous では heterozygous よりも neurofilament 陽性の線維構造に乏しく、corticogenesis の異常ないしは遅延が疑われた。アルミニウム腹腔内投与により、heterozygous や wild type においても neurofilament 陽性の線維構造の減少が認められた。

4) 変異プレセニリン1遺伝子導入マウスの heterozygous 同士を交配させて出生した仔マウスの genotype 構成比を検討したところ、アルミニウム投与群では heterozygous と homozygous の占める比率がともに対照群より減少していた。このうち、homozygous の占める比率がより大きく減少していた。

## F. 研究発表

### 論文発表

1) Kashiwagi Y, Nakamura Y, Miyamae Y, Hashimoto R, Takeda M : Pulse exposure of cultured rat neurons to aluminum-maltol affected the axonal transport system. *Neurosci. Lett.* 252 : 5-8, 1998

2) Nakamura Y, Takeda M, Aimoto S, et al : Acceleration of bovine neurofilament L assembly by deprivation of acidic tail domain. *Eur. J. Biochem.* 212 : 565-571, 1993

3) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Miyamae Y, Shinosaki K, Nishikawa T, Hattori H, Kudo T, Takeda M : Abnormal distribution of neurofilament L in neurons with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 225 : 201-204, 1997

4) Hashimoto R, Nakamura Y, Tsujio I, Tanimukai H, Takeda M : Quantitative analysis of neurofilament proteins in Alzheimer brain by enzyme linked immunosorbent assay system. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 53 : 587-591, 1999

5) Nakano Y, Kondo G, Kudo T, Imaizumi K, Kato M, Miyazaki J, Toyama M, Takeda J, Takeda M : Accumulation of murine amyloid beta 42 with a gene-dosage dependent manner in PS1 'knock-in' mice. *Eur J Neurosci* 11;1-5, 1999

6) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Wada Y, Sakoda S, Miyamae Y, Kudo T, Takeda M : Casein kinase 2 is responsible for phosphorylation of NF-L at Ser 473. *FEBS Lett* 455 ; 83-86, 1999

7) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Aimoto S, Fukusho E, Matsumoto N, Kudo T, Takeda M : Major phosphorylation site (Ser<sup>55</sup>) of neurofilament L by cyclic AMP-dependent protein kinase in rat primary

neuronal culture. J Neurochem 74(3) ; 949-959, 2000

8) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, Morihara T, Yoneda T, Gomi F, Mori Y, Nakano Y, Takeda J, Tsuda T, Itoyama Y, Murayama O, Takashima A, Peter St George-Hyslop, Takeda M, Tohyama M : Presenilin-1 mutations downregulate the signalling Pathway of unfolded-protein response. Nature Cell Biol 1; 479-485, 1999



## 培養細胞を用いたアルミニウム毒性の研究

柏木雄次郎 大阪大学助手・大学院医学系研究科神経機能医学講座（精神医学）

**研究要旨** アルミニウム毒性とアルツハイマー病の病理過程の共通点を明らかにするために、アルミニウムの慢性投与による二次的影響を除外し、より直接的なアルミニウム毒性の作用機序を検討するために、軸索形成初期及び形成後にアルミニウムのパルス曝露を行なったところ、軸索細胞骨格蛋白では、ニューロフィラメントのみが核周囲に分布が限局しアルミニウム・パルス投与による影響を受けていた。また、軸索輸送蛋白について検討したところ、モーター分子であるキネシン、蛋白質のシナプトフィジンや GAP43 では、対照群で軸索遠位部まで分布がみられるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局しており、軸索輸送障害が生じていた。さらに、その後遅れて神経細胞死が生じていた。この細胞死は、アポトーシスによるものであり、アルミニウム濃度依存性にアポトーシスによる神経細胞死が増加していた。アルミニウムはアルツハイマー病の環境危険因子の一つとして考えられており、本研究で示したアルミニウムの毒性によるニューロフィラメントの分布異常と軸索輸送障害およびその結果生じるアポトーシスがアルツハイマー病の病態に関与している可能性が示唆された。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、軸索輸送障害、アポトーシス

### A. 研究目的

アルツハイマー病の環境危険因子のひとつと考えられているアルミニウムの神経毒性はよく知られているが、その毒性機序については未だ解明されていない。この毒性機序を検討するために、これまで種々の動物モデルが検討されてきた。

しかし、その多くがアルミニウムの慢性投与実験モデルであり、慢性投与による二次的影響を考慮しなければならない。

このような背景に基づき本研究では、より直接的なアルミニウム毒性の機序を検討するために、培養ラット神経細胞を用いて、軸索形成初期の培養開始後6時

間目にアルミニウムを高濃度・短時間（パルス曝露）させて、神経突起・軸索の形成、細胞骨格蛋白質の分布および軸索輸送への影響について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 神経細胞の初代培養：

胎生17日齢ウイスター・ラットの大脳を取り出し、脳膜を剥離した後、DNaseI・トリプシンの酵素処理にて細胞を単離して、poly-ethyleneimine でコートした cover slip 上に  $1.8 \times 10^5 / \text{cm}^2$  の密度で播種して、B27/Neurobasal medium（無血清培地）を用いて培養した。

### 2) アルミニウム塩の添加：

塩化アルミニウムと植物由来のアルミニウム有機リガンドである maltol (3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) を等モル比で混合した aluminum-maltol を、神経突起の未だ殆ど出ていない軸索形成初期の培養開始後6時間目及び軸索形成の進んだ培養開始後4日目に1時間曝露し、培地で洗浄した後、さらに B27/Neurobasal medium で培養を継続した。aluminum-maltol の代わりに maltol を等モル加えたものを対照群とした。

### 3) 免疫組織化学：

単層の培養細胞を Tris-buffered saline (TBS, 10 mM Tris/ 0.9%NaCl/ HCl/ pH7.4) で洗浄し、acid-methanol

固定液（70%methanol, 10%acetate, 20%water）を用いて固定した。0.05% Triton-X 100/ 0.5% bovine serum albumin/ TBS にて一次抗体を希釈し、4℃で24時間インキュベートを行った。TBS にて洗浄後、蛍光標識二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss LSM410）により観察した。

尚、一次抗体及び二次抗体として、anti-neurofilament L (R-2-1, 1:1000)、anti-actin (C4, 100)、anti- $\alpha$ -tubulin (DM-1A, 1:1000)、anti-GAP43 (91E12, 1:1000)、anti-kinesin (CKHC9, 1:250)、anti-synaptophysin (SY38, 1:25)、anti-vimentin (V9, 1:250)、anti-NGF(1:200)、anti-rabbit FITC-conjugated(1:250)、anti-mouse IgG or IgM rhodamine-conjugated (1:250) を用いた。

### 4) 細胞の死亡率：

LIVE/DEAD EukoLight Viability / Cytotoxicity- Kit (Molecular Probes) を用いて測定した。

### 5) アポトーシス細胞の同定：

$10 \mu\text{M}$  の Hoechst 33342 を用いて核染色し、核の形態（分葉化など）によりアポトーシス細胞を同定した。

### 6) NGF の投与

培養4日目に培地中にNGFを添加し、2時間後に洗浄・固定して抗NGF抗体を用いて免疫染色した。

### C. 研究結果

先ず、アルミニウムのパルス投与濃度を定める為に、アルミニウム・マルトールの各濃度での培養神経細胞の死亡率を測定したところ、 $500\ \mu\text{M}$  ではパルス投与数時間後から著しい細胞死を認めたが、 $250\ \mu\text{M}$  の場合は、培養4日目では死亡率が対照群と有為な差がないにも関わらず、培養12日目になると死亡率が90%に増加するというように培養経過中の変化が大きく、神経細胞死に至る経過が最も検討し易いと考えられた。このために、本研究では主に $250\ \mu\text{M}$  の濃度で実験を行なった。

このアルミニウム濃度での、細胞骨格と軸索輸送に対する影響に関して、細胞骨格蛋白質では神経軸索骨格の3種のエレメントつまり直径が $10\ \text{nm}$  の中間径線維に属するニューフィラメント L、直径 $6\ \text{nm}$  のアクチン線維、直径 $24\ \text{nm}$  の微小管の各抗体を用い、また、軸索輸送についてはモーター分子であるキネシン、膜顆粒蛋白質であるシナプトフィジン、GAP-43 の各抗体を用いてその分布を検討した。その結果、 $250\ \mu\text{M}$  のアルミニウム濃度で死亡率が対照群と有為な差がない培養4日目で、細胞骨格及び軸索輸送に変化がみられた。また培養3日目以前では、軸索がまだ十分に伸長しておらず、多くの蛋白質が核周囲に分布し軸索遠位部まで輸送されたかどうか判別するのに困難があった。また、他にニ

ューフィラメント H やタウ蛋白についても免疫組織化学的検討を行ったが、ニューフィラメント H はニューフィラメント L に比して発現する時期が遅く、本実験経過中では明らかな免疫組織像の変化を得ることは困難であった。またタウ蛋白は、本実験ではとくにアルミニウムによる明らかな影響は受けていなかった。

軸索形成初期（培養開始後6時間目）に aluminum-maltol を曝露したところ、細胞骨格蛋白質では、ニューロフィラメントが対照群で軸索遠位部まで分布が認められるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。これに対してアクチンでは、アルミニウム・パルス投与群でも軸索遠位部まで分布が認められた。チューブリンもアクチンと同様に、アルミニウム・パルス投与群でも軸索遠位部まで分布が認められた。

さらに、ニューロフィラメントと同じ中間径線維に属するビメンチンについて検討したところ、培養4日目に対照群ではニューロフィラメントが軸索遠位部まで分布しビメンチンが消退しているのに対して、アルミニウム・パルス投与群ではニューロフィラメントの分布が核周囲に限局しており、逆に本来は消退しているべきビメンチンが残存し軸索遠位部まで分布していた。

つぎに、モーター分子であるキネシンは、対照群で軸索遠位部まで分布がみら

れるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。同様に、膜蛋白質のシナプトフィジンでも、対照群で軸索遠位部まで分布がみられるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。さらに、膜蛋白質の GAP43 でも同様に、対照群で軸索遠位部まで分布がみられるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。

これまでの結果を、時間経過によって整理すると、軸索形成以前の培養開始6時間目にアルミニウムをパルス投与したところ、培養4日目には軸索輸送障害がみられ、その後に遅れて神経細胞死が生じていた。そこで、この神経細胞死が、どのような細胞死であるか、つまりアポトーシスによるものかどうかを検討する為、Hoechst 33342 を用いて核染し、核の形態（分葉化など）について調べたところ、アルミニウム・マルツール・パルス投与によりアポトーシスによる細胞死が時間とともに増加していました。これを、アルミニウム濃度ごと細胞数を計測し定量化すると、アルミニウム濃度依存性にアポトーシスによる神経細胞死が増加していた。500  $\mu$ M のアルミニウム投与では、投与直後から細胞死がみられたが、本実験で主に用いた250  $\mu$ M のアルミニウム投与では、軸索輸送障害を認めた培養4日目以降に神経細胞死の増加を認めた。

軸索輸送障害と神経細胞死の関連について、以前からアルツハイマー病では NGF の逆行性軸索輸送障害の関与が指摘されている、そこで、NGF の逆行性軸索輸送障害の有無について検討するために、培養4日目に培地中に NGF を添加し、2時間後に洗浄・固定して抗 NGF 抗体を用いて免疫染色した。その結果、対照群では、成長円錐から細胞体に至るまで軸索上に NGF の分布を認めたのに対して、アルミニウム投与群では内在性の NGF を核周囲に認めたものの軸索上には分布を認めなかった。

#### D. 考察

アルミニウムの神経毒性を検討するために、これまで種々の動物モデルが検討されてきた。本研究では、アルミニウムの慢性投与による二次的影響を除外し、より直接的なアルミニウム毒性の作用機序を検討するために、軸索形成初期及び形成後にアルミニウムのパルス曝露を行った。

軸索形成初期におけるアルミニウムのパルス曝露により、細胞骨格蛋白質では、ニューロフィラメントが対照群で軸索遠位部まで分布が認められるのに対して、アルミニウム・パルス投与群では核周囲に分布が限局していた。これに対してアクチンとチューブリンでは、アルミニウム・パルス投与群でも軸索遠位部まで分布が認められた。これらのことから軸索細胞