

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

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

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成13年(2001)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
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 武田 雅俊	2
II. 分担研究報告	
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	16
2. 培養細胞を用いたアルミニウム毒性の研究 中村 祐	23
3. アルミニウムとストレス応答に関する研究 —小胞体ストレストランスデュサーに及ぼす影響について— 遠山 正彌	29
4. アルミニウムの吸収・代謝・排泄機構及び毒性発現機構のシステム科学的 研究 飯塚 舜介	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	38

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

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。これまでにアルミニウムを妊娠ラット母体の腹腔内に投与すると出生仔の脳において組織変化や発達遅延が認められた。本年度は妊娠 9 日目にアルミニウムマルトールを腹腔内投与し組織内定量を行った。原子吸光分析により、ラットでは胎児脳・胎盤および母体の肝臓、マウスでは胎児脳へアルミニウムが移行するが判明した。免疫組織染色では、生後 0 日目以降でアルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) の変異をもつ knock-in mice においてアルミニウム投与群でニューロフィラメント陽性繊維構造物の乱れが認められ、特に大脳皮質表層では神経細胞の移動が遅延している傾向が認められた。

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軸索形成初期にアルミニウムのパルス曝露を行なった。アルミニウムパルス曝露により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。これらのアポトーシスにおいてカスパーゼ 3 が活性化していることが示され、アポトーシスの過程にカスパーゼ 3 の活性化が関与していることが示された。軸索輸送障害によりアミロイド前駆体淡白の細胞体内の蓄積が見られ、アポトーシスの過程に関与している可能性が考えられた。

アストロサイトは神経細胞に栄養を供給していることが知られている。マウスアストロサイトの初代培養細胞を行い、代謝に対するアルミニウムの影響を調べた。1-¹³C グルコースを加えた培養液で培養後、培養液を ¹H{¹³C}NMR 法によって代謝物を解析した。培養液にアルミニウムを添加した場合にはグルタミンなどの主要な代謝物の生成は変化がなかったが、セリンが観測されなかつ

た。従って、アストロサイトにおいて解糖系および TCA 回路の反応はアルミニウムの影響を受けにくい、解糖系の代謝物から合成されるセリンの生成が特異的に阻害されていることが示された。アルミニウムの神経毒性はアストロサイトに対する毒性を介して神経細胞に現れている可能性が示された。

一方、これまでにアルミニウムは小胞体 (ER) ストレス時、小胞体分子シャペロン GRP78 発現誘導を減弱させ、細胞を脆弱にしていることを明らかにしてきた。神経芽細胞腫細胞にアルミニウムを添加し、ER ストレス時の ATF6 のプロセッシングおよび核移行、また Ire1 α および PERK のリン酸化を検討した。アルミニウム添加群では同非添加群に比べ ATF6 のプロセッシングおよび核移行が遅延しており、PERK および Ire1 α のリン酸化が阻害されていた。この結果は、アルミニウムが Ire1 α を介する unfolded protein response のシグナル伝達を障害させているだけでなく、ATF6 による分子シャペロンの誘導、PERK を介するタンパク質翻訳抑制のシグナル伝達にも影響を与えている可能性が示唆された。

これらの結果から、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することが示唆された。また、アルミニウムの神経毒性は一部アストロサイトに対する毒性を介して神経細胞に現れている可能性が示された。

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、アミロイド、ゼーマン補正原子吸光分析、NMR、小胞体ストレス

研究組織

主任研究者 武田雅俊
(大阪大学神経機能医学・教授)

分担研究者 中村 祐
(大阪大学神経機能医学・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（1973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（ $1.5 \mu\text{M}$ 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。

また、アルツハイマー病を含めた多くの神経変性疾患の発症機序を解明する基礎的研究としてもその成果が期待される。

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勤めた。

中村は初代培養した神経細胞の培地中にアルミニウムを添加し、軸索の細胞骨格蛋白の分布、軸索輸送障害及び続発する神経細胞死について検討した。武田はこの培養細胞での結果を受けて、妊娠動物の腹腔内にアルミニウムを投与し、*in vivo*における軸索の細胞骨格蛋白の分布異常、神経機能発達の遅延について検討し、さらにアルツハイマー病の原因遺伝子変異を導入した動物において、軸索の細胞骨格蛋白の分布異常、神経機能発達などについて検討した。飯塚はアストロサイトの培養を行い、アルミニウムによる代謝障害について NMR を用いて検討した。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性に与えるアルミニウムの影響を、細胞死、ストレス応答蛋白の mRNA 発現量やリン酸化状態の程度から検討した。

（倫理面への配慮）

動物愛護の立場からネンブタール

及びジエチルエーテルを用いて深麻酔下にてラットより脳を取り出した。また、動物の飼育及び薬物の投与に関しては、当該大学動物実験施設の規範に沿い、動物に対して苦痛のない条件下で行った。本研究は樹立された神経芽細胞腫細胞株を用いているので細胞株を用いる上で倫理面の問題はない。

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)

妊娠動物腹腔内に妊娠 9 日目にアルミニウム・マルトールを投与し、組織内のアルミニウム量を原子吸光法により定量した。組織内アルミニウム量は、マウスにおいては胎児脳 ($P < 0.05$)、ラットでは胎児脳・母体の肝臓 ($P < 0.05$) および胎盤 ($P < 0.001$) で有意な増加が見られた。免疫染色では、アルミニウムを投与することにより、生後 0 日目と同様に生後 7 日目においても heterozygous・homozygous において neurofilament 陽性の線維構造の形成がコンロール群比べさらに遅延していた。その傾向は、特に piriform cortex の表層において顕著であり、neurofilament 陽性細胞の migration の遅延が予想される。さらに生後 16 日目では Homozygous のみ同様の傾向が残存

していた。そして、anti-GFAP 染色では、アルミニウム投与により reactive astrocyte がさらに増加していた。

PS1 knock-in mice において生後初期の発達を比較したところ、体重において対照群とアルミニウム群を比較した場合、有意差が得られたものもあるが、アルミニウム群は、各 genotype で比較するにはまだサンプル数が少数でありさらに検討が必要である。

PS1 knock-in mice 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、昨年度と異なり 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、homozygous の比率が増加していた。

APP transgenic mice にアルミニウムを腹腔内に投与した場合、PS1 knock-in mice よりやや低濃度で出産する傾向が見られた。

(2) 培養細胞を用いたアルミニウム毒性の研究 (中村 祐)

軸索形成初期 (培養開始後 6 時間目) に aluminum-maltol をパルス曝露したところ、ニューロフィラメントと速い軸索輸送成分の輸送障害が認められた。

さらにアルツハイマー病の病理過程に重要な役割を果たしていると考え

られているアミロイド前駆体蛋白の軸索輸送について検討を加えた。アミロイド前駆体蛋白はキネシン、シナプトフィジン、GAP43 と同じく速い軸索輸送成分であると考えられているが、アルミニウム・パルス投与群では同様に核周囲に分布が限局していた。

軸索形成以前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を Hoechst 33342 を用いて検討したところ、アルミニウム・マルトール・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、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 μ 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 μ 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。さらに細胞死がアポトーシスによるものであることの確認及び細胞死に関連するカスパーゼを検索するためにアルミニウムをパルス投与した神経細胞に種々のカスパーゼ阻害剤を投与した。凡カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk, カスパーゼ3群阻害

剤 Ac-DEVD-CHO, カスパーゼ1群阻害剤 Ac-YVAD-CHO, カスパーゼ8群阻害剤 Ac-IETD-CHO 各々を有効濃度で投与し続けたところ、培養12日目において凡カスパーゼ阻害剤 z-VAD-fmk, カスパーゼ3群阻害剤 Ac-DEVD-CHO において明らかに細胞死の抑制作用がみられた。また抗 APP caspase-3-cleavage-site 抗体を用いてアルミニウムをパルス投与した神経細胞を染色したところ、核周囲に分布が限局している APP が染色され、核周囲に分布が限局している APP の一部がカスパーゼ3により分解を受けていることが示された。

(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)

培養30日以内のアストロサイトは培養液中に乳酸, L-アラニン, L-グルタミンを多量に放出している。これに加えて、クエン酸, グリシン, L-セリンなどが観測された。1 mM のアルミニウム塩を添加した培養液中には L-セリンが観測されなかった。これによりアルミニウムが L-セリンの生成を特異的に阻害していることがわかった。これに対して、乳酸および L-グルタミンの生成はアルミニウムによってほとんど影響を受けていなかった。このことは解

糖系および TCA 回路の酵素は 1 mM のアルミニウムの存在条件でも活性を保持していることを示している。また、培養細胞の顕微鏡による観察でも形態に変化は見られなかった。さらに、クエン酸のシグナルはアルミニウム 0.1mM 添加時には観測されていたが、1 mM 添加時には観測されなかった。また、培養液中にはグルタミン酸はいずれの条件でも 1D-および 2D-NMR スペクトルに観測されなかった。

(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)

1) Ire1 α 、PERK の活性化に対するアルミニウム添加の効果；

PERK は Ire1 同様一回膜貫通蛋白質で ER 内腔にセンサー部位を、細胞質側にセリン・スレオニンキナーゼ・ドメインを持ち ER ストレスが負荷されるとリン酸化され活性化する。本年度アルミニウム-マルトールを用いて ER ストレス時の PERK および Ire1 α のリン酸化をそれぞれの抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検討した。1 μ M thpsigargin 処理した細胞で PERK および Ire1 α は、刺激直後からリン酸化型が出現する。それに対し、アルミニウム-マルトール 100 μ M、500

μ M 添加群では非添加群に比べそれぞれのリン酸化がアルミニウム-マルトール用量依存的に阻害されていた。この結果は、アルミニウムが Ire1 α を介する unfolded protein response のシグナル伝達を障害させているだけでなく、PERK を介するタンパク質翻訳抑制のシグナル伝達にも影響を与えている可能性を示唆する。

2) ATF6 の活性化に対するアルミニウムの効果；

tunicamycin (Tm) 刺激によって ATF6 の切断と核移行を観察した。ATF6-50kDa 断片は Tm2 μ g/ml 刺激 2 時間後から検出され、経時的に上昇したがアルミニウム-マルトール前処置によって刺激による ATF6-50kDa 断片の出現が用量依存的に遅延する傾向にあった。また、Tm10 μ g/ml 刺激によって ATF6 は刺激後 30 分には核移行がはじり、1 時間後にはほぼ完全に核へ移行していた。これに対し、アルミニウム-マルトール前処置群ではこの核移行が遅延する傾向にあった。尚、500 μ 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、Ire1 α 、PERK および ATF6 は活性化されなかった。

D. 考察

昨年度アルミニウム腹腔内投与に

より胎児脳の組織変化や発達遅延が認められた。今年度はまずその変化がアルミニウム自身によるものか判別するため、組織内アルミニウム定量を行った。これまでのアルミニウムの妊娠期における腹腔内投与による研究では、anhydrous aluminum chloride や hexahydrate salts を投与した場合、脳への移行は認められなかったこと、胎児においては7例中6例では移行が認められず、残りの一例においても高濃度投与するほど胎児への移行が減少すること、さらに母胎間の移行としてヒトにおける制酸剤の研究からも胎児には移行しないことも判明している。

本研究では、ラットで胎児脳・胎盤および母体の肝臓、マウスでは胎児脳へ移行するが判明した。この移行に関してマルツールというアルミニウムリガンドと共に投与したことで、妊娠9日目という投与時期がアルミニウムの移行にしやすい時期であったという2つの可能性が考えられる。

アルミニウムの脳組織へ影響は、ラット同様、PS1 knock-in mice でもコントロール群に比しアルミニウム投与群で neurofilament 陽性繊維構造物の乱れが認められ、特に cortex 表層では heterozygous・homozygous において neurofilament 陽性細胞の

migration が遅延している傾向が見られた。

神経機能発達検査において、PS1 knock-in mice により righting reflex を行ったところ、生後0・3・7日目においてアルミニウム投与群は対照群に比べ、若干反応が鈍い傾向がみられたが、ラットで認められた明確な遅延が genotype 別に認められなかった。生後16日目になるとラット同様、対照群とアルミニウム投与群の反応差は無くなっていた。negative geotaxis は、wild-type においてはラット同様アルミニウム投与群において遅延傾向が認められたが、他の genotype では反対の結果が得られた。この結果を考察するにあたって、PS1 の正常機能について着目すると、PS1 は Notch シグナリングなど発生過程に重要な役割を担っていることや、PS1 のノックアウト動物では、傍軸中胚葉の発生異常が見られ、Notch ノックアウトの表現型に類似してなど、発生期に深く関わっている事が示唆される。これらのことより、PS1 knock-in mice の生直後の発達を検討したところ、アルミニウム非投与群では、heterozygous および homozygous は gene-dose-effect によって wild-type より発達遅延傾向が見られた。よって、妊娠9日目におけるアルミニウムに対する感受

性が各 genotype により異なることも考えられる。今後はこれらのことも含めた検討が必要である。

PS1 knock-in mice において、heterozygous 同士を交配させて出生した個体の genotype 構成比を検討したところ、昨年度の結果と異なりアルミニウム投与群では homozygous の占める比率が増加していた。これについても発達検査と同様のことが懸念されることよりさらに検討が必要である。

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、軸索形成初期にアルミニウムのパルス曝露を行なった。

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、ニューロフィラメント及び速い軸索輸送成分の輸送障害がみられた。これらの軸索輸送障害に遅れて神経細胞死がみられるが、Hoechst 33342 を用いて検討したところこれらの細胞死はアポトーシスによるものであることが示され、投与するアルミニウムの濃度に依存してアポトーシスがさらに強くみられることが示された。これらのことから軸索輸送障害によりアポ

トーシスによる神経細胞死が生じている可能性が示唆された。さらにアルミニウムによる神経細胞死についてカスパーゼ阻害剤を用いて詳しく検討した。カスパーゼ 3 群を阻害する薬剤で一部のアポトーシスが阻止され、アルミニウムによるアポトーシスの際にカスパーゼ 3 が活性化していることが示唆された。しかし、カスパーゼ 1 群及びカスパーゼ 8 群を阻害する薬剤ではアポトーシスの進行を阻止できず、ミトコンドリアの障害や F A S リガンドによるアポトーシスではないことが示唆され、アルミニウム・パルス曝露によるアポトーシスは通常にみられるアポトーシスと異なるメカニズムであることが示唆された。アルツハイマー病においてその主要病理過程に関与していると考えられているアミロイド前駆体蛋白 (APP) はカスパーゼ 3 により分解を受け、その結果アミロイド蛋白が生成されやすくなるという報告がある。アルミニウムのパルス曝露に依るアポトーシスの際に APP がカスパーゼ 3 により分解を受けているかを抗 APP caspase-3-cleavage-site 抗体を用いて検討した。アルミニウムのパルス曝露により APP は細胞体に蓄積することがみられたが、これはアルミニウムのパルス曝露により速い軸索輸送成分が障害された

ためであると考えられる。蓄積した APP は抗 APP caspase-3-cleavage-site 抗体により染色され、蓄積した APP の一部はカスパーゼ 3 により分解を受けていると考えられる。カスパーゼ 3 による APP の分解は神経細胞死に関連している可能性があると考えられる。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。

アストロサイトは神経細胞の機能維持に重要な役割を果たしている。アストロサイトの代謝に対するアルミニウムの影響を調べたところ、アルミニウム塩を添加した培養液中には L-セリンが観測されなかった。アルミニウムが L-セリンの生成を特異的に阻害していることが示唆された。これに対して、乳酸および L-グルタミンの生成はアルミニウムによってほとんど影響を受けていなかった。このことは解糖系および TCA 回路を構成する酵素は 1 mM のアルミニウムの存在条件でも活性を保持していることを示している。中枢神経系のニューロンはアストロサイトが合成した L-セリンを取り込むこ

とによって、発達し活動を維持していることが最近明らかにされている。今回の実験において、アルミニウムが特異的に L-セリンの合成を阻害していることは、アルミニウムの神経毒性はアストロサイトの代謝を阻害することを介して、神経細胞に現れている可能性があることが示唆された。

また、クエン酸のシグナルはアルミニウム 0.1mM 添加時には観測されていたが、1 mM 添加時には観測されなかった。クエン酸はアルミニウムと安定な錯体を形成することが知られている。TCA 回路は十分機能しているわけであるから、細胞内でアルミニウムと錯体を形成し、培養液中に出てこないものと考えられる。中枢神経系に入ったアルミニウムに対して、アストロサイトがアルミニウムを取り込みクエン酸塩として保持することにより、神経細胞に影響を及ぼさないように防御作用をしていることが示唆された。

これまでに、アルミニウムは家族性アルツハイマー病における PS1 変異体と同様に GRP78 誘導機構に障害を与える可能性を示してきた。PS1 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トランスデューサー 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。そこで本研究ではアルミニウムがストレストランスデューサー Irel α や PERK などのリン酸化に及ぼす影響について調べ、さらに ATF6 の活性化に対するアルミニウムの効果についても、併せて検討を行った。その結果、Irel α 、PERK のリン酸化がアルミニウムによって障害されており、更には異なる機序で活性化することの知られている ATF6 の活性化をも障害することが明らかになったことから、アルミニウムが直接これらストレストランスデューサー群の活性化を障害するよりもむしろアルミニウムによって誘導され産生されてくる二次的なタンパク質が PS1 変異体様の作用を示す可能性も考えられる。最近、弧発性アルツハイマー病脳において PS2 の exon5 が欠失したスプライシング変種が 100% 発現していることを見つけ出した。このスプライシング変種は PS1 変異体同様、Irel に直接結合して小胞体ストレス時 Irel のリン酸化を阻害し、GRP78mRNA の発現誘導を減弱させることを報告している。今後、このスプライシング変種発現機構にアルミニウムの関与があるか調べるレベル必要がある。

E. 結論

1) アルミニウムは、植物性有機

リガンドであるマルトールと結合させ妊娠 9 日目に腹腔内投与すると、ラットでは胎児脳・胎盤および母体の肝臓、マウスでは胎児脳へ移行するが判明した。

2) 免疫染色においては、ラット脳組織同様、PS1 knock-in mice でもコントロール群に比しアルミニウム投与群で neurofilament 陽性繊維構造物の乱れが認められ、特に cortex 表層では heterozygous・homozygous において neurofilament 陽性細胞の migration が遅延している傾向があった。

3) 神経機能発達検査において、PS1 knock-in mice では、ラットでみられたアルミニウム投与による明確な遅延が genotype 別に認められず、来年度からの検討が必要である。

4) PS1 knock-in mice において、heterozygous 同士を交配させて出生した個体の genotype 構成比を検したところ、昨年度の結果と異なりアルミニウム投与群では homozygous の占める比率が増加していた。しかし、有意差は得られなかったため、これについてもさらに検討が必要である。

5) 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、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。これらのアポトーシスにおい

てカスパーゼ3が活性化していることが示され、アポトーシスの過程にカスパーゼ3の活性化が関与していることが示された。軸索輸送障害により APP の細胞体内の蓄積が見られ、アポトーシスの過程に関与している可能性が考えられた。ことから、アルミニウムの神経毒性のメカニズムの一部が明らかとなり、また、軸索輸送障害と神経細胞のアポトーシスに関連のあることが示された。

6) アストロサイトからの L-セリンの供給が受けられないと中枢神経系のニューロンは重大な影響を受けることになると考えられる。アストロサイトにおける L-セリンの合成阻害がアルミニウムの神経毒性の重要な要因となりうることがうかがい示唆された。

7) アルミニウムが小胞体ストレストランスデューサーの活性化機構を障害していることが明らかになった。この小胞体ストレス応答機構の障害は家族性アルツハイマー病における PS1 変異体、孤発性アルツハイマー病における PS2 バリエーションによる障害と同様の傾向であることから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強く示唆された。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

(1) 論文発表

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

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(3): 201-204, 1997

3) 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.

4) Nakamura Y, Hashimoto, Kashiwagi Y, Wada Y, Sakota S, Miyamae Y, Kudo T, Takeda M: Casein kinase II is responsible for phosphorylation of NF-L at Ser-473. *FEBS Lett*, 455: 83-86, 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) 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

7) Meshitsuka S, Matsushima F, Nose T: Absorption of aluminum from aspirin preparations with aluminum glycinate. *Trace Elements and Electrolytes*, 16 175-176, 1999.

8) Meshitsuka S, Inoue M, Seki A, Koeda T, Takeshita K: Screening of urine by one-dimensional and pulsed field gradient two dimensional ¹H NMR spectroscopy: intoxication by propylene glycol in an infant patient. *Clinica Chimica Acta* 279: 47-54, 1999.

9) Meshitsuka S, Yamazaki E, Inoue M, Hagino ., Teshima R, Yamamoto K: Nuclear magnetic resonance studies of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinica Chimica Acta* 281: 163-167, 1999.

10) Inoue M, Suyama A, Takeuchi Y, Meshitsuka S: Application of a computer based education system for

aged persons and issues arising during the field test. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 59: 55-60, 1999.

11) Sato N., et al.: A novel presenilin 2 splice variant in human Alzheimer's disease brain tissue. *J. Neurochem.* 72, 2498-2505, 1999.

12) Nakamura Y, Hashimoto R, Kashiwagi Y, Aimoto S, Fukusho E, Matsumoto N, Kudo T, Takeda M : Major phosphorylation site (Ser⁵⁵) of neurofilament L by cyclic AMP-dependent protein kinase in rat primary neuronal culture. *J Neurochem* 74(3): 949-959, 2000.

13) Hashimoto R, Nakamura Y, Komai S, Kashiwagi Y, Tamura, K, Gotow T, Aimoto S, Kaibuchi K, Shiosaka S, Takeda M: Site-specific phosphorylation of neurofilament-L is mediated by calcium/calmodulin dependent protein kinase II in the apical dendrites during long-term potentiation. *J. Neurochem* 75(1); 373-82, 2000.

14) Hashimoto R, Nakamura Y, Komai S, Kashiwagi Y, Matsumoto N, Shiosaka S, Takeda M: Phosphorylation of neurofilament-L during LTD, *Neuroreport*, 11(12): 2739-2742, 2000.

15) Nakamura Y, Hashimoto R, Amano M, Nagata K, Matsumoto N, Goto H, Fukusho E, Mori H, Kashiwagi Y, Kudo

T, Takeda M: Localized phosphorylation of vimentin by Rho-kinase in neuroblastoma N2a cells, *Genes Cells*, 5(10): 823-837, 2000.

16) Inoue M, Meshitsuka S, Yoshioka S, Kawahara R: Development of computerized screening system for dementia and its preliminary field test. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 61:151-155, 2000.

17) Kamba M, Meshitsuka S, Iriguchi N, Koda M, Kimura K, Ogawa T: Measurement of relative fat content by proton magnetic resonance spectroscopy using a clinical imager. *J. Magnetic Resonance Imaging* 11: 330-335, 2000.

17) Meshitsuka S, Koeda T, Hara T, Takeshita K: Abnormal aluminum metabolism in two siblings with progressive CNS calcification. *Developmental Medicine and Child Neurology* 42: 354-355, 2000.

18) Sato, N., et.al.: Increased production of β -amyloid and vulnerability to ER stress by an aberrant spliced form of presenilin-2. *J. Biol. Chem.* 276, 2108-2114, 2001

19) 松島文子, 飯塚舜介: 食物および医薬品からのアルミニウム摂取と排泄. *日本衛生学雑誌* 56: (2001).

(2) 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 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

4) 第43回神経化学会 (金沢) 平成12年10月18日
柏木雄次郎、福所英理子、中村 祐、松本均彦、武田雅俊
アルミニウムのパルス暴露による系での軸索輸送障害

5) 第43回神経化学会 (金沢) 平成12年10月19日
福所英理子、柏木雄次郎、中村 祐、中野有香、松本均彦、工藤 喬、武田雅俊

PS1 ミスセンス変異を有するノック

インマウス胎児の神経発達に対する
アルミニウムの影響

6) 第39回 NMR 討論会

疋田 純, 富永里香, 井上 仁, 難
波栄二, 大塚 譲, 飯塚舜介

HMQC 法によるアストログリア細胞
の代謝物の観測.

第39回 NMR 討論会予稿集 266-267,
2000.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

遺伝子変異動物を用いたアルミニウム神経毒性の研究

主任研究者：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、アルミニウムを妊娠ラット母体の腹腔内に投与することで、出生仔の脳において組織変化や発達遅延が認められ、アルツハイマー病の原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) の変異をもつ knock-in mice の生直後でもラット同様の組織変化が認められた。本年度はその変化がアルミニウム自身によるものか判別するため、生体内への移行を円滑にする植物性有機リガンドであるマルツールと結合させ、妊娠 9 日目に腹腔内投与し組織内定量を行った。原子吸光分析により、ラットでは胎児脳・胎盤および母体の肝臓、マウスでは胎児脳へ移行するが判明した。免疫組織染色では、生後 0 日目以降でもラット脳組織同様、PS1 knock-in mice においてコントロール群に比しアルミニウム投与群で neurofilament 陽性繊維構造物の乱れが認められ、特に cortex 表層では heterozygous・homozygous において neurofilament 陽性細胞の migration が遅延している傾向が認められた。

キーワード：アルツハイマー病、遺伝子変異動物、プレセニリン 1 (PS1)、アミロイド前駆体タンパク (APP)

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。これまで、この毒性機序を検討するために、神経初代培養細胞や動物モデルが検討されてきた。本研究室では、*in vivo* において妊娠期におけるア

ルミニウム腹腔内投与により胎児脳の組織変化や発達遅延が観察されている。今年度はその変化がアルミニウム自身によるものか判別するため、組織内定量を行った。また、アルミニウムは、アルツハイマー病原因遺伝子である PS1 knock-in mice の発達により抑制的に働くのではないかと仮定し、ラット同様

発達機能検査と生後0日目以降の組織変化を検討した。また、アルツハイマー病のもう一つの原因遺伝子であるAPPの transgenic mice においても検討を行った。

B. 研究方法

1) 使用動物：i) PS1 knock-in mice

プレセニン1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原因遺伝子の一つであり、8回膜貫通タンパク質をコードしており、現在50種類以上のミスセンス変異が報告されている。

今回用いたマウスに導入した変異は、大阪で発見されたOS-2家系の変異であり、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したものである。この変異を有する家系は約45歳前後で発症し、家族性アルツハイマー病の典型的な症状を呈する。OS-2家系の線維芽細胞よりアミロイドβを測定したものです。アミロイドβはアルツハイマー病の症状である老人斑の主成分であり、アルツハイマー病ではアミロイドβ40ではなく凝集性の高いアミロイドβ42が増加することが知られています。このOS-2家系でも、コントロールに比べ、約1.8倍増加していました。

今回使用したI213T missense mutation knock-in miceでも、16から20週において脳組織中のアミロイドβ42が増加し

ており、Wild typeを1とすると、Heterozygousで1.3、Homozygousで1.7倍と増加していた。つまり、OS-2家系にみられたアミロイドβの特徴をこのOS-2家系にみられたアミロイドβの特徴をこの knock-in miceでも再現していることとなります。

ii) APP transgenic mice

APPはAβの前駆体で約700アミノ酸残基からなるタイプI型膜貫通タンパク質である。

今回用いたマウスは、hamster prion protein promoterを用いてスウェーデンの家族性アルツハイマー家系にみられる変異(KM670/671NL)を有するヒトβAPP695 cDNAを発現させたものであり、学習記憶障害・アミロイドβの増加・老人斑が認められることからアルツハイマー病の特徴を兼ね備えている。

2) アルミニウムの投与：

アルミニウムの生体内への移行を円滑にするため、植物由来のアルミニウム有機リガンドあるマルトールと塩化アルミニウムを等モル比で混合したアルミニウム・マルトールを、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日目頃には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 PS1 knock-in mice では 21.3mg、APP transgenic mice ではそれより少量の 18.9mg であった。

3) アルミニウム定量方法：

前述の投与方法により胎児および母体における脳・肝臓・胎盤へのアルミニウムの移行を Wistar ラット・および C57BL/6 マウスを用いて検討した。サンプル処理方法は、胎児・母体とも出産直後に各臓器を摘出し、全量 1 ml の生理食塩水でホモジナイズし、硝酸を加え加熱処理し完全に溶解させた後、日立偏向ゼーマン原子吸光光度計により測定した。

4) 免疫組織化学：

凍結切片を anti-neurofilament L(1:1000)、anti-GFAP (1:250)により免疫染色し、retrosplenial granular cortex、海馬の CA1 region、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。

5) 神経機能発達検査：

Righting reflex は、半規管内の受容器に対する刺激により生じる反射を測定する方法で、一般的に生後早期より観察される。マウスを仰向けに置いたのち、直ちに指を離して動物の四肢が設置するまでの時間を測定した。

Negative geotaxis 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方法で、動物が斜面を高方へ登るといふ本能的な能力をみる方法です。マウスを 45 度の傾斜版に頭部を下方に向けて置き、身体を反転させ登坂すれば成功（強反応）とした。能力の程度は、強・中・弱反応および反応なしの 4 段階に分類し、全反応段階に対する強・中反応をパーセンテージで表した。これは、先述の Righting reflex よりやや高度な機能のため、より後期に完成する。

（倫理面への配慮）

動物愛護の立場からネンプタル及びジエチルエーテルを用いて深麻酔下にてラットより脳を取り出した。また、動物の飼育及び薬物の投与に関しては、当該大学動物実験施設の規範に沿い、動物に対して苦痛のない条件下で行った。

C. 研究結果

組織内のアルミニウム量は、マウスにおいては胎児脳($P<0.05$)、ラットでは胎児脳・母体の肝臓($P<0.05$)および胎盤($P<0.001$)で有意差が得られた。

免疫染色では、アルミニウムを投与することにより、生後 0 日目と同様に生後 7 日目においても heterozygous・homozygous において neurofilament 陽性の線維構造の形成がコンロール群比べさらに遅延していた。その傾向は、特に

piriform cortex の表層において顕著であり、neurofilament 陽性細胞の migration の遅延が予想される。さらに生後 16 日目では Homozygous のみ同様の傾向が残存していた。そして、anti-GFAP 染色では、アルミニウム投与により reactive astrocyte がさらに増加していた。

PS1 knock-in mice において生後初期の発達を比較したところ、体重において対照群とアルミニウム群を比較した場合、有意差が得られたものもあるが、アルミニウム群は、各 genotype で比較するにはまだサンプル数が少数でありさらに検討が必要である。

PS1 knock-in mice 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、昨年度と異なり 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、homozygous の比率が増加していた。

APP transgenic mice にアルミニウムを腹腔内に投与した場合、PS1 knock-in mice よりやや低濃度で出産する傾向が見られた。

D. 考察

昨年度、アルミニウム腹腔内投与により胎児脳の組織変化や発達遅延が認められた。今年度はその変化がアルミニウム自身によるものか判別するため、組織内定量を行った。その組織として、変化が認められ、かつ以前からアルミニウムは

神経特異的と言われていることより胎児および母体の脳、また母体腹腔で胎児への移行時にアルミニウムがろ過されている可能性から胎盤、そして胎盤より血管系で繋がっている実質臓器の代表として肝臓、この三つの組織においてアルミニウムの定量を行った。

これまでのアルミニウムの妊娠期における腹腔内投与による研究では、anhydrous aluminum chloride や hexahydrate salts を投与した場合、脳への移行は認められなかったこと、胎児においては 7 例中 6 例では移行が認められず、残りの一例においても高濃度投与するほど胎児への移行が減少すること、さらに母胎間の移行としてヒトにおける制酸剤の研究からも胎児には移行しないことも判明している。

本研究では、ラットで胎児脳・胎盤および母体の肝臓、マウスでは胎児脳へ移行するが判明した。この移行に関してマルツールというアルミニウムリガンドと共に投与したことと、妊娠 9 日目という投与時期がアルミニウムの移行にしやすい時期であったという 2 つの可能性が考えられる。しかし、2 つ目に関しては、これまでの研究でも妊娠期のどの時点で投与したことが明記されていないことから今後さらに検討の必要がある。

アルミニウムの脳組織へ影響は、ラット同様、PS1 knock-in mice でもコントロール群に比しアルミニウム投与群で