

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。

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、wildtype 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。来年度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。

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。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。

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) Nakamura Y, Hashimoto R, 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

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

培養細胞を用いたアルミニウム毒性の研究

分担研究者：中村 祐 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。これらのことから、アルミニウムの神経毒性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。

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、アミロイド

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- α -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)、抗 APP caspase-3-cleavage-site 抗体 (吉川和明先生より供与、1:250)、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) カスパーゼ阻害剤の投与:

aluminum- maltol をパルス暴露直後から、高濃度 (1-10mM) で DMSO に溶解したカスパーゼ阻害剤 (z-VAD-fmk, Ac-DEVD-CHO, Ac-YVAD-CHO, Ac-IETD-CHO、ペプチド研) を投与し、1 日毎に初期量の半量を添加し続けた。

(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出した。また、動物の飼育に関しては、当該大学動物実験施設の規範に沿った。

C. 研究結果

アルミニウムのパルス投与濃度 $250 \mu\text{M}$ の場合には、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 μ Mの濃度で実験を行なった。

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。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。

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質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質はキネシン、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。

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ていた。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 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。

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アポトーシスを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FAS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。

E. 結論

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。

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) 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*, 45583-861999

4) 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.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

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ーサーに及ぼす影響について—

分担研究者：遠山正彌 大阪大学教授

(大阪大学大学院医学系研究科機能形態学)

研究協力者：片山泰一、本田章子、眞部孝幸

(大阪大学大学院医学系研究科機能形態学)

研究要旨

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。今回 GRP78 発現誘導に重要な小胞体ストレストランスデューサー Ire1 α 、ATF6 の活性化を、更には他の小胞体ストレストランスデューサー PERK の活性化を阻害していることを明らかにした。すなわち、神経芽細胞腫 SK-N-SH 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。ATF6 は活性化されると小胞体膜近傍で 90kDa の全長から 50kDa の細胞質領域が切り出され、核に移行し分子シャペロンを誘導する。一方、Ire1 α 、PERK は活性化されるとオリゴマーを形成しリン酸化され、下流にシグナルを伝えて翻訳を調節する。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を示唆する。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、小胞体ストレス、GRP78、Ire1、PERK、ATF6

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) についてはこれまで神経病理学的、遺伝学的に重要な報告がなされてきた。神経病理学的にはアミロイド β 蛋白質 (A β) の蓄積によるアミロイド斑の沈着、タウ蛋白質の異常なリン酸化による神経原線維変化¹⁾、そして神経細胞死、

遺伝学的には三種類の原因遺伝子(アミロイド前駆体タンパク質 (APP)、プレセニリン1 (PS1)、プレセニリン2 (PS2) の発見である。ADの一部は前述の遺伝子変異のある家族性AD (FAD) であるが、この内、PS1が原因となるケースが最も多い。最近我々は変異PS1が小胞体ストレス応答性

を低下させ、神経細胞死を誘発することを明らかにしてきた⁹⁾。しかしながらADの大多数を占める孤発性AD

(SAD)ではPS1遺伝子に変異は見い出されていないことから、別の機序でアルツハイマー病が発症することが予想される。アルミニウムとAD発症との関連性についてはかなり古くから研究がされているが、その詳細な分子メカニズムに関しては現時点ではほとんど理解されておらず、因果関係についても決着がついていない。

本研究の目的は、細胞外から取り込まれたアルミニウムが変異PS1と同様な効果、すなわち小胞体ストレス応答性の低下を引き起こすのか否かを検討し、アルミニウムがSADの発症に深く関わるかを考察することである。昨年までに我々はアルミニウムが細胞の生体防御機構のひとつunfolded-protein response (UPR)の最終産物であるGRP78の発現誘導を減弱させ小胞体ストレスに対して脆弱になることを報告した。本年はアルミニウムがどのようにUPRを減弱させるかを明らかにする目的で小胞体ストレストランスデューサーIre1 α 、PERK、ATF6の活性化に対するアルミニウムの影響について検討した。

B. 研究方法

1) 細胞培養とストレス負荷

ヒト神経芽細胞腫SK-N-SH細胞は、10%FCSを含むDMEMで培養した。小胞体ストレス誘発剤として、tunicamycin (Tm) および thapsigargin (Tg) を用いた。Tmは小胞体での蛋

白質の糖鎖修飾を阻害することによって、Tgは細胞内のカルシウムホメオスタシスを攪乱することによって小胞体ストレスを誘発する。アルミニウムはマルトールとの混合液として用いた。本実験ではアルミニウム-マルトール混合液を24時間各濃度で処理したあと、ATF6の切断および核移行の検討ではTmを3 μ g/mlの濃度で、Ire1 α およびPERKの活性化の検討にはTgを1 μ Mの濃度で刺激した。

2) 小胞体ストレストランスデューサーの活性化

Ire1 α 、PERK;小胞体ストレス負荷後、各時間に細胞を1%triton bufferで可溶化し、可溶化成分を定法に従ってIre1 α 、PERKの特異的な抗体でWesternブロットした。

ATF6;小胞体ストレス後、細胞を各時間にHot-SDS bufferで可溶化し、Westernブロットを行い、ATF6を特異的に認識する抗体を用いて検出を行った。

免疫染色;小胞体ストレス後、4 $^{\circ}$ Cに冷却したPBSで洗い、Zamboni液にて固定し、0.02MPBSで洗った後、0.03%tritonで透過させ、一時抗体として抗ATF6ポリクロナール抗体を、2次抗体としてFITCラベルされた抗ウサギIgG抗体を用いて免疫染色を行った。観察は蛍光顕微鏡によって行った。

(倫理面への配慮)

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問題はない。

C. 研究成果

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。今回、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トティングにより検討した。PERK および Ire1 α はリン酸化されると SDS-PAGE で移動距離が短くなる。従って泳動距離によりリン酸化型と非リン酸化型の違いを識別することができる。1 μ M Tg 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;

小胞体ストレストランスデューサー ATF6 は小胞体に局在する分子量 90kDa の一回膜貫通型糖蛋白質である。ATF6 は小胞体ストレスが刺激となり活性化すると、小胞体膜近傍で切断され分子量 50kDa の N 末側断片が核へ移

行し、GRP78 等の分子シャペロンの転写因子として機能することが知られている。そこで 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 Tm 2 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 Tm 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、Tm 10 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。

なお、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

我々はこれまでに、アルミニウムも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 Ire1 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、Ire1 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。我々は最近、SAD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、Ire1に直接結合して小胞体ストレス時Ire1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が関わっていないか興味のもたれるところである。

E. 結論

本年度の検討で、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FADにおけるPS1変異体、SADにおけるPS2V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る。また、アルミニウムがPS2Vのようなスプライシング変種を産生する機構に関わっているか否かが今後の課題であると思われる。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

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

3) 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

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

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

研究分担者：飯塚舜介（鳥取大学医学部医学科医療環境学）

研究協力者：富永里香，疋田 純，井上 仁（同上）

研究要旨

生後2-4日のマウスの脳組織からアストロサイトの初代培養細胞を得た。1- ^{13}C グルコースを加えた培養液で培養後、培養液を $^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMR法によって代謝物を解析した。 ^{13}C で標識された乳酸、アラニン、グルタミン、酢酸、などの主要な生成物に加えて、クエン酸、セリンが観測された。培養液に乳酸アルミニウムを1 mM添加した場合にも、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った。従って、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ことがわかった。これに対して、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わかった。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。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あることがうかがわれた。

A. 研究目的

脳内には神経細胞の他に、グリア系細胞が大量に存在する。従来、グリア系細胞の脳における役割は、神経細胞間の物質移動、脳血管関門の形成、神経伝達物質の取り込み、死細胞の貪食、ミエリン形成、有害物質の取り込みなどであると考えられてきた。これらに加えて、最近、脳代謝においてアストロサイトを中心としたグリア系細胞が重要な役割をしていることが明らかにされてきた。神経細胞はアストロサイトからの栄養物質の供給を受けて、生存に必要な物質とエネルギーを生成し、また、神経細胞特有の神経伝達物質の合成においても前駆体となる物質の供給を受けていることが明らかにされてきた。ピルビン酸カルボ

キシラーゼ及びグルタミン合成酵素は神経細胞には存在せず、アストロサイトにのみ存在することが知られている。ピルビン酸カルボキシラーゼはピルビン酸からオキサロ酢酸を合成し、解糖系からTCA回路への経路で重要な働きをする。グルタミン合成酵素はグルタミン酸からグルタミンを生成する。このように特異な機能をもつアストロサイトはこれらの代謝物を細胞外に分泌し、それらの代謝物によって中枢神経系が維持されていると理解される。アストロサイトの代謝物のNMRによる解析は、主として1次元の測定で行われてきた。そのため、いくつかの重要な代謝物が見落とされてきた。今回、マウスのアストロサイト初代培養細胞を用い ^{13}C ラベルした

グルコースを用いて2次元NMR法で代謝物を観測することにより、アルミニウムのアストロサイトに対する作用及び中枢神経系に入ったアルミニウムの代謝についての知見を得ることを目的とする。

B. 研究方法

1) 細胞培養

生後2~4日のマウスから大脳を採取し、物理的攪拌により細胞を分離した。DMEM培養液にF12培養液を加えた(1:1)培養液に15%仔牛胎児血清を添加した条件で培養した。週2回培養液を交換し、増殖の状態を見て植え継ぎを行いアストロサイトの単一培養細胞を得た。代謝物の観測は、グルコースを含まないDMEMに $1\text{-}^{13}\text{C}$ グルコースを $1\text{g}/1$ の濃度で添加し、10%仔牛胎児血清を添加した条件で培養した。培養液に乳酸アルミニウムを 0.01mM , 0.1mM , 1mM の濃度で添加し、アルミニウム塩を添加していないものと比較した。6時間、12時間、24時間後の培養液と培養細胞を採取しNMR測定試料とした。

2) NMRの測定

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMRの測定はVarian Unity-500で行った。試料に10%D₂Oを添加した。測定条件は pulse width= $13.5\mu\text{s}$, acquisition time = 0.197s , spectral width = 5200Hz (^1H), 13000Hz (^{13}C), number of transient = 128, number of increment = 256, decoupler sequence = garpl, temp = 27°C であった。ケミカルシフトは乳酸

のメチル基を ^1H : 1.33ppm , ^{13}C : 21.2ppm とした。

C. 結果

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。1mM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1mM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, 1mM 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。

D. 考察

アルミニウム塩 1mM 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が明らかになった。このことは、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うかがわれた。

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うかがわれた

E. 結論

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。アルミニウムの神経毒性の機構については多くの

報告があるが、いまだよく解かっていないのが現状である。今回の実験から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われた。

F. 研究発表

- 1) Meshitsuka S., Inoue M.: Urinary excretion of aluminum from antacid ingestion and estimation of its apparent biological half-time. Trace Elements and Electrolytes 15: 132-135 (1998).
- 2) Meshitsuka S., Matsushima F., Nose T. Absorption of aluminum from aspirin preparations with aluminum glycinate. Trace Elements and Electrolytes, 16 175-176 (1999).
- 3) 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).
- 4) Meshitsuka S., Yamazaki E., Inoue M., Hagino H., 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).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 11: 330-335 (2000).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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 to Cells	5(10)	823-837	2000
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)	373-382	2000
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
Sato,N, Imaizumi K, Manabe T, Taniguchi M, Hitomi J, Katayama T, Yoneda T, Morihara T, Yasuda Y, Takagi T, Kudo T, Tuda T, Itoyama Y, Makifuchi T, Fraser P, St George-Hyslop P, Tohyama M	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

20000750

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。