

20010929

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13年度 総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成14年(2002年)3月

目 次

I. 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・・・1
武田 雅俊

II. 分担研究報告書

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・・・12
武田 雅俊
2. アルミニウムなどの金属がアミロイド・プロトフィブリル形成に及ぼす影響・・・17
ーダイナミックなアルツハイマー病アミロイド・プロトフィブリル形成ー
大河内 正康
3. アルミニウムとストレス応答に関する研究・・・23
ーアルミニウムにより誘発されるスプライシング異常ー
遠山 正彌
4. アルミニウムに対する生体防御機構の研究・・・28
飯塚 舜介

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・33

IV. 研究成果の刊行物・別刷・・・35

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
平成13年度総括研究報告書

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教授

研究要旨

タウ蛋白アミノ酸変異における神経変性機序とアルミニウム神経毒性とに何らかの関わりがあるかどうかについて研究をおこなった。野生型および変異タウ遺伝子導入 PC12 細胞を用いて、アルミニウムによる神経細胞死、神経突起伸張、タウ蛋白リン酸化の程度について検討した。アルミニウムにより、NGF 分化後の PC12 細胞の神経細胞死が誘導されたが野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では R406W においてアルミニウム誘導性細胞死が多かった。NGF 分化誘導による神経突起伸張は野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞間では有意な差を認めなかったが、250 μ M アルミニウム/マルトールにより NGF 分化誘導による神経突起伸張は阻害され、またこの効果は変異タウ導入細胞で大きかった。野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では非刺激時において変異タウ導入細胞においてタウ蛋白リン酸化のレベルが高く、またアルミニウム刺激によって誘導されたタウ蛋白リン酸化の程度も変異タウ導入細胞において高かった。アルミニウム暴露と変異タウ蛋白とは神経突起伸張または軸索輸送のレベルで作用点と同じである可能性が示唆された。

次にアルツハイマー病・アミロイド β 仮説では“可溶性のアミロイド β 蛋白が不溶化していく過程にアルツハイマー病の病理過程の本体がある”と考えられている。このため、アミロイド β 蛋白の凝集の阻害あるいは分解促進などが治療薬開発のターゲットの一つとなっている。最近、アルツハイマー病アミロイド β 蛋白の不溶化および凝集過程にプロトフィブリルという中間段階が存在することが報告された。一方、アルミニウムなどの金属がアミロイド β 蛋白のフィブリル形成におよぼす影響あるいはアルミニウムなどの金属がアミロイド β 蛋白の神経毒性とどう関連するかについては検討が進んでいる。我々はアルツハイマー病の神経病理学的変化の形成過程に対してアルミニウムなどの重金属がどのような働きをもつか検討することを考えた。即ち、アルミニウムなどの金属がこのプロトフィブリル形成に関与するかどうか検討した。その結果、我々は1) アミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションすると約10nmの直径で長さが200nm以下のアミロイド・フィブリルの形成が認められるが、アミロイド・プロトフィブリルは形成されないこと、2) アミロイド・プロトフィブリルはアミロイド β 蛋白を1日間インキュベーションした時点で形成されていたが、アミロイド・フィブリル形成はアミロイド β 蛋白を4日間インキュベーションする間単調にされているように見えること、3) アルミニウムなどの金属イオンはアミロイド・プロトフィブリル形成を遅らせる働きがあること、4) アルミニウムはアミロイド・プロトフィブリル形成を阻害する可能性があることを明らかにした。

続いて、正常マウス腎臓においてアルミニウム排泄に関与する遺伝子を Differential display により検討した。23種類の特異的なバンドを確認した。6種類は未知の遺伝子だった。アストロサイトの初代培養細胞を用い、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ 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、クエン酸が観測された。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。一方、顆粒神経細胞との共培養を行うと、クエン酸は顆粒神経細胞に取り込まれた。神経細胞に対してアストログリア細胞はクエン酸を栄養源として供給していることが解った。アルミニウム等神経毒性のある金属を加えるとクエン酸の放出が阻害され、アストロサイトに対する毒性が神経細胞に及ぶことがうかがわれた。

さらに、これまでにアルミニウムは小胞体(ER)ストレストランスデューサー群の活性化を阻害して ER ストレス時、細胞を脆弱にしていることを明らかにしてきた。一方、我々は以前から孤発性アルツハイマー病患者の脳内において、プレセニリン2 (PS2) 遺伝子のエクソン5を欠いたスプライシング変種 (PS2V) が高頻度に発現していることを報告してきた。今回、PS2V 産生機構にアルミニウムが関与する可能性を探

る目的で検討を試みた。すなわち、PS2V は培養細胞では SK-N-SH 細胞に低酸素負荷することにより発現することを確認しているの、アルミニウム負荷単独、あるいはアルミニウム+低酸素負荷により PS2V の発現あるいは発現変化が見られるか否かについて検討した。その結果アルミニウム負荷単独では用量依存性は認められないものの明らかな PS2V の発現を確認した。我々は既に PS2 遺伝子 mRNA 前駆体のエクソン 5 上の特異的配列に HMG-I というタンパク質が発現誘導され結合するとエクソン 5 がスキップして PS2V が産生されることを突き止めている。そこでアルミニウムの HMG-I 誘導能についても検討したところ、上記 PS2V 発現条件において並行して HMG-I タンパク質の発現上昇を確認した。以上の結果から、アルミニウムは孤発性アルツハイマー病の発症の少なくとも増悪因子として関与する可能性が示唆された。

研究組織

分担研究者：大河内正康（大阪大学大学院
医学系研究科助手）

分担研究者：遠山 正弥（大阪大学大学院
医学系研究科教授）

分担研究者：飯塚 舜介（鳥取大学医学部
助教授）

A 研究目的

アルツハイマー病の病理過程においてタウ蛋白のリン酸化と自己重合に基づく神経原線維変化の形成は比較的下流に位置するものと考えられているが、1998 年このタウ遺伝子の変異によっても家族性痴呆症が引き起こされることが判明し、FTDP-17(Fronto-Temporal Dementia with Parkinsonism, linked with chromosome 17)と呼ばれている。そこで今回の研究では、タウ蛋白の遺伝子変異導入細胞でもアルミニウム暴露によって何らかの機能異常など差が見出せないかについて検討をおこなった。

次に、アルツハイマー病の神経病理学的変化の形成過程に対してアルミニウムなどの重金属がどのような働きをもつか検討することを考えた。最近、アルツハイマー病アミロイドβ蛋白の不溶化および凝集過程にプロトフィブリルという中間段階が存在することが報告された。不思議なことにこのプロトフィブリルは比較的ゆっくりと生成され、その後、急速に消失する。そしてその消失の後アミロイドフィブリルが形成されるという。一方、アルミニウムなどの金属がアミロイドβ蛋白のフィブリル形成におよぼす影響あるいはアルミニウムなどの金属がアミロイドβ蛋白の神経毒性とどう関連するかについては検討が進んでいる。しかし、この奇妙な中間段

階の形成・消失にアルミニウムなどの金属がどのような影響をおよぼすか報告はない。最近、北欧の家族性アルツハイマー病家系に新たなβAPP の点突然変異が見つかった。この突然変異型アミロイドβ蛋白はプロト・フィブリル形成が野生型のアミロイドβ蛋白と比較して極めて早く、しかしアミロイド・フィブリル形成自体には大きな差がないことが明らかになった。この結果は、Ab40/Ab42 比率の上昇という現象の下流にプロト・フィブリル形成の速度の上昇がある可能性を示唆している。以上の点を考慮して我々はアルミニウムなどの金属がこのプロトフィブリル形成に関与するかどうか検討することにした。

さらに、アルミニウムは生活環境中に極めて多く存在する。多くの用途を介してヒトはかなりの暴露を受けているにもかかわらず体内蓄積量は少なく、ほとんどが速やかに尿中に排泄されることが明らかになっている。また、単位時間当たりのアルミニウム尿中排泄量は一定、或いは上限値をもつという実験結果が得られている。しかし、過剰にアルミニウムを摂取した場合には排泄遅延がみられる。また、排泄能が低く体内に蓄積する症例が見つかった。このことは、腎にはアルミニウムの特異的な排泄機構が存在することを示唆している。そこで、アルミニウム排泄機構を解明することを考えた。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。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第二の目的とする。

最後に、昨年までに我々はアルミニウムが小胞体ストレストランスデューサーであるIRE1,ATF6,PERKなどの活性化を障害することによって分子シャペロン誘導減弱、タンパク質翻訳停止の抑制などを引き起こし、小胞体ストレスに対する生体の防御機構を攪乱し、細胞死を引き起こしやすくなっていることを報告してきた。一方、我々はADの大多数を占める孤発性AD (SAD) 患者脳においてプレセニリン2 (PS2) 遺伝子のエクソン5を欠くスプライシングバリエーション (PS2V) が高頻度に発現していることを見出し、その産生機構について詳細な解析を行ってきた^{1),2)}。このPS2Vは培養細胞に強制発現させると、発現した細胞は小胞体ストレスに対して脆弱になり、その際、上記IRE1の活性化が阻害されて分子シャペロンの誘導が減弱していることも明らかにした²⁾。また細胞外へ分泌されるA β 量も増加しており、明らかに孤発性アルツハイマー病の発症に関わることが強く示唆されている。

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³⁾すなわち小胞体ストレス応答性の低下を引き起こすメカニズムを明らかにすることである。そこでアルミニウムが前述のように小胞体ストレス応答性を低下させる PS2V 産生機構に関わっているか否かについて、アルミニウム単独による PS2V 産生能、低酸素刺激と組み合わせた PS2V 産生能、更には PS2mRNA 前駆体のエクソン5に結合してエクソン5をスキップさせてしまう HMG-1 の誘導能等の観点から検討を行い、アルミニウムによる PS2V 発現について詳細に検討を行った。

B 研究方法

ヒト野生型(Wt)タウ (最長型)、P301L(ヒト・タウ蛋白のコドン 301 番目 Pro を Leu に変異したもの)、R406W(ヒト・タウ蛋白のコドン 406 番目 Arg を Trp に変異したもの)をラット褐色細胞腫 PC12 細胞に強制発現させた細胞株 (Wt-PC12、P301L-PC12、R406W-PC12) (理化学研究所・高島明彦博士より供与)を 5% FCS (ウシ胎児血清)、5% HS (ウマ血清)を含む D-MEM 培地にて培養して実験をおこなった。

アルミニウムは 100mM 塩化アルミニウム/100mM マルトール混合溶液 (ストック溶液)を作成し、希釈のうえ 250 μM または 1mM の最終濃度にて培地に添加した。PC12 細胞の分化誘導は 10ng/ml NGF (Sigma より購入)を用いて実験した。

アルミニウム添加による細胞死のレベルは分化前の状態と分化処理 4 日後の状態とにおいて、250 μM 、500 μM 、1mM の最終濃度アルミニウム/マルトールを添加して、経時的に Live and Dead kit(Molecular Probe より購入)にて測定した。

10ng/ml NGF による分化誘導の影響については、NGF 添加 1 日後および 3 日後それぞれの PC12 細胞を位相差顕微鏡下で写真を取り、細胞あたりの神経突起数と、突起あたりの平均突起長について検討した。また、同様の実験を 250 μM アルミニウム/マルトールを 10ng/ml NGF と同時に添加しておこなった。

タウ蛋白のリン酸化への影響に関しては、PC12 細胞を 1mM の最終濃度アルミニウム/マルトールにて処理後 3 時間までの変化を検討した。細胞はバッファー (100 mM PIPES、pH6.8、2 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、5 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin、5 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin、0.1% Triton-X100) にて溶解し、その lysates を 200K x G にて遠心してその supernatant を得て、ウエスタンブロット解析をおこなった。抗体は、抗リン酸化タウ蛋白特異抗体 (PHF-1 (Ser396/404)(Dr. Davies P.より供与)、およびリン酸化非依存性のポリクローナル抗タウ蛋白抗体を用いて検討をおこなった。

アミロイド β 蛋白 (1-40) (Bachem 社から購入)を Hartley DM, 1999 らの方法

によりインキュベートしアミロイド・フィブリルを生成させた。

簡単に記すと、1mM NaOH で溶解後、酸性条件下のアミロイドβ蛋白にさらにアルカリ溶液を加えることにより急激に中性条件にし、バッファーを加えた後37度で決められた時間静置した。

インキュベーション終了後のサンプルはテーブルトップの遠心機でフル・スピード10分間遠心した後上清と沈査分画に分離した。

沈査分画は適度に水で薄めた後、炭素蒸着したグリッド上で乾燥させ、酢酸ウランを添加した後電子顕微鏡で観察した。

上清分画はサイズ・エクスクルージョン・カラム (SEC) Superdex 75 PC3.2/30 column (Amersham) で分離した。

ディファレンシャル ディスプレイ法によるmRNAの解析材料としては8週齢のICRマウスに1ヶ月間米のみをえさとして与えた。アルミニウム投与は、50mg Al/kgをクエン酸アルミニウム溶液として腹腔内1回投与した。投与後3日目の腎臓を採取した。

RNAの抽出はGuanidine-CsCl法で行った。プライマーはFluorescence Differential Display Kitを用いた。組み合わせはDownstream primer 6種類×Upstream primer 24種類の144通りを用いた。特異的なバンドはさらにPCRにより増幅し、高性能アガロースゲル電気泳動にて精製し、さらにExtended primerにて増幅した後塩基配列を決定した。

生後2~4日のマウスから脳を採取し細胞を分離した。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。アストロサイトの単一培養細胞を得た。培養液にアルミニウムグリシネートを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NMR測定試料とした。

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ NMRの測定はVarian Unity-500で行った。試料に10% D_2O を添加した。測定条件は pulse width=13.5 μs , 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。

細胞培養とストレス負荷についてヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞は10%FCSを含む α -MEM培地で培養した。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一過性にあるいは持続的に培地中に処理したあと、細胞を回収し、RNA抽出あるいはタンパク質抽出を行い後の実験に供した。

PS2Vの検出はPS2遺伝子のエクソン2とエクソン7を挟むプライマーを用いてRT-PCR方により検出した。HMG-Iタンパク質の検出は遠心により核分核を得た後、可溶化し、可溶化成分を定法に従ってHMG-Iの特異的な抗体でWesternプロットした。

C 研究結果

分化処理4日後の状態において、500 μM 、1mMのアルミニウム/マルトールを添加したところ、1mM添加時においてR406W-PC12細胞の細胞死が他の細胞より有意にて多かった(24時間後の細胞生存率は、Wt-PC12: 78 $\pm$ 7%、P301L-PC12: 73 $\pm$ 17%、R406W-PC12: 56 $\pm$ 5%)。

10ng/ml NGFによる分化誘導の影響については、NGF添加1日後および3日後それぞれのPC12細胞を位相差顕微鏡下で写真を取り、細胞あたりの神経突起数と、突起あたりの平均突起長について検討した。250 μM アルミニウム/マルトールを10ng/ml NGFと同時に添加しておこなったところ、神経突起数については細胞間での差が認められなかったが、神経突起長については変異タウ発現細胞において有意に抑制されていることがわかった(3日後の神経突起数は、Wt-PC12: 0.30 $\pm$ 0.10、P301L-PC12: 0.38 $\pm$ 0.12%、R406W-PC12: 0.36 $\pm$ 0.13%、3日後の神経突起長(1単位は平均細胞体長)は、P301L-PC12: 1.30 $\pm$ 0.20、P301L-PC12: 0.85 $\pm$ 0.16、R406W-PC12: 0.70 $\pm$ 0.18)。

タウ蛋白のリン酸化への影響を検討した

ところ、未分化 PC12 細胞を 1mM の最終濃度アルミニウム/マルトールにて 3 時間までの変化を検討したところ、まずアルミニウム未添加の時点で PHF-1 抗体での染色が強く、またアルミニウム添加によってどの細胞株も PHF-1 抗体による染色性が亢進したが、3 時間後における染色性のレベルは R406W-PC12、P301L-PC12、P301L-PC12 の順に高かった。また、リン酸化非依存性のポリクローナル抗タウ蛋白抗体を用いて同様の検討をおこなったが各サンプル間に染色性の大きな差はなく、タウ蛋白発現量はほぼ一定であった。よって、タウ蛋白の Ser396/404 部位におけるリン酸化レベルは変異タウの方がアルミニウム刺激前も後も亢進していることが示唆された。

アミロイド β 蛋白を 4 日間インキュベーションするとアミロイド・フィブリルの形成が認められた。

また、アミロイド・プロトフィブリルは電子顕微鏡で観察すると、約 10nm の直径で 200nm 以下であった。アミロイド・プロトフィブリルはアミロイド β 蛋白を 4 日間インキュベーションした場合形成されなかった。

アミロイド β 蛋白を 4 日間インキュベーションしてアミロイドフィブリルが形成されたとき、上清分画を SEC で分析すると素通り分画にアミロイド β 蛋白の凝集物は認められなかった。即ち、アミロイドプロトフィブリルは形成されていないことが明らかになった。そのため、我々はこのアミロイドフィブリルが生成される途中でアミロイドプロト・フィブリルは形成されていたかどうか検討した。

ところアミロイド・プロトフィブリルはアミロイド β 蛋白を 1 日間インキュベーションした時点で形成されていた。即ち、アミロイド β 蛋白を 4 日間インキュベーションしてアミロイドフィブリルが形成される過程で、4 日間毎日溶液の一部を抜き取り SEC により解析したところ、1 日後に加えたアミロイド β 蛋白が沈査分画に行かない程度に微妙に凝集し、カラムの素通り分画を含む高分子量ピークを形成した。おもしろいことにこの時、単量体のアミロイド β 蛋白はほとんど認められなかった。さ

らに不思議なことに 2 日後になりますと、この凝集物が完全に消失した。また、同時に単量体のアミロイド β 蛋白のピークが再び出現した。この結果は、アミロイド β 蛋白のフィブリル形成過程は単なる凝集の結果というよりは、凝集と溶解の混合したプロセスであることを示唆している。また、2 日後以降に再び現れた単量体のアミロイド β 蛋白の量が、それから後のインキュベーションの時間の経過により変化しない点も注目すべきであると考えられる。それでは、この間の沈査分画のフィブリル形成はどうなっているのか、次ぎに検討したところアミロイド・フィブリル形成はアミロイド β 蛋白を 4 日間インキュベーションする間単調に増加している。即ち、1 日後から 4 日後の沈査分画の検討では、上清中のダイナミックな凝集や溶解の過程を反映したような事態は起こらず、フィブリル形成が凝集過程が一方向的に進んでいる用に見えた。そしてやはり、今回も 4 日後にはほぼ完全なアミロイド β フィブリル形成が認められた。

それでは、SEC で素通りした高分子量のアミロイド・プロトフィブリルとはどのようなものなのか次に検討した。

SEC による検討でアミロイドの凝集による考えられるカラム素通りピークが認められたときの上清を電子顕微鏡で観察した。その結果、この部分には、直径 10nm で長さが 100nm 程度の細長い凝集物が認められた。大多数の直径 10nm で長さが 100nm 程度の細長い凝集物は単一で存在した。即ち、SEC で素通り分画にピークが認められたときの電子顕微鏡観察でアミロイド・プロトフィブリル形成が認められた。

続いて、このように複雑なアミロイド β 蛋白のアミロイドフィブリル形成にアルミニウムなどの金属がどのような影響を示すか検討した。

0.5mM のアミロイド β 蛋白に 3mM のアルミニウム、亜鉛そして銅イオンを加え最初は 4 日間今までに記したのと同じ条件で実験した。しかし、この場合 4 日後でもアミロイドフィブリル形成は認められず、代わりによりアモルファスな凝集物を認めた。そのため、インキュベーション時間を 8 日まで延長した。その結果、未成

熱なアミロイド・フィブリル様の凝集物を認めた。この傾向はアルミニウム、亜鉛、銅イオンで同じであった。このことから、これらの金属イオンにはアミロイド β 蛋白の凝集を遅らせる働きがあると考えられる。

次に、プロト・フィブリル形成はこれらの金属イオンによりどのような影響を受けるのか検討しました。アルミニウムを添加し1日目、2日目、4日目、6日目、8日目に電子顕微鏡で検討した。しかし、不思議なことに、我々はプロトフィブリル形成を確認できなかった。即ち、アルミニウムはアミロイド・プロトフィブリル形成を阻害する可能性がある。

Differential Display でアルミニウム投与マウスの腎臓で発現が亢進または低下していたバンドを38種類確認した。このうち13種類のバンドの塩基配列を決定することができた。特異的な発現を示した13種類の遺伝子のうち8種類はアルミニウム投与マウスで発現が亢進し、5種類は低下していた。

培養液中には lactate, alanine, acetate, pyruvate, glutamine, citrate の isotopomer が観測された。1H の 1D 測定から succinate, glutamate が放出されると報告されているが、我々が今回行った培養では、succinate, glutamate は全く検出されなかった。小脳アストロサイトの特徴は、大脳由来と比べて citrate の放出が極めて多いことであった。また、0.1mM Al-glycinate の存在で citrate の放出が抑制された。小脳顆粒神経細胞とアストロサイトの共培養においても同様に、lactate, alanine, (acetate, pyruvate,) glutamine, citrate の isotopomer が観測されたアストロサイトの単一培養と比べて、citrate の濃度が少なかった。顆粒神経細胞によって取り込まれたと考えられる。

まず、一過性アルミニウム添加の効果について検討した。即ち、低酸素刺激単独では刺激後 16-21 時間後回収した細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った際、本来増幅されるべき PS2 由来のバンドの下方に、すなわち低い分子量に PS2 エクソン 5 が欠失した長さのバンドが検出される。この PS2V のバンドを指標にアルミニウム単独

での PS2V の検出を試みた。アルミニウム 25,100,250 μ M 添加後 24 時間で用量依存性は認められないものの明らかに低酸素刺激により検出される位置に PS2V 由来のバンドを検出した。それではアルミニウムは低酸素刺激による PS2V 産生を増強するか否かを検討する目的で上記濃度のアルミニウム添加後低酸素刺激 12 時間、24 時間で PS2V の検出を試みた。その結果、通常低酸素 12 時間後では PS2V は検出されないにもかかわらず、アルミニウム添加によりどの濃度においても PS2V を検出した。しかも、この PS2V 濃度を反映するバンドの密度がアルミニウム単独によるそれをどの群においても上回っていたことからアルミニウムは低酸素刺激による PS2V 産生能を増強していると考えられた。

続いて持続的アルミニウム添加の効果について検討した。一過性アルミニウム添加によって低酸素刺激で見られるような PS2V 産生が認められたものの最大濃度である 250 μ M では低酸素刺激後 24 時間の PS2V 濃度が 25,100 μ M 群より著しく低かったこと、実際の生体内で暴露されるアルミニウム濃度を大きく逸脱していると考えられることなどから、我々は低濃度のアルミニウム刺激を持続的にを行い、より生理的条件に近づけ実験を行った。2.5,25 μ M アルミニウムを含む培地で 1、2 週間、1,2,3 ヶ月間培養した後、一過性負荷実験同様の操作を行い PS2V の検出を試みた。驚いたことにアルミニウム 3 ヶ月持続負荷した群では低酸素刺激 2 時間後から既に PS2V が検出され、その発現ピークは 4~6 時間と低酸素刺激単独の際の発現時間 (16-21 時間) を大きく短縮させた。

さらにアルミニウム添加による HMG-I タンパク質発現に及ぼす影響について検討した。PS2V は低酸素刺激によって誘導される HMG-I タンパク質が PS2mRNA 前駆体上のエクソン 5 に結合してエクソン 5 が脱落してしまうことが分かっている。アルミニウムが PS2V 産生を増強あるいは単独で PS2V 産生能を持つことから、アルミニウムによる HMG-I タンパク質の発現変化について検討した。予想通り、アルミニウム添加細胞から抽出した核分画においてアルミニウム非添加群に比べて HMG-I タ

ンパク質の濃度が上昇していることを Western ブロット法により確認した。

最後にアルミニウム添加による細胞死への影響について検討した。PS2V を強制発現させた細胞、あるいはアルミニウムを一過性に高濃度作用させた細胞においては小胞体ストレスに対して脆弱になっていることを既に報告している。今回得られたアルミニウム低濃度持続負荷による結果が実際に細胞死に反映されているか否かについて検討を行った。アルミニウム $25 \mu\text{M}$ 一過性添加群、持続的負荷群、マルトール $25 \mu\text{M}$ 持続的添加群にそれぞれ低酸素+小胞体ストレスであるツニカマイシン $2 \mu\text{g/ml}$ 刺激を行い、その後の細胞死の程度を培養液中に漏出する LDH を測定することにより評価した。アルミニウム持続負荷群では低酸素+Tm 刺激後 20 時間で明らかにマルトール持続負荷群に比べ細胞死が進んでいた。

D 考察

神経原線維変化を引き起こすも家族性痴呆症 FTDP-17 の原因であるタウ蛋白アミノ酸変異が引き起こす機能不全とアルミニウム添加によって生じる神経毒性機序とに何らかの接点がないかについて知るために、いくつかの検討をおこなった。

まず、アルミニウムにより、NGF 分化後の PC12 細胞の神経細胞死が誘導されたが野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では R406W においてアルミニウム誘導性細胞死が多かった点についてであるが、分化の前後のどちらにも細胞死が誘導されたにも関わらず、分化後においてのみ変異タウ蛋白導入細胞に細胞死数が多かったことは興味深い。神経突起伸張がおきたあとの何らかのメタボリズムにタウ蛋白変異とアルミニウム毒性の両者が関わって、細胞死を増加させたことが考えられる。

次に、神経細胞突起伸張に関する検討であるが、 $250 \mu\text{M}$ のアルミニウム/マルトールを持続的に添加してどのような神経突起伸張の遅延が認められるかどうかについて観察した。結果としては、 $250 \mu\text{M}$ のアルミニウム/マルトールにより NGF 分化誘導による神経突起伸張は阻害され、またこの効果は変異タウ導入細胞で大きかった。

この結果も、タウ蛋白変異とアルミニウム暴露がともに軸索輸送障害作用をおこした可能性が最も高いもののように考えられる。免疫染色による検討も併せておこなったが、チューブリン、ニューロフィラメント、タウ蛋白の各染色性は細胞間において大きな差異は認められなかった。今後、以前の報告と同様のパルス刺激によってどのような変化があるかを検討したいと考えている。

最後に、野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では非刺激時において変異タウ導入細胞においてタウ蛋白リン酸化のレベルが高く、またアルミニウム刺激によって誘導されたタウ蛋白リン酸化の程度も変異タウ導入細胞において高かった点であるが、アルミニウムとリン酸化タウ蛋白増加に関しては、仮説としてはアルミニウムがプロテインフォスファターゼの機能を阻害している可能性と一度リン酸化されたタウ蛋白へのプロテインフォスファターゼのアクセスをアルミニウムが阻害する可能性が今までに提唱されている。また、変異タウ蛋白のリン酸化レベルが亢進していたことに関しては、変異によるコンフォーメーション変化からプロテインキナーゼとプロテインフォスファターゼとのアクセスが変化して結果としてリン酸化が亢進していた可能性などが主に考えられる。

アルミニウムや亜鉛は老人斑に蓄積が認められている。また、銅イオンはアミロイド β 蛋白に直接結合し活性酸素を介した毒性の発現に関連があるとされている。今回の結果は、アルミニウムなどの金属がプロトフィブリル形成を阻害し、フィブリル形成を遅延させることを示唆している。しかし、今回の検討では加えた金属イオンの濃度が高すぎたのかもしれない。我々は、引き続きアミロイド β 蛋白のプロトフィブリル形成、フィブリル形成、細胞毒性とアルミニウムなどの金属イオンとの関連についてさらに検討を続けることを希望している。

腎臓における特異的なアルミニウム排泄機構を検討した報告はほとんどない。これまでにアルミニウムの毒性については、透析痴呆やアルツハイマー病が知られている。

アルミニウムはトランスフェリントと結合し、血液脳関門を通り脳内で毒性を示すと考えられている。腎臓において、このようにアルミニウムと結合するタンパク質を探る上でも今回の方法は有用であると考えられる。今後はリアルタイム PCR を用いて、発現量に差があると思われる遺伝子についてさらに検討を行う予定である。

中枢神経系において citrate がどのような役割をしているのか明らかにされていない。三塩基酸であることから、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} などの2価金属イオンの調節をしていると予想されているが、よく解っていない。脳脊髄液中には、citrate がほぼ一定の濃度に保たれている。ミトコンドリアの TCA 回路で生成されて細胞外に放出されているが、小脳アストロサイトが citrate 濃度の調節に重要な役割をしていることがうかがわれた。大脳皮質から採取したアストロサイトでは、citrate の放出は観測されるが、極めて僅かな量であった。脳内の代謝物を通した細胞間の相互作用について、NMR を用いた研究がなされてきたが、混合系のスペクトルはにおいて DQCOSY、HSQC が有効であることが解った。

クエン酸のシグナルはアルミニウム 0.1mM 添加時には極僅かしか観測されなかった。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。

我々はこれまでに、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を明らかにし、この小胞体ストレス応答機構の障害はFADにおけるPSI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小胞体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。そこで本研究ではアルミニウムが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検討を行った。その結果、一過性のアルミニウム負荷が低酸素刺激と

同様の刺激となってPS2V産生を引き起こし、持続的アルミニウム負荷は低酸素刺激と同様の刺激となるばかりではなく、低酸素刺激によるPS2V産生を促進していた。このことはアルミニウムが生体内に存在するとPS2Vが増加してくるので低酸素刺激などのストレスに加え小胞体ストレスに対して感受性が亢進することを示している。しかも、持続負荷で検討したアルミニウム濃度はわずか2.5 μM であり、生体に取り込まれてもアルミニウム毒性を引き起こさない濃度であると思われる。今後の検討課題として、低酸素負荷とアルミニウム負荷がともにHMG-Iの誘導を促して、PS2V産生につながることから、アルミニウム負荷（さらには他の金属イオン）によってHMG-Iを誘導する機構について明らかにすることによって孤発性アルツハイマー病を発症させる真の因子が同定できるか可能性を示唆している。候補としては、PS2V産生がいくつかの抗酸化剤、ラジカルスカベンジャーによって抑制されることからある種の酸化ストレスが関わっていることは間違いない。アルミニウムやその他の金属が引き起こす酸化ストレスが分子生物学的にどのようなメカニズムを介して生体に伝えられていくのか興味を持たれる。

E 結論

アルミニウムによる神経細胞死は、R406W 変異タウ導入において多かった。また、250 μM アルミニウム/マルトールにより NGF 分化誘導による神経突起伸張阻害作用は、変異タウ導入細胞で大きかった。そして、タウ蛋白リン酸化のレベルはアルミニウム添加により亢進し、その程度も変異タウ導入細胞において高かった。アルミニウム暴露と変異タウ蛋白とは神経突起伸張または軸索輸送のレベルで作用点が同じである可能性が示唆された。

アルミニウムなどの金属イオンはアミロイド・プロトフィブリル形成を遅らせる働きがあること、および、アルミニウムはア

ミロイド・プロトフィブリル形成を阻害する可能性があることを明らかにした。このメカニズムについて詳細に検討することが今後の課題であると思われる。

正常マウス腎臓においてアルミニウム排泄に関与する遺伝子を Differential display により検討した結果6種類の未知の遺伝子を確認した。

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。

アルミニウムが孤発性アルツハイマー病患者に特異的に見られる PS2V 産生機構を促進し、あるいは自ら関わり、PS2V を産生することを明らかにした。PS2V 産生に関わるアルミニウム濃度は過去にアルミニウムの生体に対する影響を調べられた濃度よりはるかに低濃度で生理的範囲に入っていた。アルミニウムがどのようなメカニズムで HMG-I を誘導しているのかを調べるのが今後の課題であると思われる。

F 研究発表

1. 論文発表

Fukusyo, E., Nakamura, Y., Kashiwagi, Y., Kudo, T., Tanaka, T., Matsumoto, N., Kida, T., Nakano, Y., Shinosaki, K. Takeda, M. Effects of presenilin 1 missense mutation and aluminum on early neuronal development of mouse brain. Psychogeriatrics 1,126-132, 2001.

Takeda, M., Tanaka, T., Arai, H., Sasaki, H., Shoji, M., Okamoto, K., Urakami, K., Nakashima, K., Matshubayashi, T., Sugita, M., Yoshida, H. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi study in Japan. Psychogeriatrics 1,56-63,2001.

田中稔久、武田雅俊 シリーズ精神医学用語解説 タウオパチー、臨床精神医学 30,80-82,2001.

田中稔久、武田雅俊 文献抄録「アミ

ロイド β ペプチドの免疫はアルツハイマー病モデルマウスの行動障害および老人斑を減少させる」「変異タウ蛋白(P301L)を発現するマウスにおける神経原線維変化、筋萎縮、進行性運動障害」 老年精神医学雑誌 12, 305, 2001.

田中稔久、山森英長、和田健二、辻尾一郎、工藤喬、中村祐、柏木雄次郎、車谷隆宏、田上真次、森裕、小池裕子、神野由華、松本均彦、瀬川優子、福所英理子、武田雅俊 一次変性痴呆治療のためのタウ蛋白重合阻害についての研究 精神薬療研究年報 33,2-10,2001

田中稔久、武田雅俊 タウ蛋白の異常リン酸化機構 先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患 杉田秀夫、福内靖男、柴崎浩監修 先端医療技術研究所 190-194,2001

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).

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).

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).

井上 仁、長谷川伸作、陶山昭彦、飯塚舜介：動的グラフ表示と注意警報発令機能を組み込んだ感染症情報システムの開発。医療情報学 21: 575-576 (2001).

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: 528-534 (2001).

Meshitsuka, S., Koeda, T., Hara, T., Takeshita, K.: Abnormal aluminum metabolism in two siblings with progressive CNS calcification. Developmental Medicine and Neurology and

Clinics in Developmental Medicine
Developmental Medicine & Child Neurology
43: 286-288 (2001).

飯塚舜介, 富永里香, 疋田 純, 井上 仁,
David A. Aremu: 3D-DOSY-COSY 法による
マウス脳内代謝物の拡散係数の測定. 日
本磁気共鳴医学会雑誌 supp 277(2001).

2. 学会発表

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊
チウムによるタウ蛋白のリン酸化誘導 第 21 回日本
チウム研究会 2001.04.21 東京経団連会館

Yamamori H., Tanaka T., and Takeda M.
Changes of Phosphorylation Level of Tau
Protein in Cultured Cells by Cytotoxic
Reagents. 5th International Conference on
Progress in Alzheimer's and Parkinson's
Disease (ADPD 2001), 2001.03.31-04.05.,
Kyoto International Conference Hall (KICH).

Tanaka T., Yamamori H., Wada K.,
Nakashima K. and Takeda M.
Phosphorylation of Tau Protein in Cultured
Cells by Polyinosinic-Polycytidylic Acid. 5th
International Conference on Progress in
Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD
2001), 2001.03.31-04.05., Kyoto International
Conference Hall (KICH).

田中稔久、山森英長、和田健二、中
島健二、武田雅俊 2本鎖 RNA による
タウ蛋白リン酸化への影響の検討 第 42
回日本神経学会総会 2001.5.11-13、東京
国際展示場（東京ビッグサイト）

和田健二、田中稔久、中島健二、武
田雅俊 Ribotoxic stress 応答におけるタ
ウ蛋白リン酸化の検討 第 42 回日本神経
学会総会 2001.5.11-13、東京国際展示場
（東京ビッグサイト）

Takeda M., Tanaka T, Arai H, Sasaki H,
Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima
K, Katsubayashi T, Sugita M, Yoshida H.
Basic and clinical studies on the measurement
of β -amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as
a diagnostic marker for Alzheimer's disease
and related disorders: Multi center study in
Japan. (Abst.) Tenth Congress of the

International Psychogeriatric Association
Sept, 9-13, 2001. (Nice in France)

Tanaka T, Yamamori H, Takeda M
Effects of lithium on phosphorylation levels
of tau protein (Abst.) Tenth Congress of the
International Psychogeriatric Association
Sept, 9-13, 2001. (Nice in France)

田中稔久、和田健二、山森英長、武
田雅俊 アルツハイマー病のリン酸化調
節異常 第 44 回日本神経化学・第 24 回
日本神経科学合同大会 (Neuro2001)、
2001.9.26、京都国際会議場

田中稔久、山森英長、和田健二、中
島健二、武田雅俊 タウ蛋白リン酸化と
結合蛋白 第 20 回日本痴呆学会、2001.10.4
アスト津（三重県）

和田健二、田中稔久、浦谷陽介、浦
上克哉、山形薫、中島健二、武田雅俊 酸
化ストレスによるタウ蛋白リン酸化の検
討 第 20 回日本痴呆学会、2001.10.4 アス
ト津（三重県）

山森英長、田中稔久、武田雅俊 カスパ
ーゼ阻害とタウ蛋白リン酸化について 第
20 回日本痴呆学会、2001.10.4 アスト津（三
重県）

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修
二、鈴木英雄、工藤喬、紙野晃人、大河内
正康、谷井久志、小池裕子、安田由華、貴
田智之、松本均彦、福森亮雄、武田雅俊
タウ蛋白重合蓄積への結合因子の関与とそ
の阻害剤開発についての 第 34 回精
神神経系薬物治療研究報告会、2001.12.7、
千里ライフサイエンスセンター

飯塚舜介, 疋田 純, 富永里香, 井上 仁,
David A. Aremu. 小脳アストログリア細胞
の代謝と機能. 第 40 回 NMR 討論会予稿
集 290 (2001).

富永里香, 疋田 純, David A. Aremu, 井
上 仁, 難波栄二, 飯塚舜介: Differential
Display を用いた腎におけるアルミニウム
排泄機構の解明. 第 24 回日本分子生物学

会年会講演要旨集 844 (2001).

Meshitsuka, S. Tominaga, L. Hikita, J. Inoue, J.
Aremu, D.A., Matsushima, F: Intake,
metabolism and excretion of aluminum:

Proceedings Book of 3rd International
Symposium on Trace Elements in Human: New
Perspectives. 801-808 (2001).

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

研究課題名：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
(分担研究課題名：遺伝子変異動物を用いたアルミニウム神経毒性の研究)

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

タウ蛋白変異による家族性痴呆症として FTDP-17 が知られているが、このタウ蛋白アミノ酸変異における神経変性機序とアルミニウム神経毒性とに何らかの関わりがあるかどうかについて研究をおこなった。野生型および変異タウ遺伝子導入 PC12 細胞を用いて、アルミニウムによる神経細胞死、神経突起伸張、タウ蛋白リン酸化の程度について検討した。アルミニウムにより、NGF 分化後の PC12 細胞の神経細胞死が誘導されたが野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では R406W においてアルミニウム誘導性細胞死が多かった。NGF 分化誘導による神経突起伸張は野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞間では有意な差を認めなかったが、250 μ M アルミニウム/マルトールにより NGF 分化誘導による神経突起伸張は阻害され、またこの効果は変異タウ導入細胞で大きかった。野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では非刺激時において変異タウ導入細胞においてタウ蛋白リン酸化のレベルが高く、またアルミニウム刺激によって誘導されたタウ蛋白リン酸化の程度も変異タウ導入細胞において高かった。アルミニウム暴露と変異タウ蛋白とは神経突起伸張または軸索輸送のレベルで作用点が同じである可能性が示唆された。

A. 研究目的

高齢化社会になる現在、アルツハイマー病(AD)などの痴呆性疾患への対策は重要な課題である。しかし、その発症機序の分子メカニズムについては不明な点が多く、根本的治療法は存在しない。自然界に豊富に存在するアルミニウムがアルツハイマー病の原因ではないかという仮説が存在する。1965 年に Klatzo らはウサギ脳にアルミニウムを注入し、実験的神経原線維変化を作成した。その後、1972 年に Alfrey らは腎不全透析患者において痴呆が発生する（透析痴呆）ことを報告し、さらに 1976 年には透析痴呆の原因は、透析に使用した水道水や薬剤中のアルミニウムが原因であり、脳内にアルミニウムが蓄積することであると報告された。また、1989 年にマーチンらは飲料水中のアルミニウム濃度とアルツハイマー病患者発生に相関関係があるとする疫学調査を報告した。アルミニウムの神経毒性及び疫学調査結果に基づき、アルミニウムは危険因子（リスクファクター）であるとする仮説が報告された。しかし、このようにアルミニウム

がアルツハイマー病の原因であるという仮説に対しては反論も多い。ある一定の濃度以上ではアルミニウムに神経毒性があるということまでは確立されているが、それがどのような機序によるものであるのか、通常の食事・飲料水摂取におけるアルミニウム暴露によってアルツハイマー病が発症するのかについては未解明のままである。

これまで、この分担研究では遺伝子変異動物を用いたアルミニウム神経毒性の研究をおこなってきた。昨年度までは家族性 AD の原因遺伝子として 1995 年に同定されたプレセニリンの変異導入マウス (Ile213Thr) をもちいて、実験をおこなってきた。得られた結論からは、胎生期におけるアルミニウム暴露によってプレセニリン変異マウスは正常マウスよりも神経細胞の発達異常が出現するということであり、プレセニリン変異はアルミニウムへの脆弱性をあげるというものであった。ただし、この変化については解釈が難しく、理由はプレセニリン変異はアルツハイマー病の病理過程において比較的上流に位置するものであり、その

ため様々な下流の方向に影響が及ぶためと考えられた。アルツハイマー病の病理過程においてタウ蛋白のリン酸化と自己重合に基づく神経原線維変化の形成は比較的下流に位置するものと考えられているが、1998年このタウ遺伝子の変異によっても家族性痴呆症が引き起こされることが判明し、FTDP-17(Fronto-Temporal Dementia with Parkinsonism, linked with chromosome 17)と呼ばれている。タウ蛋白は微小管付随蛋白質のひとつであり、チューブリンが重合して微小管を構成する際の促進因子として機能する。エクソン内での変異によるアミノ酸置換ではタウ蛋白の微小管結合能および微小管重合能が低下するものが多いことが示されており、これにより神経細胞障害が生じるものと推定される。ただし、このような神経細胞障害は単に変異タウ蛋白を強制発現した細胞ではなかなか観察されないことも知られている。そこで、アルミニウムによる神経毒性機序とこのようなタウ蛋白アミノ酸変異の影響とは相加的に影響するかどうかについて興味を持たれるところである。実際今までに *in vitro* の実験においてアルミニウムによってタウ蛋白は aggregation が誘導されること、アルミニウムによって培養細胞内のタウ蛋白リン酸化が亢進することなどは報告がある。そこで今回の研究では、タウ蛋白の遺伝子変異導入細胞でもアルミニウム暴露によって何らかの機能異常など差が見出せないかについて検討をおこなった。

B. 研究方法

ヒト野生型(Wt)タウ(最長型)、P301L(ヒト・タウ蛋白のコドン 301 番目 Pro を Leu に変異したもの)、R406W(ヒト・タウ蛋白のコドン 406 番目 Arg を Trp に変異したもの)をラット褐色細胞腫 PC12 細胞に強制発現させた細胞株(Wt-PC12、P301L-PC12、R406W-PC12)(理化学研究所・高島明彦博士より供与)を 5% FCS(ウシ胎児血清)、5% HS(ウマ血清)を含む D-MEM 培地にて培養して実験をおこなった。

アルミニウムは 100mM 塩化アルミニウム/100mM マルトール混合溶液(ストック溶液)を作成し、希釈のうえ 250 μ M または 1mM の最終濃度にて培地に添加した。PC12 細胞の分化誘導は 10ng/ml NGF(Sigma より購入)を用いて実験した。

アルミニウム添加による細胞死のレベルは分化前の状態と分化処理 4 日後の状態において、250 μ M、500 μ M、1mM の最終濃度アルミニウム/マルトール

を添加して、経時的に Live and Dead kit(Molecular Probe より購入)にて測定した。

10ng/ml NGF による分化誘導の影響については、NGF 添加 1 日後および 3 日後それぞれの PC12 細胞を位相差顕微鏡下で写真を取り、細胞あたりの神経突起数と、突起あたりの平均突起長について検討した。また、同様の実験を 250 μ M アルミニウム/マルトールを 10ng/ml NGF と同時に添加しておこなった。

タウ蛋白のリン酸化への影響に関しては、PC12 細胞を 1mM の最終濃度アルミニウム/マルトールにて処理後 3 時間までの変化を検討した。細胞はバッファー(100 mM PIPES、pH6.8、2 mM MgCl₂、0.1 mM EDTA、1 mM EGTA、25 mM NaF、1 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、5 μ g/ml aprotinin、5 μ g/ml leupeptin、0.1% Triton-X100)にて溶解し、その lysates を 200K x G にて遠心してその supernatant を得て、ウエスタンブロット解析をおこなった。抗体は、抗リン酸化タウ蛋白特異抗体(PHF-1 (Ser396/404)(Dr. Davies P. より供与)、およびリン酸化非依存性のポリクローナル抗タウ蛋白抗体を用いて検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を用いた実験であるので、特に倫理面への配慮は必要としていない。

C. 研究結果

アルミニウム添加による細胞死のレベルをおこなったところ、250 μ M アルミニウム/マルトールでは 24 時間内に細胞死数の上昇は認められなかった。次に分化前の状態では 500 μ M と 1mM アルミニウム/マルトールで細胞死の上昇は認められたが、どちらの濃度においても細胞株間(Wt-PC12、P301L-PC12、R406W-PC12)における有意な細胞死レベルの変化は認められなかった。分化処理 4 日後の状態において、500 μ M、1mM のアルミニウム/マルトールを添加したところ、1mM 添加時において R406W-PC12 細胞の細胞死が他の細胞より有意にて多かった(24 時間後の細胞生存率は、Wt-PC12 : 78 $\pm$ 7 %、P301L-PC12 : 73 $\pm$ 17 %、R406W-PC12 : 56 $\pm$ 5 %)。

10ng/ml NGF による分化誘導の影響については、NGF 添加 1 日後および 3 日後それぞれの PC12 細胞を位相差顕微鏡下で写真を取り、細胞あたりの神経突起数と、突起あたりの平均突起長について検討したところ、突起数および突起長ともに細胞株間(Wt-PC12、P301L-PC12、R406W-PC12)では有意な差が認められなかった(3 日後の神経突起数は、Wt-PC12 : 1.32 $\pm$ 0.35、

P301L-PC12: $1.21 \pm 0.38\%$ 、R406W-PC12: $0.98 \pm 0.43\%$ 、3日後の神経突起長（1単位は平均細胞体長）は、Wt-PC12: 2.55 ± 0.25 、P301L-PC12: 2.52 ± 0.33 、R406W-PC12: 2.67 ± 0.28 。また、同様の実験を $250 \mu\text{M}$ アルミニウム/マルトールを 10ng/ml NGF と同時に添加しておこなったところ、神経突起数については細胞間での差が認められなかったが、神経突起長については変異タウ発現細胞において有意に抑制されていることがわかった（3日後の神経突起数は、Wt-PC12: 0.30 ± 0.10 、P301L-PC12: $0.38 \pm 0.12\%$ 、R406W-PC12: $0.36 \pm 0.13\%$ 、3日後の神経突起長（1単位は平均細胞体長）は、P301L-PC12: 1.30 ± 0.20 、P301L-PC12: 0.85 ± 0.16 、R406W-PC12: 0.70 ± 0.18 ）。

タウ蛋白のリン酸化への影響を検討したところ、未分化 PC12 細胞を 1mM の最終濃度アルミニウム/マルトールにて3時間までの変化を検討したところ、まずアルミニウム未添加の時点で PHF-1 抗体での染色が強く、またアルミニウム添加によってどの細胞株も PHF-1 抗体による染色性が亢進したが、3時間後における染色性のレベルは R406W-PC12、P301L-PC12、P301L-PC12 の順に高かった。また、リン酸化非依存性のポリクローナル抗タウ蛋白抗体を用いて同様の検討をおこなったが各サンプル間に染色性の大きな差はなく、タウ蛋白発現量はほぼ一定であった。よって、タウ蛋白の Ser396/404 部位におけるリン酸化レベルは変異タウの方がアルミニウム刺激前も後も亢進していることが示唆された。

D. 考察

神経原線維変化はアルツハイマー病の病理学的特徴のひとつであるが、それを構成するリン酸化タウ蛋白の生成機序については不明な点が多い。アポトーシスによって単に神経細胞死を誘導すると逆にタウ蛋白は脱リン酸化することから(Tsujio, I., et al. FEBS Lett 469,111-117,2000.)、タウ蛋白のリン酸化にともなう細胞死の機序を知ることは、アルツハイマー病の発症メカニズムの探求において重要と考えられる。今回の実験は、神経原線維変化を引き起こすも家族性痴呆症 FTDP-17 の原因であるタウ蛋白アミノ酸変異が引き起こす機能不全とアルミニウム添加によって生じる神経毒性機序とに何らかの接点がないかについて知るために、いくつかの検討をおこなった。

まず、アルミニウムにより、NGF 分化後の PC12 細胞の神経細胞死が誘導されたが野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では R406W におい

てアルミニウム誘導性細胞死が多かった点についてであるが、分化の前後のどちらにも細胞死が誘導されたにも関わらず、分化後においてのみ変異タウ蛋白導入細胞に細胞死数が多かったことは興味深い。可能性としては、神経突起伸張がおきたあとの何らかのメタボリズムにタウ蛋白変異とアルミニウム毒性の両者が関わって、細胞死を増加させたことが考えられる。タウ蛋白は軸索輸送のコンポーネントのひとつであり、アルミニウムの軸索輸送障害作用も知られており、ひとつの接点と考えられるからである。

次に、神経細胞突起伸張に関する検討であるが、この実験は今までの我々の検討(Kashiwagi Y., et al. Neurosci Lett 252,5-8,1998)を参考にしておこなわれた。この検討ではラット初代神経培養において培養開始後6時間において一時的に $250 \mu\text{M}$ のアルミニウム/マルトールに暴露させると神経突起伸張そのものは大きな変化が認められないが、ニューロフィラメントを含むコンポーネントの輸送は遅延することが報告している。今回の検討はまず、 $250 \mu\text{M}$ のアルミニウム/マルトールを持続的に添加してどのような神経突起伸張の遅延が認められるかどうかについて観察した。結果としては、 $250 \mu\text{M}$ のアルミニウム/マルトールにより NGF 分化誘導による神経突起伸張は阻害され、またこの効果は変異タウ導入細胞で大きかった。この結果も、タウ蛋白変異とアルミニウム暴露がともに軸索輸送障害作用をおこした可能性が最も高いもののように考えられる。免疫染色による検討も併せておこなったが、チューブリン、ニューロフィラメント、タウ蛋白の各染色性は細胞間において大きな差異は認められなかった。今後、以前の報告と同様のパルス刺激によってどのような変化があるかを検討したいと考えている。

最後に、野生型、P301L、R406W のタウ蛋白導入細胞の中では非刺激時において変異タウ導入細胞においてタウ蛋白リン酸化のレベルが高く、またアルミニウム刺激によって誘導されたタウ蛋白リン酸化の程度も変異タウ導入細胞において高かった点であるが、アルミニウムとリン酸化タウ蛋白増加に関しては、仮説としてはアルミニウムがプロテインフォスファターゼの機能を阻害している可能性と一度リン酸化されたタウ蛋白へのプロテインフォスファターゼのアクセスをアルミニウムが阻害する可能性が今までに提唱されている。また、変異タウ蛋白のリン酸化レベルが亢進していたことに関しては、変異によるコンフォメーション変化からプロテインキナーゼとプ

ロテインフォスファターゼとのアクセスが変化して結果としてリン酸化が亢進していた可能性などが主に考えられる。ただし、今回の検討だけではその機序は明確ではないので、今後いくつかの酵素阻害剤を併せて添加してその変化をみる実験などが必要と考えられる。

E. 結論

野生型および変異タウ遺伝子導入PC12細胞を用いて、アルミニウムによる神経細胞死、神経突起伸張、タウ蛋白リン酸化の程度について検討した。アルミニウムによる神経細胞死は、R406W 変異タウ導入において多かった。また、NGF 分化誘導による神経突起伸張はタウ蛋白導入細胞間では有意な差を認めなかったが、250 μ M アルミニウム/マルトールによりNGF 分化誘導による神経突起伸張阻害作用は、変異タウ導入細胞で大きかった。そして、タウ蛋白リン酸化のレベルはアルミニウム添加により亢進し、その程度も変異タウ導入細胞において高かった。アルミニウム暴露と変異タウ蛋白とは神経突起伸張または軸索輸送のレベルで作用点と同じである可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukusyo, E., Nakamura, Y., Kashiwagi, Y., Kudo, T., Tanaka, T., Matsumoto, N., Kida, T., Nakano, Y., Shinosaki, K. and Takeda, M. Effects of presenilin 1 missense mutation and aluminum on early neuronal development of mouse brain. *Psychogeriatrics* 1,126-132, 2001.

Takeda, M., Tanaka, T., Arai, H., Sasaki, H., Shoji, M., Okamoto, K., Urakami, K., Nakashima, K., Matshubayashi, T., Sugita, M., Yoshida, H. Basic and clinical studies on the measurement of β -amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid as a diagnostic marker for Alzheimer's disease and related disorders: Multi study in Japan. *Psychogeriatrics* 1,56-63,2001.

田中稔久、武田雅俊 シリーズ精神医学用語

解説 タウオパチー、臨床精神医学 30,80-82,2001.

田中稔久、武田雅俊 文献抄録「アミロイド β ペプチドの免疫はアルツハイマー病モデルマウスの行動障害および老人斑を減少させる」「変異タウ蛋白(P301L)を発現するマウスにおける神経原線維変化、筋萎縮、進行性運動障害」老年精神医学雑誌 12, 305, 2001.

田中稔久、山森英長、和田健二、辻尾一郎、工藤喬、中村祐、柏木雄次郎、車谷隆宏、田上真次、森裕、小池裕子、神野由華、松本均彦、瀬川優子、福所英理子、武田雅俊 一次変性痴呆治療のためのタウ蛋白重合阻害についての研究 精神薬療研究年報 33,2-10,2001

田中稔久、武田雅俊 タウ蛋白の異常リン酸化機構 先端医療シリーズ 14 神経・筋疾患 杉田秀夫、福内靖男、柴崎浩監修 先端医療技術研究所 190-194,2001

2. 学会発表

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊 リチウムによるタウ蛋白のリン酸化誘導 第21回リチウム研究会 2001.04.21 東京経団連会館

Yamamori H., Tanaka T., and Takeda M. Changes of Phosphorylation Level of Tau Protein in Cultured Cells by Cytotoxic Reagents. 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD 2001), 2001.03.31-04.05., Kyoto International Conference Hall (KICH).

Tanaka T., Yamamori H., Wada K., Nakashima K. and Takeda M. Phosphorylation of Tau Protein in Cultured Cells by Polyinosinic-Polycytidylic Acid. 5th International Conference on Progress in Alzheimer's and Parkinson's Disease (ADPD 2001), 2001.03.31-04.05., Kyoto International Conference Hall (KICH).

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、武田雅俊 2本鎖RNAによるタウ蛋白リン酸化への影響の検討 第42回日本神経学会総会 2001.5.11-13、東京国際展示場（東京ビッグサイト）

和田健二、田中稔久、中島健二、武田雅俊 Ribotoxic stress 応答におけるタウ蛋白リン酸化

の検討 第 42 回日本神経学会総会
2001.5.11-13、東京国際展示場（東京ビッグサイ
ト）

Takeda M., Tanaka T, Arai H, Sasaki H,
Shoji M, Okamoto K, Urakami K, Nakashima
K, Katsubayashi T, Sugita M, Yoshida H.
Basic and clinical studies on the measurement
of β -amyloid (1-42) in cerebrospinal fluid as a
diagnostic marker for Alzheimer's disease and
related disorders : Multi center study in Japan.
(Abst.) Tenth Congress of the International
Psychogeriatric Association Sept, 9-13, 2001.
(Nice in France)

Tanaka T, Yamamori H, Takeda M
Effects of lithium on phosphorylation levels of
tau protein (Abst.) Tenth Congress of the
International Psychogeriatric Association
Sept, 9-13, 2001. (Nice in France)

田中稔久、和田健二、山森英長、武田雅俊 ア
ルツハイマー病のリン酸化調節異常 第 44 回日
本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会
(Neuro2001)、2001.9.26、京都国際会議場

田中稔久、山森英長、和田健二、中島健二、
武田雅俊 タウ蛋白リン酸化と結合蛋白 第 20 回
日本痴呆学会、2001.10.4 アスト津（三重県）

和田健二、田中稔久、涌谷陽介、浦上克哉、
山形薫、中島健二、武田雅俊 酸化ストレスによ
るタウ蛋白リン酸化の検討 第 20 回日本痴呆学会、
2001.10.4 アスト津（三重県）

山森英長、田中稔久、武田雅俊 カスパーゼ
阻害とタウ蛋白リン酸化について 第 20 回日本痴
呆学会、2001.10.4 アスト津（三重県）

田中稔久、山森英長、和田健二、田中修二、
鈴木英雄、工藤喬、紙野晃人、大河内正康、谷井
久志、小池裕子、安田由華、貴田智之、松本均彦、
福森亮雄、武田雅俊 タウ蛋白重合蓄積への
結合因子の関与とその阻害剤開発についての
第 34 回精神神経系薬物治療研究報告会、
2001.12.7、千里ライフサイエンスセンター

3. その他
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

アルミニウムなどの金属がアミロイド・プロトフィブリル形成に及ぼす影響

ーダイナミックなアルツハイマー病アミロイド・フィブリル形成ー

分担研究者：大河内正康（大阪大学大学院医学系研究科

プロセッシング異常疾患分野）

研究要旨

アルツハイマー病・アミロイドβ仮説では、“可溶性のアミロイドβ蛋白が不溶化していく過程にアルツハイマー病の病理過程の本体がある”と考えられている。このため、アミロイドβ蛋白の凝集の阻害あるいは分解促進などが治療薬開発のターゲットの一つとなっている。最近、アルツハイマー病アミロイドβ蛋白の不溶化および凝集過程にプロトフィブリルという中間段階が存在することが報告された。不思議なことにこのプロトフィブリルは比較的ゆっくりと生成され、その後、急速に消失する。そしてその消失の後アミロイドフィブリルが形成されるという。一方、アルミニウムなどの金属がアミロイドβ蛋白のフィブリル形成におよぼす影響、あるいはアルミニウムなどの金属がアミロイドβ蛋白の神経毒性とどう関連するかについては検討が進んでいる。しかし、この奇妙な中間段階の形成・消失にアルミニウムなどの金属がどのような影響をおよぼすかは報告はない。

我々は、アルツハイマー病の神経病理学的変化の形成過程に対して、アルミニウムなどの重金属がどのような働きをもつか検討することを考えた。即ち、アルミニウムなどの金属がこのプロトフィブリル形成に関与するかどうか検討した。

その結果、我々は1) アミロイドβ蛋白を4日間インキュベーションすると約10nmの直径で長さが200nm以下のアミロイド・フィブリルの形成が認められるが、アミロイド・プロトフィブリルは形成されないこと、2) アミロイド・プロトフィブリルはアミロイドβ蛋白を1日間インキュベーションした時点で形成されていたが、アミロイド・フィブリル形成はアミロイドβ蛋白を4日間インキュベーションする間、単調にされているように見えること、3) アルミニウムなどの金属イオンはアミロイド・プロトフィブリル形成を遅らせる働きがあること、4) アルミニウムはアミロイド・プロトフィブリル形成を阻害する可能性があることを明らかにした。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、金属イオン、アミロイド・β蛋白、フィブリル形成、プロトフィブリル形成

A. 研究目的

我々は、アルツハイマー病の神経病理学的変化の形成過程に対してアルミニウムなどの重金属がどのような働きをもつかを検討することを考えた。現時点で有力なアルツハイマー病・アミロイドβ仮説では“可溶性のアミロイドβ蛋白が不溶化していく過程にアルツハイマー病の病理過程の本体がある”と考えられている (Selkoe DJ 1993)。このため、アミロイドβ蛋白の凝集の阻害あるいは分解促進などが治療薬開発のターゲットの一つとなっている。

最近、アルツハイマー病アミロイドβ蛋白の不溶化および凝集過程にプロトフィブリルという中間段階が存在することが報告された。(Harper JD, et.al. 1997)。不思議なことにこのプロトフィブリルは比較的ゆっくりと生成され、その後、急速に消失する。そしてその消失の後、アミロイドフィブリルが形成されるという。一方、アルミニウムなどの金属がアミロイドβ蛋白のフィブリル形成におよぼす影響、あるいはアルミニウムなどの金属がアミロイドβ蛋白の神経毒性とどう関連するかについては検討が進んでいる。しかし、この奇妙な中間段階の形成・消失にアルミニウムなどの金属がどのような影響をおよぼすかの報告はない。

さて、最近、北欧の家族性アルツハイマー病家系に新たな bAPP の点突然変異が見つかった。この点突然変異はアミロイドβ蛋白部分に位置し、細

胞に発現させた場合 Ab40 も Ab42 も減少させる点で、他のアルツハイマー病病原性突然変異とは異なる。しかし、この突然変異型アミロイドβ蛋白はプロト・フィブリル形成が野生型のアミロイドβ蛋白と比較して極めて早く、しかしアミロイド・フィブリル形成自体には大きな差がないことが明らかになった(Nilsberth C, et.al. 2001)。この結果は、Ab40/Ab42 比率の上昇という現象の下流にプロト・フィブリル形成の速度の上昇がある可能性を示唆している。

以上の点を考慮して我々はアルミニウムなどの金属がこのプロトフィブリル形成に関与するかどうかを検討することにした。

B. 研究方法

アミロイドβ蛋白 (1-40) (Bachem 社から購入) を Hartley DM, 1999 らの方法によりインキュベートしアミロイド・フィブリルを生成させた。

簡単に記すと、1mM NaOH で溶解後、酸性条件下のアミロイドβ蛋白にさらにアルカリ溶液を加えることにより急激に中性条件にし、バッファーを加えた後、37度で決められた時間静置した。

インキュベーション終了後のサンプルは、テーブルトップの遠心機でフル・スピード10分間遠心した後、上清と沈査分画に分離した。

沈査分画は適度に水で薄めた後、炭素蒸着したグリッド上で乾燥させ、酢