

20020949

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

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 14 年度総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 14 年 (2003 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. PS1 ノックインマウス海馬スライスを用いたアルミニウムの神経毒性に対する(12  
電気生理学的検討)  
武田 雅俊
2. アルミニウムとストレス応答に関する研究－異常スプライシング因子誘導機構－・・・17  
遠山 正彌
3. 金属イオンのアミロイド凝集とその毒性発現における役割・・・・・・・・・・22  
高島 明彦
4. アストロサイトによるアルミニウムのアミノ酸錯体の取り込みと毒性の・・・・・・・・26  
研究  
飯塚 舜介
5. 家族性アルツハイマー病発症型突然変異を導入した培養細胞系における・・・・・・・・29  
アルミニウムの神経毒性について  
大河内正康

- ### III. 別刷研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・33

- ### IV. 研究成果の刊行物・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

#### 研究要旨

アルミニウムがアルツハイマー病 (AD) のリスクファクターであるか否かに関する議論は依然として決着をみていないが、実験レベルではさまざまな神経毒性の報告がなされている。今回我々はアルミニウムの海馬スライスに対する影響を電気生理学的に検討した。我々のグループは家族性 AD の原因遺伝子であるプレセニン 1 (PS1) の突然変異のうち、I213T をノックインしたマウスを有しており、16-20 週齢にて脳内のアミロイド  $\beta$  (A $\beta$ ) 42 蛋白が野生型の約 2 倍に上昇することを過去に報告した。しかしながらこのマウスの電気生理学的性状については未だ検討していなかったため、今回、アルミニウムの効果と併せて研究を行った。20 週齢のマウス海馬スライスを対象とし、指標としては field EPSP (fEPSP) の傾きと LTP を用いた。その結果、I213T ノックインマウスのホモ接合体では、野生型と比べて fEPSP の傾きには違いはみられなかったものの、LTP はその安定した持続に障害がみられた。100  $\mu$ M のアルミニウムでこれらのスライスを灌流したところ、遺伝子型に関係なく LTP の持続形成に明らかな障害がみられ、導入後 50 分で約 50%まで低下がみられた。これらの結果から、ノックインマウスにおける LTP の障害は A $\beta$  に由来する可能性と、アルミニウムが強い LTP 障害作用を持つことが示された。この結果は AD の認知障害症状の本体がシナプス障害に由来するという最も新しい考えかたからもアルミニウムの AD 病理過程への関与を示唆している。

次に、我々はこれまでにアルミニウムは小胞体ストレストランスデューサー群 (IRE1, ATF6, PERK) の活性化を阻害して小胞体ストレス(ツニカマイシン、カルシウムイオノフォア等刺激)時、小胞体分子シャペロン GRP78 発現誘導の減弱あるいはタンパク質翻訳抑制の減弱により、小胞体ストレスに対する感受性を増強させていることを明らかにした。さらに詳細な解析から、アルミニウムは培養細胞の生育や機能に全く影響を及ぼさない用量 (2.5, 25  $\mu$ M) で High Mobility Group タンパク質 A1a (HMGA1a) の発現を上昇させ、アルツハイマー病関連遺伝子プレセニン 2(PS2)のエクソン 5 を欠く異常スプライシング変種 (PS2V) を産生させた。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、PS2V が高頻度に発現していること、PS2V を発現しているヒト神経芽細胞腫 (SK-N-SH 細胞) は各種小胞体ストレスに対し脆弱で、さらにその培養液中で有意な A $\beta$  の上昇が認められることを報告してきた。従って、アルミニウムは PS2V 産生機構に影響を与え、孤発性アルツハイマー病の発症に関与する可能性が示唆される。そこで今回、上記 PS2V を産生させることが明らかとなった HMGA1a をアルミニウムがどのような機構で誘導するのか、また、アルミニウムによって誘導され産生された PS2V が実際に小胞体ストレスに対する感受性を増強させるかどうかについて、即ち低濃度持続的アルミニウム負荷が細胞死に反映されているか否かについて検討した結果、アルミニウムは低酸素刺激無しで HMGA1a タンパク質の発現上昇を確認し、PS2V 産生を早期に増加させた。このような状態の細胞を低酸素刺激、或いは低酸素刺激+小胞体ストレスを付加すると小胞体ストレス単独或いは低酸素単独では細胞死が観察されなかった刺激後 10 時間の時点において、既に細胞死が誘導されることを見出した。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。

さらに金属イオンとアルツハイマー病発症の関係はこれまで多くの報告が存在するが明確に肯定あるいは否定する論拠とはなっていない。われわれは、アルツハイマー病の発症は神経原線維変化を伴う脳老化が起きている状況下においてアミロイドが神経細胞に作用して神経原線維変化と神経細胞死を加速することによって記名力低下から痴呆症を生ずると考えている。そこで、今回はアミロイド毒性に対する金属イオンの効果を調べた。アミロイドはアモルファスと  $\beta$ -会合という 2 つの自己会合を生じる毒性を示すのは  $\beta$ -会合をした時である。金属イオン特に亜鉛はアミロイドの会合を促進することが報告されているが、今回の研究結果では亜鉛または銅イオンはアミロイドのアモルファスな会合を促進し、 $\beta$ -会合を抑制した。即ち、金属イオン亜鉛または銅はアミロイドが引き起こす細胞毒性を減弱することが明らかになった。アル

ミニウム、鉄などのイオンも同様の効果を示したがその程度はわずかであった。この事実は<アミロイドフィブリル自体は AD の神経毒性の本体ではなくその前段階のアミロイド・オリゴマーが毒性に本体である>という最も新しい考え方から見ると、アルミニウムは神経変性の結果産物であるフィブリル形成とは関係ないことを示唆している。

その上、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家族性アルツハイマー病の突然変異を導入した細胞系に対して、アルミニウムのパルス曝露を行った。プレセニリンの突然変異を導入した細胞系で、軸索細胞骨格蛋白のニューロフィラメントや軸索輸送蛋白のシナプトフィジンがアルミニウム・パルス投与によって軸索遠位部での分布が障害され、核周囲に限局する傾向が認められた。またプレセニリン変異においてはアポトーシスについては対照群と比較して有意な増加は認められなかったが、アミロイドβ前駆体蛋白 (APP) の突然変異群では、アルミニウム・パルス曝露において有意に神経細胞死 (アポトーシス) が生じ、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アポトーシスなど神経細胞死が家族性アルツハイマー病の病態の促進に関与している可能性が示唆された。

そして最後にアストロサイト初代培養細胞を用いて、Al-アミノ酸錯体の取り込みと毒性の実験を行った。それは加齢により、脳に Al が蓄積していくことが知られており Al に神経毒性があるため、脳内における Al の化学種を特定しその性質を明らかにすることは重要であると考えたからである。glutamine synthetase の特異的阻害剤である MSO(methionine sulfoximine)の存在下では、Al-glycine, Al-serine に加えて、Al-glutamate が顕著に取り込まれることが示された。一方、Al-glutamine は MSO 存在の場合でも取り込みが増加しなかった。Al の取り込みは細胞のアミノ酸代謝の影響を受けていることを示している。取り込みの実験の時間内ではアストロサイトの viability には、この濃度の Al アミノ酸錯体では顕著な影響はなかった。ところが、これらの Al-アミノ酸の存在下で 6 時間培養し、その後通常培養液に交換して長時間培養後、DNA を抽出し電気泳動したところ、DNA の分解が観測された。Al-アミノ酸錯体は 1.0 及び 0.1mM の濃度でアストロサイトにアポトーシスを引き起こすことが示された。Al のアミノ酸錯体は医薬品として用いられているものもある。引き続き中枢神経系への影響を調べる必要があると考えられる。

**Key Word :** アルツハイマー病, アルミニウム, プレセニリン1, LTP 小胞体ストレス, PS2V, スプライシング, HMGA1a, プレセニリン, アミロイドβ前駆体蛋白 (APP), 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 (AD) は痴呆性疾患の中でも現在最も精力的に研究が進められている疾患であり、医学にとどまらず各分野の研究者が病態生理の解明、予防や治療法の確立を目的として競い合っている。アルミニウムと AD の関係が注目されるにいたったのは、1965 年に Klatzo らによってなされた、アルミニウムを脳内投与したところ AD 脳にみられる神経原線維変化と類似した変化がみられたとの報告が契機となっている。

アルミニウムは自然界で最も多い金属であり、また調理具や薬剤など生活に密着した金属であることから、AD との関連を明らかにすることは極めて重要な課題である。これまでになされた研究の数もしたがって多い。

疫学的には、これまで食物や飲料水に含まれる環境水準のアルミニウムの摂取による急性毒性の報告はないが、慢性摂取による毒性の報告はいくつかみられ、カナダにおける飲料水中のアルミニウムの影響を 10 年間追跡した研究では、100µg/l 以上の飲料水中アルミニウム濃度の地域と住民の AD 発症の相対危険度との間に相関がみられるとされる。同様の研究がフランスでもあり、痴呆の調整相対危険度が 1.99 であるのに比して、0.1mg/l より多いアルミニウム濃度に曝露された人口では AD の危険度が 2.14 に上昇するとしている。

一方、アルミニウムへの曝露が記憶や学習を障害するとの報告がヒトおよび動物でみられ、ネコでの条件付け回避行動の阻害やマウスでの放射迷路タスクでの行動の阻害、ラットでの受動回避行動の阻

害などが知られている。またアルミニウム曝露したウサギの海馬スライスを用いた研究では、組織学的変化が現れる前から電氣的神経活動の低下がみられるとされる。こうした基礎シナプス活動の低下が記憶や学習に影響を与えることは当然予想されるため、ラットの海馬スライスを用いてアルミニウム曝露後の長期増強現象 (LTP) を測定した研究が複数存在する。LTP は記憶・学習のモデルとされ、アルミニウムが LTP を阻害することが明らかになれば、AD のリスクファクターとしての根拠のひとつとなり得る。しかしながら、慢性曝露では LTP が低下するとの一致した報告がみられるのに対し、急性曝露による影響は有意に低下する Platt らの報告と低下はみられないとする Gilbert らの報告が同時期に存在し、いまだ決着をみていない。

これとは別に、最近の AD 研究の流れのひとつに、AD の初期にみられる記憶や認知の障害は老人斑の数とは相関がなく、むしろ可溶性のアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 42 蛋白量と相関があるとの知見に基づき、可溶性  $A\beta$  42 のシナプス毒性に着目した研究がみられる。これまでの報告では、可溶性  $A\beta$  42 を投与し著明な LTP の低下をみたとする報告が複数のグループよりなされており、 $A\beta$  42 のシナプス毒性を支持する知見が集められている。

しかしながら、いずれの報告も高濃度の  $A\beta$  42 を外因性に投与したものであり、より生理的な環境である内因性  $A\beta$  42 の毒性を検討した報告はまだみられない。

我々はこれまでに家族性 AD の変異遺伝子のひとつであるプレセニリン 1 (PS1) の I213T 変異を導入したノックインマウスの作製に成功し、16~20 週齢でホモ接合体では脳内の  $A\beta$  42 量が野生型の約 1.7 倍に上昇し、ヘテロ接合体でも約 1.3 倍に上昇することを明らかにして報告した (Nakano, Y. *et al.* (1999) *Europ. J Neurosci.*, 11, 2577-2581)。組織学的検索では同週齢では老人斑の蓄積を十分にみるには至っておらず、飼育期間を延長して現在も検討中である。しかしながら、電気生理学的な検討はこれまで行っておらず、また前述の知見より内因性  $A\beta$  42 の影響をみる上で望ましい環境と考えたため、今回我々は同マウスの電気生理学的性状を最初に検討した。次に、アルミニウムのシナプス活動に及ぼす影響について検討を行った。

昨年までに我々はアルミニウムが PS2 エクソン 5

を欠失したスプライシング変種 PS2V を産生させること、低酸素刺激による PS2V 産生能を増強すること、細胞毒性を示す濃度 (1000  $\mu$ M) とは、かけ離れた低濃度 (2.5  $\mu$ M) で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) を大きく短縮させることを明らかにした。更に我々は PS2V は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していることを報告してきたので、低濃度アルミニウムによる持続負荷によって PS2V 発現時間が短縮されたことが実際に細胞の生死に反映されているか否かを検討した。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ント (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), 3)。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  $A\beta$  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。

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 4) 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 HMGA1a 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 発現を通じた細胞死について詳細に検討を行った。

神経原線維変化が脳老化の指標あると考え、加齢に伴う脳機能障害について調べた。神経原線維変化はアルツハイマー病やほかの神経変性疾患でも脳

で観察される病的変化である。この神経原線維変化はタウタンパクが主要構成成分で形成されている。このタウタンパクは神経細胞の細胞骨格を形成している微小管と結合して細胞骨格を安定化している。ところが一端神経原線維変化を引き起こすとタウタンパクは微小管に結合せずタウタンパク同士が結合して繊維状の構造物となり、これを神経原線維変化と呼ぶ。正常老化においても神経原線維変化は出現しており、早い人では20代からみられる。75歳ぐらいになるとほぼ全員に神経原線維変化が生じる。神経原線維変化が生じている場所では同時に神経細胞の脱落も起きている。この神経原線維変化が海馬、や大脳皮質に出現するようになるとアルツハイマー病と同じ痴呆症を示すようになります。アルツハイマー病では神経原線維変化のほかに老人斑が生じているのが病理学的特徴です。老人斑が大脳皮質に生じるようになるとアルツハイマー病では神経原線維変化が嗅内野から海馬、大脳皮質へ拡大することが知られている。家族性アルツハイマー病の原因遺伝子のクローニングからもb-アミロイドがアルツハイマー病の原因ではないかと考えられています。ところが、老人斑を生じるAPPマウスでは神経原線維変化が生じていない。つまり、アルツハイマー病が起こるためには老人斑の形成とともに何らかの変化が必要であるということになる。一方、変異タウを発現したマウス脳では加齢に伴ってβ-アミロイドの蓄積なしに神経原線維変化が生じる。このマウスではβ-アミロイドが神経原線維変化形成を加速することがわかっている。つまりアルツハイマー病発症には脳老化とβ-アミロイドが必要条件であるということになる。この研究では重金属とアルツハイマー病発症の関係をβ-アミロイドと重金属、また脳老化と重金属の効果を調べる。本年度は、アミロイド重合に及ぼす重金属の影響を調べた

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、これまで種々の実験系が検討されてきたが、家族性アルツハイマー病におけるアルミニウム暴露の影響についての検討は報告が少なく、しかもアルミニウムの慢性投与実験モデルが主であり、慢性投与による二次

的影含め、十分な検討が行われてきたとはいえない。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家族性アルツハイマー病発症型突然変異を導入した培養細胞系を用いて、継代後24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、更に3日後のアポトーシス等の細胞死、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。また継代4日後に24時間のアルミニウム暴露実験も行った。

加齢により、脳にAlが蓄積していくことが知られている。Alに神経毒性があるため、脳内におけるAlの化学種を特定し、その性質を明らかにすることは重要である。脳における細胞外液中のアルミニウムの存在状態はよく分っていない。血液中ではFe運搬体であるトランスフェリンと結合しているAlが90%をしめているといわれる。脳でも同様である可能性もあるが、細胞外液中ではAl-citrateが主成分であるという説もある。また、血液脳関門を通過するのはAl-citrateであるとも言われている。また、glutamateと結合したAlが活性種であるという説もあり、未解明の分野である。そこで外部よりの異物に対して生体防御の作用のあるグリア系の培養細胞を用いて、Al-アミノ酸錯体の取り込みと毒性の実験を行った。

## B. 研究方法

(1) I213T PS1 ノックインマウスのホモ接合体(Ho)、ヘテロ接合体(He)を用いて海馬体を含む脳ブロックを切り出し、Tissue Chopper (Stoelting社)を用いて厚さ450μmの海馬スライスを作製した。fEPSPの細胞外記録のため、ACSFを満たしたガラス電極(抵抗~1MΩ)を海馬CA1領域のstratum radiatumに静置し記録を行った。記録したデータの取り込みと解析にはAxon社のpCLAMP (Ver 8.0)を使用し、fEPSPの傾きを指標として測定した。

(倫理面への配慮)

マウスの扱いにあたっては、大阪大学動物実験指針に則って行った。

(2) ヒトβ-アミロイドペプチド1-40および1-42はペプチド研究所から購入した。これらの合

成ペプチドは TFA 塩として高速液体クロマトグラフィにより精製されたものをすべての実験で使用した。

(3) ThT アッセイ:  $\beta$ -アグリゲーションを定量化するため ThT の蛍光測定を行った。

(4) CD spectroscopy:  $\beta$ -アミロイドのアグリゲーションの構造を決めるため  $\beta$ -アミロイド溶液を石英キュベットに入れ、CD spectrometer で測定した。

(5) コンゴレッド染色:  $\beta$ -アミロイドの十号により生じた  $\beta$ -アミロイド線維についてベータシート構造を認識する染色剤コンゴレッドで線維を染色し複屈折性を観察した。

(6) 電子顕微鏡観察: 会合した  $\beta$ -アミロイドを含む溶液は支持膜に固定されリン酸タングステンによって染色し電子顕微鏡下で観察された。

(7) プレセニリン PS1 の野生型、プレセニリン変異  $\Delta E9$ 、PS1L250S を定常的に発現するヒト Neuroblastoma (SH-SY5Y) を poly-ethyleneimine でコートした cover slip 上に  $1.5 \times 10^5/cm^2$  の密度で播種して、DMEM medium を用いて培養した APP 野生型および APP スウェーデン型突然変異を定常的に発現する HEK293 細胞を用い同様に培養を行った。

(8) 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 1 時間曝露培養した。

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

(10) 10 $\mu$ M の Propidium Iodide を用いて核染色し、核の形態 (クロマチンの凝集など) によりアポトーシス細胞を同定した。

(11) Calcein-AM (Molecular Probes) を用いて染色および観察を行った。

(12) ヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞は、10%FCS を含む  $\alpha$ -MEM 培地で培養した。低酸素刺激は既報 1) のように低酸素チャンバー内に dish を置くこと培地中の溶存酸素を低下させることにより実行した。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。

(13) 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 法により検出した。HMGA1a 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 HMGA1a に特異的な抗体で Western ブロットした。

(14) 細胞を細胞死評価実験 24 時間前に FCS 除去培地に交換し、刺激を行う。刺激は低酸素、小胞体ストレス (ツニカマイシン)、アルミニウムの 3 種類の刺激を単独あるいは組み合わせて使用した。刺激後、経時的に培養液を回収し、LDH アッセイ、MTS アッセイ、およびヘキスト染色後形態変化のカウント (カウント法) のいずれかの方法で検出し、細胞死を評価した。

(15)  $^1H\{^{13}C\}$ HSQC の測定は Varian Unity Inova-500 で行った。試料に 10% D<sub>2</sub>O を添加した。測定条件は pulse width=13.5  $\mu$ s, acquisition time = 0.197s, spectral width = 5200Hz(1H), 13000Hz(13C), number of transient = 128, number of increment = 256, decoupler sequence = garp1, temp = 25°C であった。ケミカルシフトは乳酸のメチル基を 1H:1.33ppm, 13C:21.2ppm とした。

(16) アルミニウムの分析は試料に濃硝酸を加え、ヒートブロック上で加熱し湿式灰化法により有機物を分解したものを分析試料とした。器具はプラスチック製を用い、硝酸は超高純度 (ワコー純薬製) のものを用いた。分析は日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計 (HITACHI AA180-80) にチューブ型グラファイト炉を用いて検量線法により行った。

### C. 研究結果

最初に WT、He、Ho (いずれも n=2) の fEPSP の性質について比較検討した。いずれの群においても fEPSP の波形・振幅・傾きに差は認められず、この結果は刺激強度を段階的に変化させた検討でも同様であった。

次にそれぞれの群の海馬スライスにおいて HFS を行い、その後の電気生理学変化について検討した。HFS 直後には posttetanic potentiation (PTP) と呼ばれる 90 秒程度の短い期間があり、シナプス前終末におけるカルシウム濃度上昇による神経伝達物質放出の増加によると考えられている。その後 40 分程度の short-term potentiation (STP) と呼ばれる期間とそれに続く LTP がみられ、後シナプスに

おける NMDA 受容体の活性化と  $Ca^{2+}/CaMKII$  系の活性化による活動と考えられる。いずれの群でも PTP に差はみられなかったが、Ho では STP・LTP の安定した形成がみられず、PTP の直後から fEPSP の振幅が低下し、その低下は緩やかなものであったが時間経過とともに進行していた。He と WT には明らかな違いは認められなかった。

次に、新たに用意した海馬スライスでアルミニウムによる灌流を行い結果を検討したところ、アルミニウムフリー環境下と同様に fEPSP に差はみられなかったが、STP・LTP には著明な低下が観察され、灌流後 50 分でアルミニウムフリーと比較して fEPSP の振幅は約 50% まで低下がみられた。

先の実験結果から、アルミニウム持続負荷によって HMGA1a 発現誘導が早期より起こり PS2V 産生が早まったものと考えられるので今回得られた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 2.5、25  $\mu M$  一過性添加群、持続的負荷群、マルトール 25  $\mu M$  一過性負荷、持続的添加群にそれぞれ低酸素刺激或いは小胞体ストレスであるツニカマイシン 2  $\mu g/ml$  刺激または低酸素+ツニカマイシン刺激の組み合わせを行い、その後の細胞死の程度を培養液中に漏出する LDH を測定または、MTS アッセイを行い、同時にヘキスト染色及びプロピディウムヨウ素染色の二重陽性細胞をカウントすることにより細胞死の評価を行った。まず、対照群として評価したアルミニウム単独負荷群は培地交換後、24 時間までマルトール単独負荷群(一過性、持続性)及び非添加群との間に細胞死の差異は認められなかった。これに対し、低酸素刺激なし、ツニカマイシン投与群と低酸素刺激+ツニカマイシン投与群に置ける細胞死の程度を比較すると低酸素刺激+ツニカマイシン群では低酸素刺激およびツニカマイシン刺激単独では細胞死の起きない 10 時間の時点で約 20% の細胞が死滅することが分かった。このような条件のもとさらにアルミニウム持続負荷群では低酸素刺激+ツニカマイシン刺激による細胞死の促進を更に促進する傾向が認められた。即ち低酸素刺激+ツニカマイシン刺激群における細胞死%を低酸素刺激なし+ツニカマイシン刺激群における細胞死%で減じた比を 100% として同一条件におけるアルミニウム負荷群と非負荷群とを比較したところ、9 時間の時点で既にア

ルミニウム負荷群で細胞死の程度が増強されており、この差は刺激 21 時間後まで経時的に増強されていった。

アミロイド 40 のインキュベーションでは ThT 蛍光は 300 分から上昇するシグモイダルカーブを示し、アミロイド 42 ラグタイムなしで ThT が上昇した。20  $\mu M$  アルミニウム、鉄、亜鉛、銅を  $\beta$  アミロイドと共にインキュベーションしたところ鉄、アルミニウムの添加によって ThT の増加は立ち上がりが遅くなり最大値も無添加の  $\beta$  アミロイドと比べると減少していた。亜鉛、銅添加では  $\beta$  アグリゲーションによる ThT の増大は完全に抑制された。この傾向はアミロイド 42 を用いても同様であった。即ち、金属イオンの存在は  $\beta$  アミロイドの  $\beta$  会合に抑制的に作用することが明らかになった。 $\beta$  会合抑制の金属濃度は約 0.1  $\mu M$  以上で有意に減少することが示された。一方、Ashley Bush らは亜鉛が  $\beta$  アミロイドの凝集を促進することを報告している。そこで、彼らと同様の方法で  $\beta$  アミロイドの凝集を超遠心沈殿法によって分離し OD214 によって測定した。その結果金属がない場合  $\beta$  アミロイドは 30 分のインキュベーションで約 35% が凝集して沈殿へ回収されていた。亜鉛添加の場合約 90% の  $\beta$  アミロイドが銅も 70% が凝集していることが示された。これらは Bush らの報告と一致するものであった。ThT の結果と合わせて考えると金属の存在は  $\beta$  アミロイドの凝集を促進するがその凝集は  $\beta$  会合を伴わないと解釈することが出来た。この結果を更に確認するためそれぞれの凝集の CD スペクトルによってその構造を調べた。金属非存在下では  $\beta$  シートを示すのだが、金属存在かでは  $\beta$  アミロイドはランダムコイルから  $\beta$  ターン構造へと短時間でシフトした。すなわち金属の存在は  $\beta$  アミロイドの  $\beta$  会合を阻止しアモルファスな会合を促進することが示されたのである。

このアルミニウム毒性に対する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直径 10 nm の中間径線維に属するニューフィラメント L、直径 6 nm のアクチン線維、軸索輸送については膜顆粒蛋白質であるシナプトフィジンの各抗体を用いてその分布を検討した。その結果、SH-SY5Y においては 250  $\mu M$ 、1 mM、2 mM のいずれのアルミニウム濃度でもプレセニリン変異群と対照群とで細胞死において有意な差がない継代



後4日目で、細胞骨格及び軸索輸送に変化がみられた。その変化はアルミニウム濃度により異なっており、250  $\mu$ Mではファーストコンポーネントに属するシナプトフィジンの方がより大きな障害を受けており、1 mM以上ではスローコンポーネントに属するニューロフィラメントLにおいても影響があった。すなわち250  $\mu$ Mでは、ニューロフィラメントLが野生型でもプレセニン変異群でも、シナプトフィジンの軸索遠位部における分布は消退していた。またアルミ1 mM曝露ではニューロフィラメントLとシナプトフィジンともに核周囲に限局していた。2mMのAl-Mal曝露においてはControl、wild type、プレセニン変異のいずれにおいてもニューロフィラメントLとシナプトフィジンとも軸索遠位部での分布の障害が認められた。この結果を、アルミ濃度によって整理すると、より低濃度のアルミニウム・パルス投与ではプレセニン変異群において軸索輸送障害がみられ、まずファーストコンポーネントの障害が先に認められ、次いでスローコンポーネントの障害がもたらされたと考えられる。この段階ではアポトーシスを中心とする神経細胞死はアルミニウムの濃度依存的に増加するもののプレセニン変異の有無における有意な差は認められなかった。

アストロサイトは培養液中に citrate を放出するが、放出された citrate は再びアストロサイトに取り込まれることはなかった。また、培養液中の citrate に結合した Al は取り込まれなかった。一方、Al-glycine, Al-serine, Al-glutamic acid はアストロサイトによる取り込みが見られたが、Al-glutamate については、Al濃度0.1mMでは有意な取り込みは見られなかった。ところが、glutamine synthetase の特異的阻害剤である MSO(methionine sulfoximine) の存在下では、Al-glycine, Al-serine に加えて、Al-glutamate が顕著に取り込まれることが示された。一方、Al-glutamic acid は MSO 存在の場合でも取り込みが増加しなかった。Alの取り込みは細胞のアミノ酸代謝の影響を受けていることを示している。取り込みの実験の時間内ではアストロサイトの viability には、今回用いた濃度の Al アミノ酸錯体では顕著な影響はなかった。ところが、これらの Al-アミノ酸の存在下で6時間培養し、その後通常培養液に交換して長時間培養(10日)後、DNAを抽出し電

気泳動したところ、DNAの分解が観測された。Al-アミノ酸錯体は0.1mMの濃度でアストロサイトにアポトーシスを引き起こすことが示された。MSO存在下でも同様にアポトーシスが観測された。しかし、長時間 Al-アミノ酸錯体存在下で培養したものは、アポトーシスを観測できなかった。僅かの Al 刺激によって細胞はアポトーシスを起こすが、量が多い場合には、異なった機構がはたらくことが示唆された。citrate は Al と強く結合するが、取り込みには関係していないと考えられる。細胞外液にはこれらのアミノ酸は一定濃度の範囲で含まれている。これらの結果は Al のアミノ酸錯体が Al の取り込みと、その後の毒性の発現にかかわっていることを強く示唆する。

#### E. 考察

最近、A $\beta$ が凝集し不溶化する機構の解明に焦点をおいた研究とは別に、可溶性のA $\beta$ の毒性に焦点が当てられるようになってきた。臨床的な観点からも、初期のAD患者脳にはほとんど老人斑がみられないにもかかわらず、症状として記憶や認知の障害が出現することが注目され、また症状の重症度は老人斑の数よりも可溶性A $\beta$ の量にむしろ相関がみられることから、可溶性A $\beta$ 、すなわちA $\beta$ 42の2量体をはじめとする oligomer が盛んに研究されている。

こうした初期の記憶・認知障害を研究するに当たって、現時点でLTPは最も有効な手段とされる。アルミニウムの実験動物への投与でも記憶・認知障害が報告されており、これまでもラット海馬を用いたアルミニウムのLTPに対する効果を調べた研究がいくつかなされているが、LTPを低下させるとする報告と変化はみられないとする報告があり、一致をみていない。

今回のマウスを用いた我々の研究では、アルミニウムは明らかなLTP阻害作用を示した。使用した濃度は100  $\mu$ Mと比較的高濃度でかつ急性投与の毒性をみるものであったが、少なくとも一定条件下でアルミニウムはシナプス活動に対し毒性を有することが結果から示唆される。

こうした毒性がシナプスのどの部分を標的とするかは今回の研究だけでは明らかでないが、高頻度刺激直後のfEPSPの振幅にはあまり差がみられず、

時間経過とともに次第に差が広がることは、後シナプスにおける NMDA 受容体活性化以降のプロセスに阻害作用を示すことが予想される。こうした作用がアルミニウムにだけ特異的なものであるかは、他の重金属類を用いた同様な実験で検討する必要があるが、今回は実施していない。また、濃度を低濃度から段階的に変化させての検討も必要であろう。さらに、生理的に吸収する程度の低容量のアルミニウムを慢性的に投与した動物において、LTP をはじめとする電気生理学的指標を検討することが次の段階において必要と考えられる。

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 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  $2.5 \mu\text{M}$  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。本研究ではこの低濃度持続的アルミニウム負荷が一過性アルミニウム負荷に比べ HMG1a の発現を引き起こしやすくさせているかどうかの一つの鍵となると考えられたが今回の結果から、持続的アルミニウム負荷によって PS2V 産生促進が持続的アルミニウム負荷による HMG1a 発現増強にあることを示した。またこの HMG1a 発現促進が実際に PS2V 産生を促進し、細胞死が増強されるかどうか見極める必要があったが、小胞体ストレスであるツニカマイシン刺激による細胞死を低酸素で増強され、更にアルミニウムが持続的に負荷されておれば小胞体ストレスによる細胞死を益々促進、増強することが

明らかとなった。

プレセニリン変異においてはアルミニウム・マルトール  $250 \mu\text{M}$  曝露により、軸索輸送系のファースト・コンポーネントに属するシナプトフィジンがまず影響を受け、アルミの濃度を  $1 \text{mM}$  に上げるとスローコンポネント a に属するに属するニューロフィラメントもアルミニウム曝露の影響を受けていた。すなわちアルミニウム・パルス投与により軸索遠位部への分布が障害された。この場合は膜蛋白やリン脂質などの膜顆粒の軸索輸送障害が生じる事を示唆していた。最近、プレセニリンが神経細胞突起の成長に関係しているという報告が複数なされているが、今回の実験結果はこの部分の障害にアルミニウムも関与する可能性を示している。また、APP の突然変異を導入した細胞系において、アルミニウム曝露を行ったところ、APP 変異 (スウェーデン型) においてアポトーシスが増加しており、 $1 \text{mM}$  および  $2 \text{mM}$  のアルミ濃度においては有意な増加を認めた。また APP と結合し足場蛋白質としての役割を持つとされる JIP-1 の分布がより局在化し、その染色性についても増強が認められた。JIP-1 の染色性の亢進は細胞内軸索輸送系の障害の反映、またはアポトーシスの亢進に対する代償的变化の可能性が考えられる。

生体内の Al のケミカル・スペシエイションについては、未だ不明のことが多い。特に、中枢神経系においては存在量が少ないため、未解明の領域である。今回の実験で、Al のアミノ酸錯体は中枢神経系における Al の取り込みに関与していることがうかがわれた。特に、glutamine synthetase の特異的阻害剤である MSO (methionine sulfoximine) の存在下では、Al-glutamate が顕著に取り込まれ、一方、Al-glutamine は MSO 存在の場合でも取り込みが増加しなかった。アストロサイトは、細胞毒性のあるグルタミン酸を取り込み、グルタミンを放出する機能をもっている。グルタミン酸の供給がないと、グルタミンの放出ができないので、細胞は、グルタミン酸の取り込みを亢進させようとする。このことは、今回の Al-glutamate を加えたとき、Al が顕著に取り込まれた結果をよく説明することが出来る。glutamine synthetase の酵素活性を変化させるような環境要因の曝露がある場合に、疾病との関連があるかもしれない。

## F. 結論

I213T ノックインマウスはホモ接合体において LTP の低下がみられたが、fEPSP の傾きは野生型と比べ変化はみられず、基礎シナプス活動は阻害されていなかった。すなわち、I213T ノックインマウスにおいては、シナプス前終末よりのグルタミン酸放出や AMPA 受容体の活性化は障害されておらず、後シナプスにおける NMDA 受容体の活性化および  $Ca^{2+}/CaMKII$  系の活性化に障害が起こっており、これらの変化は脳内  $A\beta 42$  の上昇による可能性が考えられた。アルミニウムは  $100\mu M$  で LTP の阻害作用を示し、その阻害作用は遺伝子型に関係なく、阻害の程度は高頻度刺激後 50 分でアルミニウム非存在下の約 50% に及んだ。刺激直後の反応には差はみられず、 $A\beta 42$  と同様に後シナプスにおける活動の阻害がアルミニウムの作用点と考えられた。

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。さらにこの産生増強は PS2exon5 に結合する HMGA1a の発現増強によることが明らかになった。またその際、HMGA1a の発現上昇の程度に応じて小胞体ストレスに対する感受性が増強されることも明らかとなった。

金属イオンの存在はアミロイド凝集に対しては  $\beta$  会合を抑制し細部毒性を減弱することが示された。プレセニリンの突然変異を導入した細胞系にアルミニウムをパルス曝露することにより、軸索細胞骨格蛋白のニューロフィラメントや軸索輸送蛋白のシナプトフィジンの軸索遠位部での分布が障害された。すなわちプレセニリン変異がアルミニウムの軸索輸送障害を促進する可能性が示された。

Al-アミノ酸錯体が Al の取り込みと、その後の毒性の発現にかかわっていることが分った。Al のアミノ酸錯体は医薬として用いられているものもある。また、食品中には Al を多く含有するものがある。引き続き中枢神経系への影響を調べる必要があると考えられる。

## F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

## G. 引用文献

## H. 研究発表

### 1. 論文発表

Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yasuda Y, Yatera M, Okochi M, Tohyama M, Takeda M.

The unfolded protein response is involved in the pathology of Alzheimer's disease.

Ann N Y Acad Sci 977:349-55, 2002.

Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C.

Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1.

EMBO J 15:21(20):5408-16, 2002

Yasuda Y, Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yatera M, Okochi M, Yamamori H, Matsumoto N, Kida T, Fukumori A, Okumura M, Tohyama M, Takeda M.

FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress.

Biochem Biophys Res Commun 16:296(2):313-8, 2002

Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, George-Hyslop PS, Tohyama M.

Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations.

J Biol Chem 16:276(46):43446-54, 2001

Kudo T, Imaizumi K, Tanimukai H, Katayama T, Sato N, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Jinno Y, Tohyama M, Takeda M.

Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease?

Neurobiol Aging 21(2):215-24, 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, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M.

Presenilin-1 mutations downregulate the signalling

pathway of the unfolded-protein response.  
Nat Cell Biol 1(8):479-85, 1999

Manabe, T., et al.: Induced HMGAla expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. Cell Death. Diff. in press, 2003

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

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

Katayama, T. et al.: Presenilin-1 mutation downregulates the signalling pathway of the unfolded protein response. Nature Cell Biol. 1, 479-484, 1999.

Kwok JBJ, Halliday GM, Brook WS, Dolios G., Laudon H., Murayama, O., Hallupp M., Badenhop RF, Vick J., Eang R., Naslund J., Takashima A., Gandy SE., Schofield PR: Presenilin-1 mutation (Leu271Val) results in altered exonic splicing and Alzheimer's disease with non-cored plaques and neuritic dystrophy. J. Biol Chem, in press.

Dou F, Netzer WJ, Tanemura K, Li F, Hartl FU, Takashima A, Gouras GK, Greengard P, Xu H. Chaperones increase association of tau protein with microtubules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21;100(2):721-6.

Planel E, Sun, X, Takashima A., Role of GSK-3 $\beta$  in Alzheimer's disease pathology", Drug Dev. Res. 56, 491-510 (2002)

Sato, S, Tatebayashi, Y., Akagi, T., Chui, D-H, Murayama, M., Miyasaka, T., Planel, E., Tanemura, K., Sun, X, Hashikawa, T., Yoshioka, K., Ishiguro, K., Takashima, A. Aberrant tau phosphorylation by GSK-3 $\beta$  and JNK-3 induces oligomeric tau fibrils in COS-7 cells. J. Biol Chem

277, 42060-42065 (2002)

Tatebayashi, Y, Miyasaka, T, Chui, D-H, Akagi, T., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Tanemura, K., Murayama, M., Ishiguro, K., Planel, E., Sato, S., Hashikawa, T., Takashima, A., Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau Proc Natl Acad Sci U S A. 99, 13896-13901 (2002)

Ono K, Hasegawa K, Yoshiike Y, Takashima A, Yamada M, Naiki H. Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. J Neurochem. 2002 May;81(3):434-40.

Xia X, Wang P, Sun X, Soriano S, Shum WK, Yamaguchi H, Trumbauer ME, Takashima A, Koo EH, Zheng H. The aspartate-257 of presenilin 1 is indispensable for mouse development and production of  $\beta$ -amyloid peptides through  $\beta$ -catenin-independent mechanisms. Proc Natl Acad Sci U S A. 99 8760-8765 (2002)

Tanemura, K., Akagi T., Murayama, M., Hashikawa, T., Tominaga T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. J. Neurosci. 22, 133-141 (2002)

X. Sun, S. Sato, O. Murayama, M. Murayama, J.-M. Park, H. Yamaguchi, and Takashima A. Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. Neurosci. lett. 15, 61-64 (2002)

Sun, X, Cole, GM, Chu, T., Xia, W., Galasko, D., Yamaguchi, H., Frautschy SA., Takashima A., Intracellular A $\beta$  is increased by okadaic acid exposure in the transfected neuronal and non-neuronal cell lines. Neurobiol. of Aging 23, 195-203 (2002)

Fukusho E, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Kudo T,

Tanaka T, Matsumoto N, Kida T, Nakano Y, Shinosaki K, Takeda M. Effect of Presenilin 1 missense Mutation and Aluminum on Early Neuronal Development of the Mouse brain. *Psychogeriatrics* 1: 126-132, 2001

6) Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tani H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J* 21: 5408-5416, 2002

Heavy metal analysis of groundwater from Warri, Nigeria.

Aremu DA, Olawuyi JF, Meshitsuka S, Sridhar MK, Oluwande PA, International J. Environmental Health Research 12, 261-267 (2002).

A risk of Alzheimer's disease and aluminum in drinking water,

Meshitsuka S, Aremu DA, Nose T, *Psychogeriatrics* 2, 263-268 (2002).

## 2. 学会発表

Aremu DA, Tominaga L, Meshitsuka S: Differential uptake of aluminum-amino acid complexes by cultured astrocytes. Abstract of 11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals p34 (Berkeley, 2002).

Meshitsuka S, Hikita J, Tominaga L, Aremu DA: NMR studies of the effects of aluminum on the metabolism and functions of the cerebellar astrocytes in culture. Abstract of 11th International symposium on Trace Elements in Man and Animals p34-35 (Berkeley, 2002).

Aremu DA, Meshitsuka S: Inhibition of glutamine synthetase enhanced uptake of aluminum glutamate by cultured astrocytes. 第13回日本微量元素学会抄録集 p116 (2002).

Meshitsuka S, Tominaga L, Hikita J, Inoue M, Aremu DA, Matsushima F: Intake, metabolism

and excretion of aluminum. *Trace Elements and Electrolytes* 20(1) 73 (2003).

Kudo T: The unfolded protein responses are involved in the pathology of AD. 7<sup>th</sup> International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Geneva, Switzerland, 2002.

Kudo T, Takeda M: Presenilin-mediated endoplasmic reticulum stress. The 8<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Stockholm, Sweden, 2002.

Kudo T, Takeda M: Endoplasmic Reticulum Stress and Aging. 12<sup>th</sup> World Congress of Psychiatry, Yokohama, Japan, 2002.

Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Tohyama M, Takeda M: The unfolded protein responses are involved in the pathology of Alzheimer disease. International Symposium "Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders", Osaka, Japan, 2002.

## I. 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。

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：PS1 ノックインマウス海馬スライスを用いたアルミニウムの神経毒性に対する電気生理学的検討)

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

アルミニウムがアルツハイマー病 (AD) のリスクファクターであるか否かに関する議論は依然として決着をみていないが、実験レベルではさまざまな神経毒性の報告がなされている。今回我々はアルミニウムの海馬スライスに対する影響を電気生理学的に検討した。我々のグループは家族性 AD の原因遺伝子であるプレセニリン 1 (PS1) の突然変異のうち、I213T をノックインしたマウスを有しており、16-20 週齢にて脳内のアミロイドβ (Aβ) 42 蛋白が野生型の約 2 倍に上昇することを過去に報告した。しかしながらこのマウスの電気生理学的性状については未だ検討していなかったため、今回、アルミニウムの効果と併せて研究を行った。20 週齢のマウス海馬スライスを対象とし、指標としては field EPSP (fEPSP) の傾きと LTP を用いた。その結果、I213T ノックインマウスのホモ接合体では、野生型と比べて fEPSP の傾きには違いはみられなかったものの、LTP はその安定した持続に障害がみられた。100 μM のアルミニウムでこれらのスライスを灌流したところ、遺伝子型に関係なく LTP の持続形成に明らかな障害がみられ、導入後 50 分で約 50% まで低下がみられた。これらの結果から、ノックインマウスにおける LTP の障害は Aβ に由来する可能性と、アルミニウムが強い LTP 阻害作用を持つことが示された。

*Key Word* : アルツハイマー病, アルミニウム, プレセニリン 1, LTP

#### A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) は痴呆性疾患の中でも現在最も精力的に研究が進められている疾患であり、医学にとどまらず各分野の研究者が病態生理の解明、予防や治療法の確立を目的として競い合っている。アルミニウムと AD の関係が注目されるにいたったのは、1965 年に Klatzo らによってなされた、アルミニウムを脳内投与したところ AD 脳にみられる神経原線維変化と類似した変化がみられたとの報告が契機となっている。

アルミニウムは自然界で最も多い金属であり、また調理具や薬剤など生活に密着した金属であることから、AD との関連を明らかにすることは極めて重要な課題である。これまでになされた研究の数もしたがって多い。

疫学的には、これまで食物や飲料水に含まれる環境水準のアルミニウムの摂取による急性毒性の報

告はないが、慢性摂取による毒性の報告はいくつかみられ、カナダにおける飲料水中のアルミニウムの影響を 10 年間追跡した研究では、100 μg/l 以上の飲料水中アルミニウム濃度の地域と住民の AD 発症の相対危険度との間に相関がみられるとされる。同様の研究がフランスでもあり、痴呆の調整相対危険度が 1.99 であるのに比して、0.1 mg/l より多いアルミニウム濃度に曝露された人口では AD の危険度が 2.14 に上昇するとしている。

一方、アルミニウムへの曝露が記憶や学習を障害するとの報告がヒトおよび動物でみられ、ネコでの条件付け回避行動の阻害やマウスでの放射迷路タスクでの行動の阻害、ラットでの受動回避行動の阻害などが知られている。またアルミニウム曝露したウサギの海馬スライスを用いた研究では、組織学的変化が現れる前から電気的神経活動の低下がみられるとされる。こうした基礎シナプス活動の低下が

記憶や学習に影響を与えることは当然予想されるため、ラットの海馬スライスを用いてアルミニウム曝露後の長期増強現象 (LTP) を測定した研究が複数存在する。LTP は記憶・学習のモデルとされ、アルミニウムが LTP を阻害することが明らかになれば、AD のリスクファクターとしての根拠のひとつとなり得る。しかしながら、慢性曝露では LTP が低下するとの一致した報告がみられるのに対し、急性曝露による影響は有意に低下する Platt らの報告と低下はみられないとする Gilbert らの報告が同時期に存在し、いまだ決着をみていない。

これとは別に、最近の AD 研究の流れのひとつに、AD の初期にみられる記憶や認知の障害は老人斑の数とは相関がなく、むしろ可溶性のアミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 42 蛋白質量と相関があるとの知見に基づき、可溶性  $A\beta$  42 のシナプス毒性に着目した研究がみられる。これまでの報告では、可溶性  $A\beta$  42 を投与し著明な LTP の低下をみたとする報告が複数のグループよりなされており、 $A\beta$  42 のシナプス毒性を支持する知見が集められている。

しかしながら、いずれの報告も高濃度の  $A\beta$  42 を外因性に投与したものであり、より生理的な環境である内因性  $A\beta$  42 の毒性を検討した報告はまだみられない。

我々はこれまでに家族性 AD の変異遺伝子のひとつであるプレセニン 1 (PS1) の I213T 変異を導入したノックインマウスの作製に成功し、16~20 週齢でホモ接合体では脳内の  $A\beta$  42 量が野生型の約 1.7 倍に上昇し、ヘテロ接合体でも約 1.3 倍に上昇することを明らかにして報告した (Nakano, Y. *et al.* (1999) *Europ. J Neurosci.*, 11, 2577-2581)。組織学的検索では同週齢では老人斑の蓄積を十分にみるには至っておらず、飼育期間を延長して現在も検討中である。しかしながら、電気生理学的な検討はこれまで行っておらず、また前述の知見より内因性  $A\beta$  42 の影響をみる上で望ましい環境と考えたため、今回我々は同マウスの電気生理学的性状を最初に検討した。次に、アルミニウムのシナプス活動に及ぼす影響について検討を行った。

### C. 研究方法

I213T PS1 ノックインマウスのホモ接合体 (Ho)、ヘテロ接合体 (He) を用いた。週齢は  $A\beta$  42 の脳内量が野生型 (WT) の約 1.7 倍になることがわか

っている 20 週とし、対照として同週齢の野生型マウスを用いた。

各マウスはエーテル麻酔後断頭し、摘出した脳は酸素消費度を減らすため、95% $O_2$ /5% $CO_2$  にて十分に飽和し氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF: NaCl 126mM,  $NaHCO_3$  26mM, D-glucose 10mM, KCl 5mM,  $NaPO_4$  1.25mM,  $MgSO_4$  1.8mM,  $CaCl_2$  2.5mM, pH7.4) 中で 5 分間冷却した。次に海馬体を含む脳ブロックを切り出し、Tissue Chopper (Stoelting 社) を用いて厚さ 450  $\mu$ m の海馬スライスを作製した。作製した海馬スライスは直ちに室温で 95% $O_2$ /5% $CO_2$  にて飽和した ACSF 中に 2 時間静置してスライス作製手技による組織損傷からの回復を待った。

fEPSP の細胞外記録のため、ACSF を満たしたガラス電極 (抵抗 $\sim$ 1M $\Omega$ ) を海馬 CA1 領域の stratum radiatum に静置し記録を行った。反応は低頻度刺激 (0.2Hz, 0.05ms) で Schaffer 側枝をタングステン電極で刺激し、field EPSP (fEPSP) の最大振幅の 40% の反応が得られるように刺激強度を調整した。記録中海馬スライスは 95% $O_2$ /5% $CO_2$  にて飽和した ACSF にて灌流した。

安定した記録が得るため最低でも 30 分間刺激を続けた後、基礎シナプス活動として 10 分間 fEPSP を記録した。野生型・Ho・He マウスの電気生理学的性状をみるため、高頻度刺激 (HFS: 3 train, 100Hz で 1 秒, train 間隔 5 秒) を行い LTP を誘導した。誘導後は再び 0.2Hz にて継続して刺激を行い、fEPSP の変化を記録した。

アルミニウム曝露は海馬スライスを 100  $\mu$ M アルミニウム含 ACSF にて灌流することにより、HFS 直前の 10 分間行った。アルミニウムは不溶性のリン酸化物や硫化物を形成するため、ACSF の組成を一部変更した modified ACSF を使用した。Modified ACSF で灌流を行った際、fEPSP の振幅に減弱がみられたが (3~9%) 持続した低下はみられず、LTP の誘導にも影響はみられなかった。

記録したデータの取り込みと解析には Axon 社の pCLAMP (Ver 8.0) を使用し、fEPSP の傾きを指標として測定した。

(倫理面への配慮)

マウスの扱いにあたっては、大阪大学動物実験指針に則って行った。

#### D. 研究結果

最初に WT、He、Ho (いずれも n=2) の fEPSP の性質について比較検討した。いずれの群においても fEPSP の波形・振幅・傾きに差は認められず、この結果は刺激強度を段階的に変化させた検討でも同様であった。

次にそれぞれの群の海馬スライスにおいて HFS を行い、その後の電気生理学変化について検討した。HFS 直後には posttetanic potentiation (PTP) と呼ばれる 90 秒程度の短い期間があり、シナプス前終末におけるカルシウム濃度上昇による神経伝達物質放出の増加によると考えられている。その後 40 分程度の short-term potentiation (STP) と呼ばれる期間とそれに続く LTP がみられ、後シナプスにおける NMDA 受容体の活性化と Ca<sup>2+</sup>/CaMKII 系の活性化による活動と考えられる。いずれの群でも PTP に差はみられなかったが、Ho では STP・LTP の安定した形成がみられず、PTP の直後から fEPSP の振幅が低下し、その低下は緩やかなものであったが時間経過とともに進行していた。He と WT には明らかな違いは認められなかった。

次に、新たに用意した海馬スライスでアルミニウムによる灌流を行い結果を検討したところ、アルミニウムフリー環境下と同様に fEPSP に差はみられなかったが、STP・LTP には著明な低下が観察され、灌流後 50 分でアルミニウムフリーと比較して fEPSP の振幅は約 50%まで低下がみられた。

#### G. 考察

AD の病態を解明する試みの中で、老人斑とその構成蛋白である Aβ の蓄積のメカニズムは研究者の注目を集めてきた。家族性 AD においてアミロイド前駆体蛋白 (APP) の遺伝子変異や、APP を切り出す酵素として想定されている PS の遺伝子異常が発見される毎に、Aβ が AD の病態に占める位置はいつそうその重要性を増してきたが、いまだその全容は明らかではない。Aβ 42 は老人斑形成で核となって凝集することから、その異常な産生が AD で起きているとの仮説が有力視されており、それに応じて Aβ 42 の神経毒性が培養細胞やトランスジェニックマウスを用いてこれまで検討されている。

最近、Aβ が凝集し不溶化する機構の解明に焦点をおいた研究とは別に、可溶性の Aβ の毒性に焦点が当てられるようになってきた。臨床的な観点から

も、初期の AD 患者脳にはほとんど老人斑がみられないにもかかわらず、症状として記憶や認知の障害が出現することが注目され、また症状の重症度は老人斑の数よりも可溶性 Aβ の量にむしろ相関がみられることから、可溶性 Aβ、すなわち Aβ 42 の 2 量体をはじめとする oligomer が盛んに研究されている。

こうした初期の記憶・認知障害を研究するに当たって、現時点で LTP は最も有効な手段とされる。アルミニウムの実験動物への投与でも記憶・認知障害が報告されており、これまでもラット海馬を用いたアルミニウムの LTP に対する効果を調べた研究がいくつかなされているが、LTP を低下させるとする報告と変化はみられないとする報告があり、一致をみていない。

今回のマウスを用いた我々の研究では、アルミニウムは明らかな LTP 阻害作用を示した。使用した濃度は 100 μM と比較的高濃度でかつ急性投与の毒性をみるものであったが、少なくとも一定条件下でアルミニウムはシナプス活動に対し毒性を有することが結果から示唆される。

こうした毒性がシナプスのどの部分を標的とするかは今回の研究だけでは明らかでないが、高頻度刺激直後の fEPSP の振幅にはあまり差がみられず、時間経過とともに次第に差が広がることは、後シナプスにおける NMDA 受容体活性化以降のプロセスに阻害作用を示すことが予想される。こうした作用がアルミニウムにだけ特異的なものであるかは、他の重金属類を用いた同様な実験で検討する必要があるが、今回は実施していない。また、濃度を低濃度から段階的に変化させての検討も必要であろう。さらに、生理的に吸収する程度の低容量のアルミニウムを慢性的に投与した動物において、LTP をはじめとする電気生理学的指標を検討することが次の段階において必要と考えられる。

一方、実験に用いた I213T PS1 ノックインマウスは

脳内 Aβ 42 の上昇がこれまでのところ明らかになっているが、他の表現型の変化はいまだ十分ではない。今回の結果で 20 週齢のホモ接合体において野生型に比べ LTP が低下する傾向が観察されたことは、外因性に高濃度の Aβ 42 を投与して著明な LTP の低下を示した他のグループによる研究結果と一致するものであり、Aβ 42 のシナプス毒性を裏付け



ると同時に、I213T PS1 ノックインマウスの AD モデル動物としての可能性を示唆している。結果をさらに確かなものとするためには、より高齢のマウスにおける同様な検討に加え、可溶性分画の A $\beta$  42 の定量や行動薬理学的な評価が必要と考えられる。

#### H. 結論

家族性 AD の変異遺伝子のひとつである I213T ノックインマウスの海馬スライスを用いて、その電気生理学的性状について研究すると共に、アルミニウムのシナプス毒性について検討した。I213T ノックインマウスはホモ接合体において LTP の低下がみられたが、fEPSP の傾きは野生型と比べ変化はみられず、基礎シナプス活動は阻害されていなかった。すなわち、I213T ノックインマウスにおいては、シナプス前終末よりのグルタミン酸放出や AMPA 受容体の活性化は障害されておらず、後シナプスにおける NMDA 受容体の活性化および Ca<sup>2+</sup>/CaMKII 系の活性化に障害が起こっており、これらの変化は脳内 A $\beta$  42 の上昇による可能性が考えられた。

アルミニウムは 100  $\mu$ M で LTP の阻害作用を示し、その阻害作用は遺伝子型に関係なく、阻害の程度は高頻度刺激後 50 分でアルミニウム非存在下の約 50% に及んだ。刺激直後の反応には差はみられず、A $\beta$  42 と同様に後シナプスにおける活動の阻害がアルミニウムの作用点と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 2. 論文発表

Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Yasuda Y, Yatera M, Okochi M, Tohyama M, Takeda M.

The unfolded protein response is involved in the pathology of Alzheimer's disease.

Ann NY Acad Sci 977:349-55, 2002.

Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tani H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C.

Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1.

EMBO J 15:21(20):5408-16, 2002

Yasuda Y, Kudo T, Katayama T, Imaizumi

K, Yatera M, Okochi M, Yamamori H, Matsumoto N, Kida T, Fukumori A, Okumura M, Tohyama M, Takeda M.

FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress.

Biochem Biophys Res Commun 16:296(2):313-8, 2002

Katayama T, Imaizumi K, Honda A, Yoneda T, Kudo T, Takeda M, Mori K, Rozmahel R, Fraser P, George-Hyslop PS, Tohyama M.

Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations.

J Biol Chem 16:276(46):43446-54, 2001

Kudo T, Imaizumi K, Tanimukai H, Katayama T, Sato N, Nakamura Y, Tanaka T, Kashiwagi Y, Jinno Y, Tohyama M, Takeda M.

Are cerebrovascular factors involved in Alzheimer's disease?

Neurobiol Aging 21(2):215-24, 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, St George-Hyslop P, Takeda M, Tohyama M.

Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response.

Nat Cell Biol 1(8):479-85, 1999

##### 2. 学会発表

Kudo T: The unfolded protein responses are involved in the pathology of AD. 7<sup>th</sup> International Geneva/Springfield Symposium on Advances in Alzheimer Therapy, Geneva, Switzerland, 2002.

Kudo T, Takeda M: Presenilin-mediated endoplasmic reticulum stress. The 8<sup>th</sup> International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Stockholm, Sweden, 2002.

Kudo T, Takeda M: Endoplasmic

Reticulum Stress and Aging. 12<sup>th</sup> World Congress of Psychiatry, Yokohama, Japan, 2002.

Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Tohyama M, Takeda M: The unfolded protein responses are involved in the pathology of Alzheimer disease. International Symposium "Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders", Osaka, Japan, 2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

2. 特許取得

なし。

3. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

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：アルミニウムとストレス応答に関する研究－異常スプライシング因子誘導機構－)

分担研究者 遠山正彌 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学

研究要旨

これまでに、アルミニウムは小胞体ストレストランスデューサー群 (IRE1, ATF6, PERK) の活性化を阻害して小胞体ストレス(ツニカマイシン、カルシウムイオノフォア等刺激)時、小胞体分子シャペロン GRP78 発現誘導の減弱あるいはタンパク質翻訳抑制の減弱により、小胞体ストレスに対する感受性を増強させていることを明らかにした。さらに詳細な解析から、アルミニウムは培養細胞の生育や機能に全く影響を及ぼさない用量 (2.5, 25  $\mu$ M) で High Mobility Group タンパク質 A1a (HMGA1a) の発現を上昇させ、アルツハイマー病関連遺伝子プレセニリン 2 (PS2) のエクソン 5 を欠く異常スプライシング変種 (PS2V) を産生させた。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、PS2V が高頻度に発現していること、PS2V を発現しているヒト神経芽細胞腫 (SK-N-SH 細胞) は各種小胞体ストレスに対し脆弱で、さらにその培養液中で有意な A $\beta$  の上昇が認められることを報告してきた。従って、アルミニウムは PS2V 産生機構に影響を与え、孤発性アルツハイマー病の発症に関与する可能性が示唆される。そこで今回、上記 PS2V を産生させることが明らかとなった HMGA1a をアルミニウムがどのような機構で誘導するのか、また、アルミニウムによって誘導され産生された PS2V が実際に小胞体ストレスに対する感受性を増強させるかどうかについて、即ち低濃度持続的アルミニウム負荷が細胞死に反映されているか否かについて検討した結果、アルミニウムは低酸素刺激無しで HMGA1a タンパク質の発現上昇を確認し、PS2V 産生を早期に増加させた。このような状態の細胞を低酸素刺激、或いは低酸素刺激+小胞体ストレスを付加すると小胞体ストレス単独或いは低酸素単独では細胞死が観察されなかった刺激後 10 時間の時点において、既に細胞死が誘導されることを見出した。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。

**Key Word** : アルツハイマー病、アルミニウム、小胞体ストレス、PS2V、スプライシング、HMGA1a、細胞死

A. 研究目的

昨年までに我々はアルミニウムが PS2 エクソン 5 を欠失したスプライシング変種 PS2V を産生させること、低酸素刺激による PS2V 産生能を増強すること、細胞毒性を示す濃度(1000  $\mu$ M)とは、かけ離れた低濃度(2.5  $\mu$ M)で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) を大きく短縮させることを明らかにした。更に我々は PS2V は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していることを報告してきたので、低濃度アルミニウムによる持続負荷によっ

て PS2V 発現時間が短縮されたことが実際に細胞の生死に反映されているか否かを検討した。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ント (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<sup>1), 2), 3)</sup>。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<sup>2)</sup>。また細胞外へ分泌される A $\beta$  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与す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<sup>4)</sup>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 HMGA1a 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 発現を通じた細胞死について詳細に検討を行った

#### D. 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  $\alpha$ -MEM 培地で培養した。低酸素刺激は既報 1) のように低酸素チャンパー内に dish を置くこと培地中の溶存酸素を低下させることにより実行した。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。

##### 2) PS2V 発現の確認および HMGA1a タンパク質の検出

PS2V の検出は既報 1) に従い、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 法により検出した。HMGA1a 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 HMGA1a に特異的な抗体で Western プロットした。

##### 3) 細胞死の評価

1)で述べた培養条件で飼育した細胞を細胞死評価実験 24 時間前に FCS 除去培地に交換し、刺激を行う。刺激は低酸素、小胞体ストレス (ツニカマイシン)、アルミニウムの 3 種類の刺激を単独あるいは組み合わせて使用した。刺激後、経時的に培養液を回収し、LDH アッセイ、MTS アッセイ、およびヘキスト染色後形態変化のカウント (カウント法) のいずれかの方法で検出し、細胞死を評価した。

#### E. 研究結果

##### 1) 昨年の結果から、通常 PS2V は検出されない低

酸素 12 時間後ではアルミニウム添加により PS2V を検出することが分かっている。即ち PS2V 産生能を増強していると考えられたのでアルミニウム添加後の HMGA1a 発現について検討を行った。用いた用量はアルミニウム 1.0, 2.5, 5.0, 10, 25  $\mu$ M の一過性および 2.5, 25  $\mu$ M の 3 ヶ月間持続負荷である。その結果、アルミニウム負荷濃度に依存的な HMGA1a 蛋白質の発現上昇を認めた。さらに、3 ヶ月間持続負荷群では同じ濃度での HMGA1a 発現量に比べ明らかに増加していた。即ちアルミニウム持続負荷によって HMGA1a 発現誘導が早期より起こり PS2V 産生が早まったものと考えられる。また、アルミニウム 2.5/25  $\mu$ M 持続負荷群において、Al の非存在下では PS2V の産生の観察されない条件である低酸素負荷 6 時間後の核抽出液中に含まれる蛋白質 (HMGA1a) が PS2 pre-mRNA exon5 に強く結合することが確認された。ちなみに昨年報告したように、同用量での持続負荷群、一過性負荷群の間の細胞内アルミニウム含量には差が認められなかった。

##### 2) アルミニウム添加による細胞死の検討 ;

先の実験結果から、アルミニウム持続負荷によって HMGA1a 発現誘導が早期より起こり PS2V 産生が早まったものと考えられるので今回得られた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 2.5、25  $\mu$ M 一過性添加群、持続的負荷群、マルトール 25  $\mu$ M 一過性負荷、持続的添加群にそれぞれ低酸素刺激或いは小胞体ストレスであるツニカマイシン 2  $\mu$ g/ml 刺激または低酸素+ツニカマイシン刺激の組み合わせを行い、その後の細胞死の程度を培養液中に漏出する LDH を測定または、MTS アッセイを行い、同時にヘキスト染色及びプロピディウムヨウ素染色の二重陽性細胞をカウントすることにより細胞死の評価を行った。まず、対照群として評価したアルミニウム単独負荷群は培地交換後、24 時間までマルトール単独負荷群 (一過性、持続性) 及び非添加群との間に細胞死の差異は認められなかった。これに対し、低酸素刺激なし、ツニカマイシン投与群と低酸素刺激+ツニカマイシン投与群に置ける細胞死の程度を比較すると低酸素刺激+ツニカマイシン群では低酸素刺激およびツニカマイシン刺激単独では細胞死の起きない 10 時間の時点で約 20% の細胞が死滅す