

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

I. 考察

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HMGA1a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HMGA1a発現増強にあることを示した。またこのHMGA1a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。今後はアルミニウムがHMGA1a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HMGA1a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。

J. 結論

本年度の検討で、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。今後はアルミニウムの低濃度持続刺激が何故HMGA1aの発現を増強するのかそのメカニズムが注目される。

K. 引用文献

1. Manabe, T., et al.: Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. Cell Death. Diff. in press, 2003
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
4. Katayama, T., et al.: Presenilin-1 mutation downregulates the signalling pathway of the unfolded protein response. Nature Cell Biol. 1, 479-484, 1999.

L. 論文および学会発表 なし。

研究結果の概要

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メカニズムを明らかにすることである。アルミニウムは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ことが明らかになったので、PS2mRNA 前駆体エクソン 5 に結合して異常スプライシングを引き起こさせる HMGA1a の誘導を含めた PS2V 産生機構と細胞死との関係について詳細に検討した。その結果、細胞毒性を示さない低用量の持続的アルミニウム負荷において HMGA1a 誘導が促進され、その結果、PS2V 産生が促進されていた。これに伴い、アルミニウム負荷群では、低酸素+小胞体ストレス刺激による細胞死を促進、増強しており、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り、アルツハイマー病に見られる神経細胞死に関わることが明らかとなった。

研究により得られた成果の今後の活用・提供

本年度得られた結果は、アルミニウムがプレセニリン 2 遺伝子のスプライシング異常誘発能を促進し、孤発性アルツハイマー病の原因の一部を担っている可能性を強く示唆した。すなわちアルミニウムにより誘導又は誘導促進された HMGA1a が PS2V を産生、産生促進し、この PS2V が家族性アルツハイマー病における PS1 変異体同様、小胞体ストレストランスデューサーの活性化を阻害し、小胞体ストレスに対し脆弱にさせる効果を示すと考えられる。従って、アルミニウムによる細胞死が家族性アルツハイマー病における細胞死メカニズムと類似性があることは大変重要であると考えられ、速やかに成果をまとめ論文としていく予定である。

研究の実施経過

1) 家族性アルツハイマー病の発症機構に関する研究

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として知られている PS1 がどのようなメカニズムでアルツハイマー病の病態形成に関与しているかを明らかにすれば、アルツハイマー病の新しい治療方法が確

立できる。そこで PS1 変異体が神経細胞死を起こす機序について細胞レベルで解析した。その結果、PS1 変異体は UPR 活性化機構を負に制御し、分子シャペロン GRP78/Bip の発現誘導を抑制することによって各種の細胞ストレスに対して感受性を増すことを明らかにできた。

2) 平成 11 年度の研究経過

アルミニウムとアルツハイマー病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。たとえば、アルミニウムの脳内投与によって神経原線維変化と類似した変性が生じること、あるいは脳内アルミニウム含量がアルツハイマー病患者では高いという報告など両者の関連性を指摘する研究成果も数多く報告されている。しかし、その詳細な分子メカニズムに関して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。

一昨年度は、培養細胞にアルミニウム刺激を行い、小胞体ストレス応答性に対する影響を検討した。神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞の培養液中に高濃度のアルミニウムを添加し小胞体分子シャペロン GRP78 の誘導を調べた。アルミニウムそのものは GRP78 の誘導に何ら影響を与えなかった。それに対し、アルミニウム添加後小胞体ストレス負荷を行うと、GRP78mRNA の発現誘導が障害された。それと同時に、アルミニウムを添加していない細胞よりも明らかに早く細胞死を引き起こした。従って、アルミニウムは GRP78mRNA の誘導機構に影響を与え、小胞体ストレスに対し脆弱にさせる効果を示すと考えられた。

3) 平成 12 年度の研究経過

アルミニウムが 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、更には前 2 者とは異なる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。これらのことからアルミニウムが家族性アルツハイマー病における PS1 変異体同様、小胞体ストレストランスデューサーの活性化を阻害し、小胞体ストレスに対し脆弱にさせる効果を示すと考えられた。

4) 平成 13 年度の研究経過

アルミニウムがプレセニリン 2 遺伝子の異常スプライシング産物 PS2V の産生に関わることを明らかにし、これまで低酸素で誘導されることのみ知られていた同因子を低濃度で引き起こし孤発性アルツハイマー病の原因の一部を担っている可能性を強く示唆した。すなわちアルミニウムにより産生又は産生促進された PS2V が家族性アルツハイマー病における PS1 変異体同様、小胞体ストレストランスデューサーの活性化を阻害し、小胞体ストレスに対し脆弱にさせる効果を示すことをほぼ確実にした。

5) 本年度の研究経過

本年度は、アルミニウムが PS2mRNA exon5 に結合して異常スプライシングを引き起こす HMGA1a を誘導又は誘導促進し、その結果、PS2V を産生、産生促進し、この PS2V が家族性アルツハイマー病における PS1 変異体同様、小胞体ストレストランスデューサーの活性化を阻害し、小胞体ストレスに対し脆弱にさせる効果を示すことを実証した。従って、アルミニウムによる神経細胞死促進効果は家族性アルツハイマー病における細胞死メカニズムと類似性があり、発症の増悪因子として関わる可能性を示唆した。

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：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）

分担研究者 高島明彦 理化学研究所アルツハイマー病研究チーム

研究要旨

アルツハイマー病は老人斑、神経原線維変化、神経細胞脱落が病理学的特徴である。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 β -会合という2つの自己会合を生じる毒性を示すのは β -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、 β -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。

A. 研究目的

社会が急速な高齢化社会を迎えるに当たって老人性痴呆症の克服とその基礎過程となる脳老化の解明が今後の社会のあり方について大きな影響を与える課題となっている。脳老化というのは記憶力の減退、名前が思い出せないというのを実感とする現象ですが、脳老化を研究対象とする上では実体として何が脳の老化を示すかという明確な指標が必要となります。さらに付け加えれば、その指標は老化に伴う脳機能低下を説明することのできるものでなければなりません。Strehlerは老化の定義として普遍性、内在性、進行性、有害性を挙げています。私たちの研究室では、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ています。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理学的変化です。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ます。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 β -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

E. 研究方法

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ーにより精製されたものをすべての実験で使用した。β-アミロイドストック溶液は1 mg/mlになるように HFIP にペプチドを溶解しシリコンチューブで20°C に保存した。

ThT アッセイ：β-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。ストック液のβ-アミロイドは凍結乾燥により HFIP を除去しそこに20mM Tris-Cl を加え溶解した。そこに、10 μM になるように ThT を加え 96 穴ブラックプレート内でインキュベートし、アグリゲーションを excitation 444nm および emission 485nm にて 20 分間隔で測定した。

OD214 によるβ-アミロイドアグリゲーションアッセイ：β-アミロイドのトータルアグリゲーションを測定するためインキュベーション後 10 万 G10 分超遠心機によりアグリゲーションを沈殿させ最初のアミロイド濃度、および、上清に来るβ-アミロイド濃度を OD214 で測定し濃度差によって何パーセントのβ-アミロイドがアグリゲーションして沈殿になったかを調べた。

CD spectroscopy：β-アミロイドのアグリゲーションの構造を決めるためβ-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。

コンゴレッド染色：β-アミロイドの十号により生じたβ-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。

電子顕微鏡観察：会合したβ-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。

細胞：毒性試験に用いる細胞としてヒト腎臓由来株化細胞 HEK293 およびラット海馬初代培養細胞を用いた。HEK293 は 10%牛胎児血清を含む DMEM 中で培養を行った。ラット初代培養細胞は Neurobasal に B27 を添加して培養を行った。

MTT アッセイ：β-会合したアミロイドの毒性は HEK293 細胞またはラット初代培養細胞にアミロイド添加後測定時点で MTT 溶液を培養液に加えさらに 2 時間インキュベーションする。その後細胞は 50%dimethylformamide, 20% SDS 溶液によって溶解し、溶解液を 570nm の吸光度を測定する。吸光度の低下が細胞毒性を示すことになる。

研究結果

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 μM アルミニウム、鉄、亜鉛、銅をβ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βアミロイドと比べると減少していた。亜鉛、銅添加ではβ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βアミロイドのβ会合に抑制的に作用することが明らかになった。β会合抑制の金属濃度は約 0.1 μM 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β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β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β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β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βアミロイドの凝集を促進するがその凝集はβ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βシートを示すのだが、

金属存在かではβアミロイドはランダムコイルからβ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βアミロイドのβ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。これらは更にコンゴレッドを用いた偏光顕微鏡観察および電子顕微鏡観察によって示された。偏光顕微鏡下では金属非存在かでβアミロイドの凝集体は複屈折性を示したが金属存在下では複屈折性を示さなかった。電子顕微鏡下では金属非存在下の凝集体はベータアミロイド繊維の集合体として捉えられた。しかし、金属存在下では特定の構造を示さないアモルファス凝集体であった。それぞれの凝集体による細胞毒性を HEK293 及びラット海馬初代培養細胞を用いて検討した。金属なしでのβアミロイド凝集体はこれまでの報告どおり MTT の低下を示した。金属存在下で凝集させたアミロイドは金属イオン濃度に依存してβアミロイドの細胞毒性を減弱した。

D. 考察

疫学的検討から金属イオンはアルツハイマー病の危険因子である可能性が指摘されている。われわれはアルツハイマー病の発症を脳老化とβアミロイドの増大という2つの因子によって引き起こされると考え、今回、βアミロイドの凝集に対する金属イオンの効果を調べた。これまで報告された結果では金属イオンの存在はアミロイド凝集を促進するというものであった。実際にトータルな凝集程度は金属によって促進されたのであるが、その凝集はβ会合を持たない凝集体であることが示された。おそらく、金属イオンとβアミロイドのヒスチジン残基が結合しそれらが凝集するためβシート構造のような一定の構造を持たない凝集体になるものと予想される。これらが、細胞毒性を持たないという結果はこれまでのβアミロイドの細胞毒性に関する結果を支持するものである。βアミロイドの毒性はβシート構造を持つ線維状の構造物によって引き起こされることは初期のβアミロイドが毒性を持つか否かの論争から明らかになった事である。近年さらにプロトフィブリルと呼ばれる少なくともβシート構造を持つ初期のアミロイド凝集物が神経毒性を示すという議論をわれわれの結果は否定しない。すなわち、金属イオン存在下で出来るアミロイド凝集体はベータシート構造をとらないために細胞毒性を示しえないのである。少なくともこれらの結果から金属イオンの存在はアミロイド凝集に対しては逆にβ会合を抑制し細部毒性を減弱することが示された。

M. 結論

金属イオンの存在はアミロイド凝集に対してはβ会合を抑制し細部毒性を減弱することが示された。更に、脳老化に対する影響を今後検討する必要がある。

G. 健康危険情報

特記すべきことなし。

H. 研究発表

3. 論文発表

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-3β 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-3β 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 β -amyloid peptides through β -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., Takashiima A. Intracellular A β is increased by okadaic acid exposure in the transfected neuronal and non-neuronal cell lines. Neurobiol. of Aging 23, 195-203 (2002)

2. 学会発表

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

3. 特許取得

なし。

4. 実用新案登録

なし。

4. 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研究)

分担研究者 飯塚舜介 鳥取大学医学部医学科・医療環境学

研究要旨

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。そこで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。Al-glycine, Al-serine, Al-glutamine 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-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。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。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。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。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。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。

A. 研究目的

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) 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1g/l

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

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}\text{HSQC}$ の測定は Varian Unity Inova-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 = 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, ^{13}C :21.2ppm とした。

3) アルミニウムの分析

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。

4) DNA のアガロースゲル電気泳動

細胞を破碎し、DNA を抽出した。抽出 DNA を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、DNA の低分子分解物のバンド構造を確認した。DNA の分解産物をマーカーとして用い、染色はサイバークリーンを用いた。

C. 研究結果

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-glutamine 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-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、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。

D. 考察

生体内の Al のケミカル・スペシエーションについては、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暴露がある場合に、疾病との関連があるかもしれない。

低濃度の Al 刺激によって細胞はアポトーシスを起こすが、濃度が高い場合には、アポトーシスが見られなかった。アポトーシスを抑えるような異なっ

た毒性発現の機構がは働いているかもしれない。Al-citrate として血液・脳関門を通過するという説がある。溶液中ではアニオンの交換反応で、多種類の化学種が平衡状態で存在していると考えられる。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おり、アミノ酸錯体として存在していることも十分考えられる。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示唆する。

今回の研究においては、Al の活性種として、アミノ酸錯体の可能性を検証したところ、十分その可能性があることがうかがわれた。また、脳に対する環境汚染物質の影響を考えると、直接神経細胞に対する影響が出る場合と、神経細胞を支えるグリア系の細胞に対する影響が、間接的に神経細胞に現れて来る場合が想定される。今回、低濃度の Al 刺激によってアストロサイトが、アポトーシスを起こすことが示された。外来物質に対して神経細胞を防御するように働くアストロサイトへの影響は注目される。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。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。

E. 結論

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

特になし

G. 研究発表

1. 論文

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 p136 (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).

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）

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：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アルミニウムの神経毒性について）

分担研究者 大河内正康 大阪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、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なった。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、核周囲に局限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。

キーワード：アルツハイマー病、アルミニウム、プレセニリン、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曝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響、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曝露実験も行った。

B. 研究方法

1) 培養細胞系：

プレセニリンPS1の野生型、プレセニリン変異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 $1. \times 10^5 / \text{cm}^2$ 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。

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

ていない継代後 24 時間目に 1 時間曝露培養し、培地で洗浄した後、さらに DMEM 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。また継代後 4 日目に 24 時間曝露した実験も行った。

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-synaptophysin (SY38, 1:25)、anti-APP (6E10, 1:250)、anti-JIP-1 (M-300, 1:200)、Rhodamine-Phalloidin (1:40)、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・シス細胞の同定 :

10 μ 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・シス細胞を同定した。

6) 生細胞の形態観察 :

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

C. 研究結果

柏木らの研究(1)により、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 1 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するという実験がおこなわれた。その研究において神経細胞死に至る経過が最も検討し易い至適濃

度として 250 μ M の濃度が選択された。本実験系で用いられた SH-SY5Y 細胞、および HEK293 細胞においても様々なアルミ濃度において細胞死の評価を行い、継代 24 時間目に aluminum·maltol を曝露し、3 日後に観察し、アルミ濃度としては 250 μ M ~ 2 mM までの範囲内で検討が行われた。

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 μ 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 μ 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 μ M では、ニューロフィラメント L が野生型でもプレセニリン変異群でも、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。2 mM の Al-Mal 曝露においては Control、wild type、プレセニリ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リ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リン変異の有無における有意な差は認められなかった。

次に、APP の突然変異を導入した細胞系に

において、アルミニウムパルスによる細胞死への影響を調べたところ、APP変異（スウェーデン型）においてはアポトーシスが増加しており、250 μ Mでは有意差を認めなかったものの1 mMおよび2 mMのアルミ暴露においては有意な増加を認めた。次にJIP-1とAPPの二重染色においてAPPの分布には相違が認められなかったが、1 mMと2 mMのAl-Mal暴露の場合、APP変異においてJIP-1の分布がより局在化し、その染色性も増強が認められた。

D. 考察

アルツハイマー病におけるアルミニウムの神経毒性を検討するために、これまで主にアルミニウムの慢性投与による動物実験などが行われてきた。また家族性アルツハイマー病の関係ではAPP変異と酸化ストレスとの関連やアミロイドフィブリル形成にアルミニウムが促進的に関与する可能性が示されている。以前に本研究において、プレセニン変異ノックイン・マウスの脳切片において、wild typeとheterozygousではneurofilament陽性の線維状構造物が認められたのに対して、homozygousでは明らかな線維構造は認められず、大脳皮質形成過程の遅延を認めた。さらに、この変異プレセニン1ノックイン・マウスの胎生9日目にアルミニウムを母体の腹腔内に投与すると、heterozygousでも、明らかな線維構造が認められなくなるなど、アルミニウムの神経細胞障害に対してプレセニン1変異が促進的に働くことを示したが、プレセニン変異とアルミニウム毒性については十分な知見があるとはいえない。

以前、我々はラットの初代培養の神経細胞を用いたアルミニウム毒性の研究において、神経細胞死が認められない段階での細胞骨格系及び軸索輸送系の変化、および遅延性の神経細胞死（アポトーシス）を見出した。今回の研究においては、アルミニウム毒性とアルツハイマー病との関連を詳しく調べるために、家族性アルツハイマー病発症型の突然変異を導入した培養細胞系でアルミニウム・ハルスがどのような細胞障害性をもたらすかの検討をおこなった。

プレセニン変異においてはアルミニウム・

マルトール250 μ 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 mMに上げるとスローコンポネンタ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暴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、アルミニウム暴露を行ったところ、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 mMおよび2 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変化の可能性が考えられる。

最近得られた知見によると、ファーストコンポーネントのキネシンとAPPが直接に結合し、APPとプレセニンおよび β セクレターゼを含む複合体が軸索輸送されるとされる。本研究の結果、これらの軸索輸送系の障害にプレセニン変異やAPP変異、およびアルミニウム暴露の影響が加わることで、細胞内軸索輸送の障害が生じ、その結果として逆行性輸送障害による神経栄養因子の欠乏を呈して、アポトーシスに至るという事も一因であると考えられた。

また、APP変異はアルミニウムによる神経細胞毒性においてプレセニン変異よりも脆弱性を示したことは、アミロイド β による細胞障害やアポトーシスの促進など他の因子の関与も示唆される。

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、家族性アルツハイマー病においても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

送障害やアポトーシスなど細胞死がアルツハイマー病の病態に関与している可能性が示めされた。

E. 結論

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。またAPP変異では細胞死が有意に増加しており、アルミニウムによる神経細胞毒性において脆弱性を示した。

F. 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., and 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 Letters*, 455:83-86, 1999

4) Tanii H, Ankarcrona M, Flood F, Nilsberth C, Mehta ND, Perez-Tur J, Winblad B, Benedikz E, Cowburn RF. Alzheimer's disease presenilin-1 exon 9 deletion and L250S mutations sensitize SH-SY5Y neuroblastoma cells to hyperosmotic stress-induced apoptosis. *Neuroscience* 95(2): 593-601, 2000

5) 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, 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* 21: 5408-5416, 2002

研究成果の刊行に関する一覧表
雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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)	313-318	2002
Manabe, T., et al	Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease	Cell Death. Diff		in press	2003
Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Hashikawa T, Tominaga T, Ichikawa M, Yamaguchi H, Takashima A	Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau	J. Neurosci	22 (1)	133-141	2002
Meshitsuka S, Aremu DA, Nose T	A risk of Alzheimer's disease and aluminum in drinking water	Psychogeriatrics	2	263-268	2002
Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tani H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsudo T, Kudo T, Takeda M, Haass C	Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1	EMBO J	21	5408-5416	2002

20020949

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.33の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。