

2003/298

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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 15 年度総括研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 16 年 (2004 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

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……………15

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……………19

—異常スプライシング因子とA β 凝集—

遠山 正彌

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研究……………23

飯塚 舜介

5. アルミニウムの神経原線維変化形成における役割……………27

高島 明彦

6. コリナージックニューロンのアセチルコリン分泌におけるアルミニウムの影響……………30

橋本 亮太

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………34

IV. 研究成果の刊行物・別刷……………35

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

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

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院・ポストゲノム疾患解析学講座・精神医学

研究要旨

アルミニウムの体内・脳内への取り込み・排出そして体内での代謝・排泄経路を明らかにすることは本研究課題の重要な基礎をなし、この点について詳細な検討を加えてきたが本年度は未知の課題である〈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〉に取り組んだ。その結果、低濃度のアルミニウムがアストロサイトに取り込まれ、caspase cascade の活性化を促しアポトーシスを引き起こすことを示した。

アルミニウムは小胞体の活性化を阻害して小胞体ストレス時に、小胞体分子シャペロン GRP78 発現誘導の減弱させ、小胞体ストレスに対する感受性を増強させる。さらに、アルミニウムは培養細胞の機能に影響を及ぼさない用量で HMGA1a の発現を促進させ、アルツハイマー病関連遺伝子プレセニリン 2 のエクソン 5 を欠く異常スプライシング変種 (PS2V) 産生を促進させた。今年度はアルツハイマー病に特徴的な病理学的所見として報告されている A β の凝集・沈着がアルミニウム・PS2V により影響を受けるか否かについて、他の金属群との比較を含めて検討した。その結果、アルミニウムを含む金属または PS2V 蛋白質による A β の凝集は同様に促進されたが、 β シート構造形成については抑制される傾向が明らかとなった。

さらに、アミロイドベータ蛋白フィブリル形成およびその中間段階であるアミロイド・プロトフィブリル形成について検討を重ねてきたことを利用してこの点について更に検討した。その結果とアルミニウムなどの金属はアミロイドベータ蛋白の単量体が神経毒性を呈するオリゴマーに移行するのを促進し、かつプロトフィブリル形成速度を遅延することによって、最終的にオリゴマーが組織に長期間留まる可能性が示唆された。

次に、我々はアルミニウムの神経毒性の本体に迫る研究を例年続けているが、本年度は以下の結果を報告する。神経の変性に至る前の神経可塑性の変化について検討した。AMPA 刺激後のグルタミン酸受容体の神経細胞内移行を観察したところアルミニウムは神経細胞のプロテアソーム活性を直接減弱するか、ER ストレス反応を減弱することによってプロテアソームに負荷をかけることにより、グルタミン酸受容体の細胞内移行を減弱した。従って、アルミニウムは LTD 形成に影響する可能性が示唆され、神経可塑性を変化させる可能性が示唆された。

神経細胞へのアルミニウムなど金属の影響を神経細胞の生存度と形態の二つの側面から検討した。その結果、アルミニウムなどの金属は、その濃度、投与期間、神経細胞死の誘導法によって、神経細胞毒性または保護作用を持つことが示唆された。

最後にモデル動物を用いた今年度の実験結果について報告する。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られる。前回アミロイド毒性に対する金属イオンの効果を調べたところ金属イオンはアミロイドが引き起こす細胞毒性を減弱することを示した。今回、神経原線維変化形成に対するアルミニウムの効果を調べるため、タウトランスジェニックマウスにアルミニウムを接種して検討を行った。これまで一回接種で30日後までを調べたが、対照と比べて有意な差は見出されなかった。

以上のように、今年度の成果をまとめるとアルミニウムのアミロイド凝集への効果を介してアルツハイマー病発症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、金属、神経細胞死、アミロイド

A. 研究目的

神経細胞と血管の間には、必ずグリア系細胞が存在することが知られている。グリア系細胞は血液脳関門を構成しており、外部環境より脳内に取り込まれた毒性物質が、まず影響を与えるのはグリア系細胞である。神経細胞とグリア系細胞の相互作用の詳細がしだいに明らかになり、グリア系細胞が単に神経細胞を維持しているだけでなく、高度な制御に携わっていることが分ってきた。そこで、アルミニウムの脳内での代謝・排泄の影響を見るためにアストロサイトをを用い、アルミニウムの影響を研究した。

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、アルミニ

ウムによる細胞毒性を示す濃度(1000 μ M)とは、かけ離れた低濃度(2.5 μ M)で持続負荷した群でPS2V産生促進することを明らかにした。ADの大多数を占める孤発性AD(SAD)患者脳において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。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。今回はアルミニウム或いはアルミニウムにより産生促進されたPS2VがA β 凝集および β シート構造促進に影響を与えるのか否かについて、特に生理的条件においてアルミニウムを中心に他の金属類も含めて検討した。これに関連してさらに老人斑の形成過程にアル

ミニウムなどの金属がどのように関与しているかを詳細に検討することとした。

アルミニウムの神経毒性に関して今回は、アルミニウムが神経変性に至る前段階の神経細胞の生理的機能特に可塑性に対し如何なる影響をもたらすのかを明らかにするため、Mild Cognitive Impairment (MCI)段階でアルミニウムが関与するのかどうかについて検討した。昨年度の検討では、マウスのプライマリーカルチャー神経細胞にアルミニウムを負荷しテタヌス刺激を加えると、アルミニウム投与群では、アルミニウム非投与群に比べ軽度の低下がみられるが、Long Term Potentiation(LTP)はほぼ正常に誘導されるが、その後の経過は、LTP の有意な低下がみられ、その低下は時間経過とともに進行していくことが観察された。この電気生理学的結果は、アルミニウムが神経の可塑性に影響を与えることを示唆している。LTP および Long Term Depression(LTD) のはグルタミン酸受容体の挙動によって調節を受けているとされているが、本年度はこのグルタミン酸受容体の挙動に対するアルミニウムの影響について検討した。

更にアルミニウムの神経毒性に関して検討を加えた。アルツハイマー病ではマイネルトの前脳基底核を中心とするコリン作動性ニューロンの障害・脱落が重要であると考えられている。その結果、髄液のアセチルコリンやコリンアセチルトランスフェラーゼなどの減少をきたし、アセチルコリン系の活性が低下すると考えられている。アルミニウムの神経毒性は、ある一定以上の濃度で認められることは知られているが、さらに低濃度の日常暴露されるアルミニウムによる神経毒性についてはまだよく知ら

れていない。そこで、本研究では、アルミニウムの培養神経細胞に対する神経毒性または神経保護効果を、ルビジウム、セシウム、リチウムなどの他の金属と比較することにより、検討した。

本年度のモデル動物実験としてアルツハイマー病同様の神経原線維変化を示すマウスモデルを用いてアルミニウムが神経原線維変化形成へおよぼす影響を検討した。

B. 研究方法

(1) アストロサイトを用いたアルミニウムの影響実験

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。細胞は観察したものは全てGFAP陽性細胞であることを確認した。

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、6時間培養の後、新鮮な培養液と交換した。Hoechis33258色素で染色後蛍光顕微鏡で観察した。細胞核の凝縮の程度は画像解析ソフトのScion Image Beta 4.02を用いて解析した。

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。

全たんぱく質含量が20 μ g/mlの条件でSDS-PAGEを行った。定法によりBcl-2, Bax, PARP, Laminに対するそれぞれのモノクローナル抗体を用いフィルムに

感光させた。標準として α -チューブリンを用いた。

(2) PS2V が A β 凝集および β シート構造促進に与える影響実験

A β 1-40 塩酸塩を使用し、プロパノールのパーフルオライドである HFPA で処理し、蒸留工程を2回繰り返すことにより、HFPA を選択的に除去すると共に、未凝集の A β を調製した。

① 凝集塊のサイズについて

紫外可視領域における吸収散乱スペクトルを用いて解析した。すなわち、散乱光の波長の変化によりサイズ変化とした。

② β シート構造について

β シート構造を特異的に認識する蛍光色素であるチオフラビン-T (ThT) を利用し、蛍光スペクトルを用いて測定した。

銅 (II)、鉄 (II)、Al (III) の塩化物の3種に加え、有機アルミニウムの代表としてアルミニウムマルトール (Al-Mal) を用いた。

バキュロウイルスベクター pVL1393 に PS2V の GST 融合蛋白質を発現させるコンストラクトを構築し、バキュロウイルスを作成し、Sf21 昆虫細胞に感染させた。発現した GST-PS2V リコンビナント蛋白質をグルタチオンセファロース・FPLC を用いて精製し実験に供した。

(3) アミロイド・プロトフィブリル形成についての検討

HEK293 細胞に野生型プレセニリンとスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現させ、定法により培養した。培養液にアルミニウムマルトールを添加し、培養上清をそれぞれ回収した。回

収した培養上清をアミロイドベータ蛋白抗体(4G8)で免疫沈降、SDS-PAGE 後、ニトロセルロース膜に転写した。定法によりアミロイドベータ蛋白抗体(6E10)を用いてフィルムに感光させた。またサンプルの半量を同様に免疫沈降した後、マスマスペクトロミーで解析した。

野生型プレセニリンとスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現した細胞を回収し、定法により粗膜分画を抽出した。粗膜分画にアルミニウムマルトールを添加し、37°C,30 分間インキュベートした。超遠心上清と沈降物を超音波破碎の後、再度超遠心して回収した上清を 4G8 で免疫沈降し、ウェスタンブロッティング及びマスマスペクトロミー解析を行った。

(4) アルミニウムは LTD 形成に影響するかどうか

妊娠 14.5 日齢の胎児脳を摘出し、トリプシンおよび DNase I で処理後、6 穴シャーレに培養した。細胞表面にあるグルタミン酸受容体に細胞外部位を認識する抗体を結合させた。培養液に tetrodotoxin (1 μ M)、D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (50 μ M)、AMPA (100 μ M) を加え、15 分間反応させ、4%パラホルムアルデヒドで固定した。FITC 標識の2次抗体を反応させた後、0.1%の Triton X-100 で細胞膜を処理した。細胞内にあるグルタミン酸受容体2を受容体2に対する抗体および Cy3 標識の2次抗体で検出した。

この受容体の細胞内移行をプロテアソーム阻害薬およびアルミニウム存在下で比較検討した。AMPA 刺激後、一部の細胞は、

ウエスタン法にてグルタミン酸受容体 2 を検出した。

マウスプライマリーカルチャー神経細胞の培養液に 100 μ M アルミニウムマルトールを添加し、24 時間後細胞をライシスし、キモトリプシン様プロテアソーム活性および ER ストレスマーカー(リン酸化 eIF2 α) についてウエスタン法を用いて検討した。

(5) 神経細胞へのアルミニウムなど金属の影響

生後 2-3 日のラット脳から大脳皮質を取り出し、5% FCS (ウシ胎児血清)、5% HS (ウマ胎児血清) を含む DMEM 培地にて培養を行った。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を作成し、ルビジウム、セシウム、リチウムは、それぞれ 1M の塩化ルビジウム、塩化セシウム、塩化リチウムのストック溶液を作成し、希釈の上、培地に添加した。神経細胞培養 6 日後に、それぞれの濃度のアルミニウムを添加し、その 48 時間から 7 日後に細胞死のレベルまたは細胞の形態を検討した。また神経細胞死は、栄養欠乏 (ウマ胎児血清剥奪)、酸化ストレス (H₂O₂ 添加)、興奮性神経細胞毒性 (グルタミン酸添加) を用いて誘導した。神経細胞死は、ミトコンドリアにおける酵素活性を反映する MTT アッセイを用いて測定した。神経細胞の形態は、1) 神経細胞のマーカーである MAP2 抗体による免疫染色、2) 神経細胞へのシンドビスウイルスを用いた GFP (green fluorescence protein) の感染による蛍光標識によって検討した。

(6) モデル好物実験

実験は non-Tg および V337MtauTg (4 ヶ月令)それぞれ、4 匹を用いて行われた。アルミニウムは 10 mM の最終濃度で 0.2ml をマウス腹腔内へ注射した。コントロールとして PBS を注射した。それぞれの期間飼育後、脳を取り出し半脳を生化学残りをブアン固定液にて固定し抗体染色を行った。生化学実験では組織はホモジェネートされ RAB, RIPA、Formic Acid に可溶性の画分のタウ蛋白についてウエスタン法によって解析を行った。

C. 研究結果

アミノ酸の選択的あるいは、非選択的ブロッカーの存在状態で、Al アミノ酸錯体の取り込みを測定した。グルタミンおよび、グリシンのトランスポーターの EAAT2 および GlyT1 に対する選択的ブロッカーであるジヒドロカイニン酸、サルコシン、また、グルタミン酸およびグリシントランスポーターの非選択的ブロッカーである trans - pyrrolidine - 2,4 - dicarboxylic acid および、Doxepin を用いて取り込みの実験を行った。いずれのブロッカーについても Al アミノ酸錯体を用いた Al の取り込みに対する阻害作用は観測されなかった。ウワバインの存在下においても、同様に取り込みの阻害作用は観測されなかった。

Al-Gly を培養液に添加して、6 時間暴露し、その後 1 から 10 日間培養し、毒性の発現を観察した。培養細胞を Hoechst33258 色素で染色したところ、細胞核の凝縮が 10%以上の細胞に観測された。様々な濃度条件で暴露したところ、0.0125mM の Al-Gly 濃度でもアストロサイトにアポトーシスが観測された。

実験に用いた全ての金属においてThTの蛍光強度が減弱したことから、金属はA β の β シート化を抑制することが示唆された。生理的な濃度条件では金属を添加していないコントロールレベルの凝集様式と同様に β -シート化を抑制しながら進行して行く結果が得られた。アルミニウムもほぼ銅と同様の変化が見られ、有機・無機化合物間の差はほとんど認めなかった。対照と比較し、散乱光強度が大幅に増加したことから、PS2Vは β シート化を伴わない凝集を促進することが分かった。

細胞にアルミニウムマルトールを負荷して培養すると、48時間、72時間、98時間後の培養上清中のアミロイドベータ蛋白単量体の量は対照に比べ有意に減少していくことが明らかとなった。減少の程度はアルミニウムマルトール濃度依存的で100 μ M、96時間後では対照の約50%にまで減少していた。

培養細胞をHoechst 33258色素で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。細胞核の凝縮の程度はアルミニウムマルトール20から100 μ Mの濃度では対照と差がなく、この減少が生細胞の比率が低下したことによるのではないことが明らかとなった。また、マスマスペクトロミーを用いた解析で、分泌されたアミロイドベータ蛋白の分子種にはなんら変化が認められなかった。

次に、細胞から抽出した粗膜分画にアルミニウムマルトールを0,2,10,50 μ Mの濃度で添加し、産生されるアミロイドベータ蛋白の量をウェスタンブロットング法で、その分子種をマスマスペクトロミーを用いた

解析で検討した結果、両者とも対照と比較して差が認められなかった。

プロテアソーム阻害薬をAMPA刺激20分前から作用させると、阻害薬なしで観察されるグルタミン酸受容体2の細胞内輸送が観察されなくなった。アルミニウムマルトールを培養液中に添加し、AMPAで刺激した。アルミニウム非添加細胞ではグルタミン酸受容体2の細胞内移行が観察されたが、アルミニウム存在下では細胞内移行が減少していることが示された。アルミニウムを神経細胞に作用させると、アルミニウム濃度依存性にキモトリプシン様プロテアソーム活性を阻害することが示された。また、24時間のアルミニウム暴露はERストレスによるeIF2 α のリン酸化を阻害することが示された。

アルミニウム添加によるラット大脳皮質初代神経培養細胞は、48時間の暴露にて25 μ Mから500 μ Mの濃度で70%–20%で細胞死が認められた。形態的な検討では樹状突起の免疫反応性の減少が認められた。低濃度のアルミニウム(0.01–10 μ M)の長期暴露(7日間)による神経細胞の生存度と形態を検討した。その結果、この濃度域では、アルミニウム単独による神経毒性は認められなかった。神経細胞の形態を詳細に検討したが、アルミニウム暴露による著明な変化は認められなかった。過酸化水素(50 μ M、12時間暴露)による神経細胞死に対する低濃度・長期アルミニウム暴露の効果を検討した。その結果、0.01–1 μ Mの濃度において、神経細胞死を亢進し、10 μ Mの濃度におい

て、神経細胞保護的にはたらくことが認められた。

動物にアルミニウム添加 1 週間後、4 週間後の結果はほぼ同様であった。脳切片の巨視的観察では対照 PBS 投与群とアルミニウム投与群の間で目立った変化は見られなかった。リン酸化タウ抗体 PHF1, AT8, PS396 の染色性も対照群とアルミニウム群で差を見出すことはできなかった。

D. 考察

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。しかし、アミノ酸錯体として細胞に取り込まれているのか、あるいは別の化学形で存在するのかは今のところ分らない。アミノ酸錯体がよく取り込まれたことは、Al 錯体の溶解度が高いことによって説明されるかもしれない。

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に、このような 0.0125m の低濃度のアルミニウムでアポトーシスが観測されたのは例がない。アルミニウムの毒性は一層の研究が必要である。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。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。

結果に示したとおり、今回用いた金属は全ての種において凝集の促進を示したが β シート化は抑制する傾向にあった。従って今のところ金属共存下で起こる凝集は A β 単独で起こる凝集体と高次構造が異なることから細胞死が起こる機序も異なるのではないかと考えている。特に A β に結合した金属が引き起こす細胞死は金属の持つ Reactive Oxygen Species (ROS) を介する経路が支配的であると予測され、今後はこの点を明らかにしていきたい。

PS2V 蛋白質は A β と共存させた場合において金属同様 A β 凝集の促進を示すものの β シート化は抑制した。一方で、PS2V は各種金属により産生増強されることから金属による PS2V 産生増強が脳内の A β 蛋白質量の増加と β シート構造を取らない凝集体の形成に促進的に働いている可能性が示唆された。

前回アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、アミロイド蛋白のベータ重合を阻害すること、またフィブリル形成やその中間段階であるプロトフィブリル形成の遅延に関与していることを明らかにした。さらに今回、実際に生きた細胞でもアルミニウムを負荷することにより、分泌される

アミロイドベータ蛋白単量体が減少し、結果としてアミロイドベータ蛋白オリゴマーなどの前駆体形成が促進されている可能性を示した。

最近、アルミニウムを APP トランスジェニックマウスに投与し続けると老人斑の形成が促進されると報告された。この結果は単純に考えるとアルミニウム負荷によりアミロイドベータ蛋白の産生が増加するか、または分解が遅延する可能性が考えられる。しかし、培養細胞にアルミニウムを負荷してアミロイドベータ蛋白の分泌量が増加したという現象は現在のところ明らかにはされていない。今回我々の得た知見を基に考えると、むしろ第三の可能性、つまり凝集過程の変化がもたらした結果なのかもしれない。

アルミニウムが神経可塑性に如何なる影響を与えるのかを検討し、アルツハイマー病の初期段階あるいは MCI とアルミニウムの因果関係について検討した。

神経細胞はグルタミン酸刺激により細胞表面のグルタミン酸受容体の量を調節することにより、神経可塑性即ち LTP や LTD を発現するとされる。アルミニウムの添加も AMPA によるグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行を阻害することが、今回の検討で明らかになった。同時に行った、プロテアソーム活性の測定によれば、アルミニウムはプロテアソーム活性そのものを減弱することが明らかになり、それが受容体代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

また、アルミニウムは ER ストレスによる eIF2 α のリン酸化を阻害し、ER ストレス反応を減弱することが示された。ER スト

レスによって生じた **unfolded** 蛋白はプロテアソームによる小胞体ストレス関連分解 (ERAD) 機構により分解代謝を受けるが、ER ストレス反応の減弱はこの分解機構に負荷をかけ、プロテアソーム活性を減弱する可能性がある。

短時間投与のアルミニウムが、他の金属より低濃度で細胞死を誘導し、さらに低濃度における長期暴露によって酸化ストレスによる細胞死を増強することは、アルミニウムの神経毒性によるアルツハイマー病の発症仮説を支持するものである。しかし、ある濃度においては、長期投与により酸化ストレスによる神経細胞死を軽減することも認められた。他の金属であるリチウムには神経細胞保護作用が認められるが、その濃度域は非常に狭くそれ以上の濃度では神経細胞毒性をもつことや細胞種によって神経細胞毒性・神経細胞保護効果の濃度が異なることが報告されている。よって、アルミニウムにおける神経毒性・神経保護効果も同様にその細胞種、濃度によって微妙な違いがあることが予想される。

動物実験では今回の実験条件下ではアルミニウムが神経原線維変化形成に関与するという証拠を得ることは出来なかった。使用した濃度は培養細胞を用いた実験を参考にしたものであり、設定濃度が適切であったかどうかは問題となる。腹腔内注入したアルミニウムが脳内へどのくらい移行するかもわからないため、この実験結果を以ってアルミニウムは神経原線維変化形成に関与しないという結論は見出せない。今後この実験を継続する上で脳内アルミニ

ウムのモニター及び細胞内アルミニウムの定量が不可欠である。

E. 結論

Al-アミノ酸錯体を投与すると、アストロサイトによって Al がよくの取り込まれた。低濃度の Al-アミノ酸錯体が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。

PS2V 及びアルミニウムがアルツハイマー病の特徴的病理像である A β 蛋白の凝集に関与するか否かを検討した。その結果、A β 凝集自体の促進は認められるが、細胞毒性を示すといわれている β -シート化凝集という観点においては抑制した。さらにそのメカニズムはアルミニウムなどの金属が一定の濃度以上に存在すると、オリゴマーが組織に長期間留まり、神経細胞に障害を与える可能性が示唆された。

アルミニウムは神経細胞のプロテアソームに負荷をかけることにより、グルタミン酸受容体の代謝に影響を及ぼし、LTD 形成に影響する可能性が示唆され、神経可塑性を変化させる。さらにアルミニウムの長期暴露を培養神経細胞に行うと、低濃度において神経細胞に対する直接的な毒性は認められなかったが、酸化ストレスによる神経細胞死を亢進することが示された。また、ある濃度では、神経細胞死に対して保護的にはたらくという結果が得られた。アルミニウムの長期暴露は、リチウムのように濃度域によっては、神経毒性または神経保護作用を持つ可能性が示唆された。

今回の動物実験ではアルミニウム注入は神経原線維変化形成を促進しなかった。脳内アルミニウム濃度を測定しつつ再度実

験を行う必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

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

Aremu DA, Sakurai A, Meshitsuka S. Uptake of aluminum amino acid complexes in cultured astrocytes. *Biomedical Research Trace Elements* 15(1) in press (2004).

Matsuzaki S, Manabe T, Katayama T, Nishikawa A, Yanagita T, Yasuda Y, Meshitsuka S, Tohyama M. Metals accelerate production of PS2V in sporadic AD brains. *J Neurochemistry* 88 in press (2004).

Meshitsuka S, Tominaga L, Hikita J, Inoue M, Aremu DA, Matsushima F. Intake, metabolism and excretion of aluminum. *Trace Elements Electrolytes* 73, 73 (2003).

Inoue M, Suyama A, Kato T, Urashima K, Nakashima K, Meshitsuka S. Development of computerized kana pick-out test for the neuropsychological examination. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 70, 271-276 (2003).

Meshitsuka S, Koeda T, Muro H. Direct observation of 3-keto-valproate in urine by 2D-NMR spectroscopy. *Clinica Chimica Acta* 334

145-151 (2003).

1. Matsuzaki, S., et al.: Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the Presenilin-2. *J Neurochem*. In press, 2004

2. Manabe, T., et al.: Induced HMG1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Cell Death. Diff.* 10: 698-708, 2003

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

Planel E, Miyasaka T, Launey T, Chui D-H, Tanemura K, Sato S, Murayama O, Ishiguro K, Tatebayashi Y, Takashima A. Alterations in glucose metabolism induce hypothermia leading to tau hyperphosphorylation: mechanism and implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci* (in press)

Kimura N, Tanemura K, Nakamura S, Takashima A, Ono F, Sakakibara I, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Age-related changes of Alzheimer's disease-associated proteins in cynomolgus monkey brains. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(2):303-11 (2003)

Yoshiike Y, Chui DH, Akagi T, Tanaka N, Takashima A., Specific compositions of amyloid-beta peptides as the determinant of toxic beta-aggregation. *J Biol Chem.* 278 (26):23648-55 (2003)

Marambaud P, Wen PH, Dutt A, Shioi J, Takashima A, Siman R, Robakis NK. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations. *Cell.* 114(5):635-45 (2003)

Ono K, Yoshiike Y, Takashima A, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M, Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: Implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *J. Neurochem* 87, 172-181 (2003)

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. *JBC* 278, 6748-54 (2003).

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. 100(2):721-6 (2003)

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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：神経可塑性に対するアルミニウムの影響）

主任研究者 武田雅俊 大阪大学大学院・ポストゲノム疾患解析学講座・精神医学

研究要旨

アルツハイマー病の前駆状態としての MCI が注目され、神経の変性に至る前の神経可塑性の変化の検討は重要である。本研究は、MCI をみすえたアルミニウムの神経可塑性への影響について検討するために、AMPA 刺激後のグルタミン酸受容体の神経細胞内移行を観察した。アルミニウムは神経細胞のプロテアソーム活性を直接減弱するか、ER ストレス反応を減弱することによってプロテアソームに負荷をかけることにより、グルタミン酸受容体の細胞内移行を減弱した。従って、アルミニウムは LTD 形成に影響する可能性が示唆され、神経可塑性を変化させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病の病態過程を説明するアミロイドカスケード仮説は近年広く受け入れられている。この仮説によれば、患者脳におけるアミロイド蛋白の上昇および蓄積が基盤となり老人斑形成更には神経細胞死を招くと理解されている。一方、近年痴呆の前駆状態としての Mild Cognitive Impairment(MCI)という概念が構築され、神経変性が明らかでない時点における症状発現に注目が集まっている。本研究は、アルミニウムが神経変性に至る前段階の神経細胞の生理的機能特に可塑性に対し如何なる影響をもたらすのかを明らかにし、MCI 段階でアルミニウムの関与について検討することを目的とする。

昨年度の検討では、マウスのプライマリーカルチャー神経細胞にアルミニウムを負荷しテタヌス刺激を加えると、アルミニウム投与群では、アルミニウム非投与群に比

べ軽度の低下がみられるが、Long Term Potentiation(LTP)はほぼ正常に誘導されるが、その後の経過は、LTP の有意な低下がみられ、その低下は時間経過とともに進行していくことが観察された。この電気生理学的結果は、アルミニウムが神経の可塑性に影響を与えることを示唆している。LTP および Long Term Depression(LTD)のはグルタミン酸受容体の挙動によって調節を受けているとされているが、本年度はこのグルタミン酸受容体の挙動に対するアルミニウムの影響について検討した。

B. 研究方法

1) マウスプライマリーカルチャー神経細胞の作成

妊娠 14.5 日齢の胎児脳を摘出し、トリプシンおよび DNase I で処理後、6 穴シャーレに培養した。

2) α -3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 投与によるグルタミン酸受容体の細胞内移行の観察

LTD の機序としてグルタミン酸刺激に伴うグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行が示されている。まず、細胞表面にあるグルタミン酸受容体に細胞外部位を認識する抗体を結合させた。培養液に tetrodotoxin (1 μ M)、D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (50 μ M)、AMPA (100 μ M) を加え、15 分間反応させ、4% パラホルムアルデヒドで固定した。FITC 標識の 2 次抗体を反応させた後、0.1% の Triton X-100 で細胞膜を処理した。細胞内にあるグルタミン酸受容体 2 を受容体 2 に対する抗体および Cy3 標識の 2 次抗体で検出した。

この受容体の細胞内移行をプロテアソーム阻害薬(MG132、ZL₃VS)およびアルミニウム (アルミニウムマルトール) 存在下で比較検討した。

3) グルタミン酸受容体総量の検討

2) の AMPA 刺激後、一部の細胞は RIPA buffer でライシスし、ウエスタン法にてグルタミン酸受容体 2 を検出した。

4) アルミニウムによるプロテアソーム活性および小胞体(ER)ストレス反応の変化

マウスプライマリーカルチャー神経細胞の培養液に 100 μ M アルミニウムマルトールを添加し、24 時間後細胞をライシスし、キモトリプシン様プロテアソーム活性および ER ストレスマーカー(リン酸化 eIF2 α) についてウエスタン法を用いて検討した。

C. 研究結果

1) プロテアソーム阻害薬によるグルタミン酸受容体細胞内移行の阻害

プロテアソーム阻害薬(MG132、ZL₃VS) を AMPA 刺激 20 分前から作用させると、阻害薬なしで観察されるグルタミン酸受容

体 2 の細胞内輸送が観察されなくなった。グルタミン酸受容体の代謝にはユビキチン・プロテアソーム系の代謝経路が重要であるとされるが、この結果はそれを支持するものである。

2) アルミニウムによるグルタミン酸受容体細胞内移行の障害

100 μ M アルミニウムマルトールを培養液中に添加し、24 時間後に AMPA で刺激した。アルミニウム非添加細胞ではグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行が観察されたが、アルミニウム存在下では細胞内移行が減少していることが示された。細胞ライセートによるウエスタン法によれば、グルタミン酸受容体の総量にアルミニウムの影響はなかった。

3) アルミニウムによるプロテアソーム活性および ER ストレスに対する影響

アルミニウムを 24 時間プライマリーカルチャー神経細胞に作用させると、アルミニウム濃度依存性にキモトリプシン様プロテアソーム活性を阻害することが示された。また、24 時間のアルミニウム暴露は ER ストレスによる eIF2 α のリン酸化を阻害することが示された。

D. 考察

アルツハイマー病はアミロイド蛋白の増加・沈着により進行性の神経変性を来す疾患であるが、近年 MCI という前痴呆状態が神経変性が顕著でない状態から存在することが注目されている。この状態で患者は既に記憶障害を来しており、神経の変性に至る前の可塑性の障害が想定されている。本研究では、アルミニウムがこの神経の可塑性に如何なる影響を与えるのかを検討し、

アルツハイマー病の初期段階あるいはMCIとアルミニウムの因果関係について検討している。

神経細胞はグルタミン酸刺激により細胞表面のグルタミン酸受容体の量を調節することにより、神経可塑性即ち LTP や LTD を発現するとされる。AMPA の刺激によりグルタミン酸受容体 2 は細胞内に取り込まれ、LTD が形成されるが、それにはユビキチン・プロテアソーム系の活性化が必要とされている。今回の検討では、AMPA 刺激前にプロテアソーム阻害薬で神経細胞を全書利しておくこと、受容体 2 の細胞内移行が減少することが観察され、プロテアソームの活性化が受容体 2 の細胞内移行に必要であることが確認できた。

アルミニウムの添加も AMPA によるグルタミン酸受容体 2 の細胞内移行を阻害することが、今回の検討で明らかになった。同時に行った、プロテアソーム活性の測定によれば、アルミニウムはプロテアソーム活性そのものを減弱することが明らかになり、それが受容体代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

また、アルミニウムは ER ストレスによる eIF2 α のリン酸化を阻害し、ER ストレス反応を減弱することが示された。ER ストレスによって生じた unfolded 蛋白はプロテアソームによる小胞体ストレス関連分解 (ERAD) 機構により分解代謝を受けるが、ER ストレス反応の減弱はこの分解機構に負荷をかけ、プロテアソーム活性を減弱する可能性がある。従って、アルミニウムは ER ストレス反応を減弱せしめ、その結果プロテアソーム活性を低下させ、グルタミン酸受容体の代謝に影響を及ぼす可能性も考

えられる。

E. 結論

アルミニウムは神経細胞のプロテアソーム活性を直接減弱するか、ER ストレス反応を減弱することによってプロテアソームに負荷をかけることにより、グルタミン酸受容体の代謝に影響を及ぼし、LTD 形成に影響する可能性が示唆され、神経可塑性を変化させる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

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：アルミニウムなどの金属のアミロイドプロトフィブリル形成に及ぼす効果の研究）

分担研究者 大河内正康 大阪大学大学院・ポストゲノム疾患解析学講座・精神医学

研究要旨

アルツハイマー病老人斑の形成にアルミニウムなどの金属が影響を及ぼすことが知られている。ベータアミロイド仮説では“可溶性のアミロイドベータ蛋白の凝集過程にこそアルツハイマー病の本体がある”と考えられているため、アルミニウムなどの金属がこの凝集過程にどのように関与しているか検討することは重要である。近年、アミロイドベータ蛋白フィブリル形成の中間段階には、アミロイド・プロトフィブリルが存在することが明らかとなり、さらにその前駆体であるアミロイドベータ蛋白オリゴマーがアルツハイマー病脳で検出された。アミロイドベータ蛋白フィブリルには毒性がなく、この前駆体にシナプス障害などの神経毒性があるという考え方が有力となりつつある。我々はアミロイドベータ蛋白フィブリル形成およびその中間段階であるアミロイド・プロトフィブリル形成について検討を重ねてきた。アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、アミロイド蛋白のベータ重合を阻害すること、またフィブリル形成やその中間段階であるプロトフィブリル形成の遅延に関与していることを明らかにした。本年度、我々はアルミニウムなどの金属がアミロイドベータ蛋白凝集過程にどのような影響を及ぼすのか、生細胞を用いて検討した。その結果、驚くべきことにアルミニウム負荷により分泌されるアミロイドベータ蛋白単量体は対象に比べ有意に減少していた。また検討したアルミニウム濃度ではアポトーシスは誘導されておらず、アミロイドベータ蛋白の基質である CTF-ベータ蛋白の減少は認められなかった。さらに近年我々の確立したアミロイドベータ蛋白産生を定量かつ定性できるシステムを用いて、アルミニウム負荷は、産生されるアミロイドベータ蛋白単量体の量やその分子種にはなんら影響を及ぼしていないことを明らかにした。これらの結果と試験管内の結果を統合すると、アルミニウムなどの金属はアミロイドベータ蛋白の単量体が神経毒性を呈するオリゴマーに移行するのを促進し、かつプロトフィブリル形成速度を遅延することによって、最終的にオリゴマーが組織に長期間留まる可能性が示唆された。

A. 研究目的

アルツハイマー病の原因を究明することは、痴呆症の予防や治療法の開発に向けての第一歩であり、基礎および臨床医学の両面からみて可及的速やかに取り組むべき大きな課題である。アルツハイマー病に特徴的な老人斑の主要構成成分はアミロイドベータ蛋白 ($A\beta$) であり、この $A\beta$ はベータアミロイド前駆体蛋白 (β APP) がまず β -セクレターゼにより切断され、続いてプレセニリン (PS) ガンマセクレターゼによる膜内切断を受けて産生される。家族性アルツハイマー病患者より同定された PS、APP の分子機構を詳細に調べることで、その発症メカニズムは徐々に明らかになりつつある。一方で痴呆症の大半を占める孤発性アルツハイマー病に関する分子生物学的知見は非常に乏しいが、疫学的報告は数多く、以前よりアルミニウムを始めとする環境因子がその発症に関連する可能性を示す報告が蓄積している。そこで我々はアルツハイマー病の本体である老人斑の形成過程にアルミニウムなどの金属がどのように関与しているかを詳細に検討することとした。

B. 研究方法

1) 細胞培養

HEK293 細胞に野生型プレセニリンとスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現させ、定法により培養した。

2) 分泌アミロイドベータ蛋白のウェスタンブロッティング及びマススペクトロミー解析

培養液にアルミニウムマルトールを 0,20,100,500 μ M の濃度で添加し、培養 48 時間、72 時間、98 時間後の培養上清をそれ

ぞれ回収した。回収した培養上清をアミロイドベータ蛋白抗体 (4G8) で免疫沈降、10・20% トリス・トリシゲルで SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。定法によりアミロイドベータ蛋白抗体 (6E10) を用いてフィルムに感光させた。またサンプルの半量を同様に免疫沈降した後、飽和アルファシアノ・4-ヒドロキシシナミ酸を含む TWA (トリフルオロ酢酸:水:アセトニトリル=1:20:20) に溶解し、マススペクトロミーで解析した。

3) アポトーシスの観察

2) の条件で培養した細胞を PBS で洗浄後、Hoechst 33258 色素で染色した。蛍光顕微鏡を用いて、細胞核が凝縮している (アポトーシスを来しているもの) 細胞数を、凝縮していない細胞数で除し、%生細胞数を算定した。

4) *de novo* アミロイドベータ蛋白定量・定性システム

野生型プレセニリンとスウェーデン変異型ベータアミロイド蛋白前駆体を恒常的に発現した細胞を回収し、定法により粗膜分画を抽出した。粗膜分画にアルミニウムマルトールを 0,2,10,50 μ M の濃度で添加し、37 $^{\circ}$ C, 30 分間インキュベートした。100,000 x g で超遠心し回収した上清と沈降物を超音波破碎の後、再度超遠心して回収した上清を 4G8 で免疫沈降し、2) の方法でウェスタンブロッティング及びマススペクトロミー解析を行った。

C. 研究結果

アルミニウムなどの金属が、試験管内でのアミロイドベータ蛋白の凝集過程に変化を及ぼした事実を基に、実際生きた細胞にはどのような影響があるのかを検討することとした。細胞にアルミニウムマルトールを負荷して培養すると、48時間、72時間、98時間後の培養上清中のアミロイドベータ蛋白単量体の量は対照に比べ有意に減少していくことがウェスタンブロッティング法を用いた解析で明らかとなった。減少の程度はアルミニウムマルトール濃度依存的で100 μ M、96時間後では対照の約50%にまで減少していた。またアミロイドベータ蛋白の基質であるベータ APP や CTF ベータの量は、すべての実験条件下で変化は認められなかった。

アミロイドベータ蛋白単量体の減少がアルミニウム負荷により、生細胞の比率が低下したことに因るのか否かを調べるため、培養細胞を Hoechst 33258 色素で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。細胞核の凝縮の程度はアルミニウムマルトール 20 から 100 μ M の濃度では対照と差がなく、この減少が生細胞の比率が低下したことに因るのではないことが明らかとなった。また、マスペクトロミーを用いた解析で、分泌されたアミロイドベータ蛋白の分子種にはなんら変化が認められなかった。

次に、アルミニウムのアミロイドベータ蛋白産生に対する影響を *de novo* アミロイドベータ蛋白定量・定性システムを用いて解析した。細胞から抽出した粗膜分画にアルミニウムマルトールを 0,2,10,50 μ M の濃度で添加し、産生されるアミロイドベータ蛋白の量をウェスタンブロッティング法

で、その分子種をマスペクトロミーを用いた解析で検討した結果、両者とも対照と比較して差が認められなかった。従ってアルミニウム負荷により培養上清中のアミロイドベータ蛋白単量体が減少するのは、細胞死の結果でもなく、産生量の低下でもないことが明らかとなった。よってアルミニウムが試験管内でアミロイドベータ蛋白凝集過程に変化を及ぼしたのと同様に、生細胞でも凝集過程に影響を与える可能性が示唆された。

D. 考察

アルツハイマー病に特徴的な老人斑の主要構成成分はアミロイドベータ蛋白であり従来より、その凝集過程にアルツハイマー病の本体があるとする報告が多数されてきた。また近年、老人斑の主たる成分であるアミロイドベータ蛋白フィブリルには毒性がなく、その前駆体であるアミロイドベータ蛋白オリゴマーなどに神経毒性があるという考え方が有力となりつつある。この点を踏まえ、まず我々はアルミニウムなどの金属がアミロイドベータ蛋白凝集過程に及ぼす影響を検討した。その結果アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、アミロイド蛋白のベータ重合を阻害すること、またフィブリル形成やその中間段階であるプロトフィブリル形成の遅延に参与していることを明らかにした。さらに今回、実際に生きた細胞でもアルミニウムを負荷することにより、分泌されるアミロイドベータ蛋白単量体が減少し、結果としてアミロイドベータ蛋白オリゴマーなどの前駆体形成が促進されている可能性を示した。

最近、アルミニウムを APP トランスジェ

ニックマウスに投与し続けると老人斑の形成が促進されると報告された。この結果は単純に考えるとアルミニウム負荷によりアミロイドベータ蛋白の産生が増加するか、または分解が遅延する可能性が考えられる。しかし、培養細胞にアルミニウムを負荷してアミロイドベータ蛋白の分泌量が増加したという現象は現在のところ明らかにはされていない。今回我々の得た知見を基に考えると、むしろ第三の可能性、つまり凝集過程の変化がもたらした結果なのかもしれない。これが事実であるならば、現在盛んになされている薬剤によるアミロイドベータ蛋白産生を低下させる試みは二次的な効果しかもたらさない可能性がある。アミロイドベータ蛋白オリゴマーなどの前駆体形成を阻害することが根源的治療となるかもしれない。

今後、実際にアルミニウムなどの金属により、アミロイドベータ蛋白オリゴマーなどの前駆体が増加しているか否かを明らかにし、その神経毒性についても詳細に検討する予定である。

E. 結論

前年度、アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、アミロイド蛋白のベータ重合を阻害すること、またフィブリル形成やその中間段階であるプロトフィブリル形成の遅延に関与していることを明らかにした。今年度さらに解析を進め、生細胞にアルミニウムを負荷すると、濃度依存的に分泌されるアミロイドベータ蛋白単量体が減少することを見出した。この減少は細胞死には因らず、またアミロイドベータ蛋白産生の低下にも因らないことを明らかに

した。以上の結果より、アルミニウムなどの金属はアミロイドベータ蛋白の単量体が神経毒性を呈するオリゴマーに移行するのを促進し、かつプロトフィブリル形成速度を遅延する可能性が示された。その結果アルミニウムなどの金属が一定の濃度以上に存在すると、オリゴマーが組織に長期間留まり、神経細胞に障害を与える可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

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