

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：アルミニウムとストレス応答に関する研究－異常スプライシング因子とA β 凝集－）

分担研究者 遠山正彌 大阪大学大学院医学系研究科・プロセッシング機能形態分野

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 μ M）で High Mobility Group タンパク質 A1a（HMGA1a）の発現上昇を促進させ、アルツハイマー病関連遺伝子プレセニリン 2（PS2）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。

さらに、アルミニウムにより誘導促進された PS2V がヒト神経芽細胞腫（SK-N-SH 細胞）の小胞体ストレスへの感受性を増強させ細胞死を促進することを報告してきた。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、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 β の産生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、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による A β の凝集は促進されたが、 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。

また、PS2V 蛋白質を用いた検討によっても同様の結果を得た。以上のことより金属・PS2V 共に老人斑で見られる A β の β シート構造構築には直接関わらないものの A β 凝集には影響を与え AD 発症に関わる可能性が示唆された。

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、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¹⁾。更に我々は PS2V は小胞体ストレストランスデューサー群 (IRE1, ATF6, PERK) の活性化を障害させ、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、上記低濃度アルミニウムによる持続負荷による PS2V 発現促進が小胞体ストレスによる細胞死促進につながることを示した。

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 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^{2),3),4)}。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³⁾。

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。

そこで今回の目的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。

B. 研究方法

1) A β 蛋白質の調整

我々はこれまで A β 凝集解析実験に用いられてきた TFA フォームやアンモニウム塩は生理的に存在し得ないことが分かっていることから、これらを使用しない方法を採用した。すなわち、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。A β 1-40 の未凝集性を確認するために、構成アミノ酸による吸収が存在しない 400nm における散乱光強度が 0 であることと、チオフラビン-T (ThT) 分析で蛍光強度が 0 を示すことでチェックした。各サンプルの A β は一般的に凝集実験に使われている 25 μ M での挙動を検討した。

2) 凝集挙動の解析

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。

3) 用いた金属について

従来の報告では生理的な濃度範囲を無視した高濃度の金属負荷が用いられてきたことから、我々は AD 患者で報告されている脳脊髄中の金属濃度を用いて A β の凝集挙

動を観察することとした。用いた金属は銅（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。

4) PS2V 蛋白の調整

バキュロウィルスベクター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、バキュロウィルスを作成し、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。

C. 研究結果

1) 金属における凝集体変化

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。

中でも生理的な濃度では、Fe（II）が最も大きな β -シート化抑制効果を示したが、凝集に関しては最も促進的であった。これまでの報告で A β 凝集に促進的な結果と抑制的な結果に分かれていた銅（II）については、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。

2) PS2V 蛋白による凝集体変化

著しい ThT の蛍光強度の低下が見られた。

また、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。

D. 考察

① 金属について

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。過去の報告例において A β 単独では β シート化した多量体 (oligmer) により毒性がもたらされることが有力視されていること、金属が結合した老人斑の近傍のニューロンが障害され、脂質の酸化が促進されていること、*in vitro* の実験において、金属により凝集した A β を添加した細胞では、金属を含まない A β を添加したものと比較し、顕著に細胞死が促進され、デフェロキサミン、クリオキノール等のキレーターを添加することで有意に細胞死が抑制されたことなどが知られている。従って我々は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。

② PS2V について

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。しかしながら、病理学的にも老人斑と PS2V は共存しないこと、これまで多数報告されている様な神経毒性を持つ β シート化された oligmer 形成を抑制したことから、A β の神経毒性に

はむしろ保護的に働くように見えるが、実際に PS2V の測定を予備検討中の ELISA システムを用いて行くと、SAD 患者の PS2V 濃度は amol/ml 以下と非常に低濃度であることから、この保護効果も顕在化はされないのかも知れない。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。

E. 結論

アルミニウムにより PS2V 発現の促進を認めること、PS2V 発現により A β 蛋白のメディアム中の量が上昇することから、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することが明らかとなった。

F. 引用文献

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 HMGAla expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. Cell Death. Diff. 10: 698-708, 2003

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

4.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

G.研究発表

1. 学会発表

蛋白質の一生 (平成 16 年 1 月 : 大津)

CRESTシンポジウム (平成16年 1 月 : 東京)

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 鳥取大学医学部大学院医学系研究科・生体高次機能学

研究要旨

Al-アミノ酸錯体を用い、マウス大脳アストロサイトによる Al の取り込み測定したところ、よく取り込まれ、アミノ酸の種類によって取り込み量が大きく異なっていることを報告した。そこで、アミノ酸トランスポーターの選択的あるいは、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。実験にはグルタミン酸およびグリシンのトランスポーターEAAT2およびGlyT1の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、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。したがって、Al の取り込みは、アミノ酸輸送経路を通して Al-アミノ酸錯体として取り込まれるのではなく、受動的拡散作用によることがわかった。アミノ酸錯体の効果は、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。現在のところ、取り込みの経路は不明である。

Al-Gly を培養液に添加して、毒性の発現を観察した。0.0125mM の Al-Gly 濃度でアストロサイトにアポトーシスが観測された。6時間暴露し、その後数日間培養した。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。このような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。

低濃度短時間暴露の実験条件で、培養細胞のアポトーシスに関係するたんぱく質を Western blotting で分析した。PARP、および Lamin は2つのバンドに分裂して観測された。これは、caspase family のたんぱく質分解酵素活性により引き起こされたものと考えられる。また、Bcl-2、Bax はアルミニウムの添加によってバンドに変化は見られなかった。これらの結果より、低濃度のアルミニウムでもアストロサイトに取り込まれ、caspase cascade の活性化によりアポトーシスを引き起こすことが示された。

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。アルミニウムが中枢神経系に侵入した場合、まずグリア系細胞に影響がでるはずである。そこで、グリア系の細胞として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。

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。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。

2) アポトーシスの観察

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10日間培養した。培養細胞をPBSで洗浄後メタノールで固定し、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。

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。

5) アポトーシス関連たんぱく質のウェスタンブロッティング

培養細胞をEDTA, DTT, たんぱく質分解酵素等を含むHepes溶解バッファーで10分間浸漬後、超音波で破碎した。全たんぱく質含量が20 μg/mlの条件でSDS-PAGEを行った。10-12%ポリアクリルアミドからPVDF膜に移し取った。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。

C. 研究結果

Al-アミノ酸錯体を用い、マウス大脳アストロサイトによるAlの取り込み測定したところ、よく取り込まれ、アミノ酸の種類によって取り込み量が大きく異なっていることを報告した。そこで、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。ウロ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。したがって、Alの取り込みは、アミノ酸輸送経路を通してAl-アミノ酸錯体として取り込まれるのではなく、受動的拡散作用によることがわかった。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。低濃度短時間暴露の実験条件で、培養細胞のアポトーシスに関係するたんぱく質をWestern blottingで分析した。PARP、およびLaminは2つのバンドに分裂して観測された。これは、caspase familyのたんぱく質分解酵素活性により引き起こされた

ものと考えられる。また、Bcl-2、Baxはアルミニウムの添加によってバンドに変化は見られなかった。これらの結果より、低濃度のアルミニウムでもアストロサイトに取り込まれ、caspase cascadeの活性化によりアポトーシスを引き起こすことが示された。

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。現在のところ、取り込みの経路は不明である。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。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が、取り込まれる経路や生物学的意味はよくわからない。また、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。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

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).

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：アルミニウムの神経原線維変化形成における役割）

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。

A. 研究目的

アルミニウムとアルツハイマー病発症の関係について幾つかの異なる議論すなわち、関与するというものと関与しないというものがある。いずれの議論も結論を得ていない。これは、アルツハイマー病と同様の病理学的所見を示すマウスモデルが無いためであると考えられる。この分担研究では今回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調べた。

B. 研究方法

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 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、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ェスタン法によって解析を行った。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)

本研究は動物モデルを用いた実験であり特に倫理面への配慮は必要としていない。

C. 研究結果

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

た変化は見出されなかった。ヘマトキシリンエオシン染色においても海馬での細胞脱落などは観察されなかった。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。ウェスタン法によるタウ蛋白の解析では、RAB, RIPA の各フラクションにタウ蛋白は同量回収され、アルミニウム投与群と対照群の間で差を見出すことはできなかった。リン酸化タウ抗体を用いた検討でも同様アルミニウム投与群でリン酸化タウの増大は見出すことができなかった。PHF-1 タウの特徴である不溶性について 1% SDS 不溶性タウが生じるかどうかを調べたが、回収されたタウの量は非常に僅かで回収量に有意な鎖を見出すことはできなかった。

D. 考察

少なくとも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

今回の実験条件下においてアルミニウム注入は神経原線維変化形成を促進しなかつ

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

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文

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)

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。
3. その他
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：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）

分担研究者 橋本亮太 国立精神・神経センター 神経研究所 疾病研究第三部

研究要旨

アルツハイマー病では、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。そこで、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。初代神経培養細胞系において、アルミニウムは、他の金属（ルビジウム、セシウム、リチウム）と比較して、低濃度で短期間暴露による神経毒性があった。さらに低濃度にてアルミニウムの長期間暴露を行ったが、神経毒性や神経細胞の形態における顕著な変化は認められなかった。しかし、低濃度アルミニウムの長期間暴露は、酸化ストレスによる神経細胞死を亢進した。この効果は、短期間の低濃度アルミニウム暴露では認められず、栄養因子欠乏やグルタミン酸による興奮毒性においても認められなかった。また、興味深いことにある低濃度域では、アルミニウム暴露は、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制した。一方、リチウムにおいては、グルタミン酸刺激による神経細胞死を抑制し、ルビジウムやセシウムではそのような効果は認められなかった。これらの結果より、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。

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、神経細胞保護作用

A. 研究目的

アルツハイマー病の障害は広汎であり、神経伝達物質などさまざまな変化が知られているが、その中で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。現在、有効であるアルツハイマー病の治療薬であるタクリンは、アセチルコリン分解酵素の阻害薬であることから、アルツハイマー病の病態とその治療にアセチルコリンが重要な役割を果たしていると考えられる。アルミニウムなど金属がアルツハイマー病発症機構に関与しているという仮説が、1) アルツハイマー病発症と飲料水中のアルミニウム濃度が相関すること、2) 腎不全患者の透析痴呆の原因がアルミニウムの脳内への蓄積によること、3) ウサギ脳にアルミニウムを注入することにより実験的神経原線維変化が認められたことから提唱されている。しかし、アルミニウムがアルツハイマーの原因であるか否かについては、まだ結論はでていない。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。

B. 研究方法

生後 2-3 日のラット脳から大脳皮質を取り出し、パパインで処理後、分散培養を行った。細胞は、 $5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の密度でポリエチレンイミンにてコーティングを行ったディッシュにおいて 5% FCS (ウシ胎児血清)、5% HS (ウマ胎児血清) を含む DMEM 培地にて培養して実験を行った。

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 (H_2O_2 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ィルスを用いた GFP (green fluorescence protein) の感染による蛍光標識によって検討した。(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ラット大脳皮質初代神経培養細胞の細胞死を検討したとこ

ろ、48時間の暴露にて25 μM から500 μM の濃度で70%–20%の細胞死が認められた。形態的な検討をMAP2抗体による免疫染色により行ったところ、樹状突起の免疫反応性の減少が認められた。次に、セシウム、ルビジウム、リチウム添加による神経細胞の生存度を検討したところ、500 μM から2 mM の範囲内で顕著な細胞死を認めることができなかった。このことは、アルミニウムは、セシウム、ルビジウム、リチウムなどの金属と比較して、神経毒性が強いことを示唆する結果である。

次に、低濃度のアルミニウム(0.01–10 μM)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。さらに、シンドビスウィルスを用いたGFPの強制発現系を用いて、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。次に、アルツハイマー病の発症のメカニズムに、酸化ストレスが関与していると考えられていることから、過酸化水素(50 μM 、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 μM の濃度において、神経細胞死を亢進し、10 μM 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。そこで、過酸化水素(50 μM 、12時間暴露)による神経細胞死に短期のアルミニウム暴露が与える影響について検討したが、1–100 μM にて顕著な影響が認められなかった。

一方、神経栄養因子の欠乏やグルタミン酸刺激による神経細胞死においては、0.

01–10 μM の濃度のアルミニウム暴露による変化は認められず、酸化ストレスに対して特異的な作用があることが示唆された。他の金属であるルビジウム、セシウムにおいては、グルタミン酸刺激による興奮性神経細胞死に対する効果は全く認められなかったが、リチウムにおいては、0.6–1.2 mM の濃度にて神経細胞保護効果が認められた。

D. 考察

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。今までアルミニウムの神経毒性やアルツハイマー病への関与が議論の余地のあるところであったが、その原因はこのようなどころにあるのかもしれない。

E. 結論

アルミニウムの短期暴露を培養神経細胞に行うと、他の金属(セシウム、ルビジウ

ム、リチウム)と比較して、低濃度で毒性を持つことが示された。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。今後、アルミニウムの長期暴露による神経毒性・保護効果を詳細に検討し、そのメカニズムを解明することが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

なし。

2. 学会発表

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。

3. その他

なし

20031298

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

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
Regina Fluhner, Gerd Multhaup, Andrea Schlicksupp, Masayasu Okochi, Masatoshi Takeda, Sven Lammich, Michael Willem, Gil Westmeyer, Wolfram Bode, Jochen Walter, and Christian Haass.	Identification of a β -Secretase Activity, Which Truncates Amyloid β -Peptide after Its Presenilin-dependent Generation	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY	278(8)	5531-5538	2003
Shinsuke Matsuzaki, Takayuki Manabe, Taiichi Katayama, Atsuko Nishikawa, Takeshi Yanagita, Hiroaki Okuda, Yuichi Yasuda, Shingo Miyata, Shunsuke Meshitsuka and Masaya Tohyama	Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2	Journal of Neurochemistry	88	1345-1351	2004
Shunsuke Meshitsuka, Tatsuya Koeda, Hideki Muro	Direct Observation of 3-keto-valproate in urine by 2D-NMR spectroscopy	Clinica Chimica Acta	334	145-151	2003
Emmanuel Planel, Tomohiro Miyasaka, Thomas Launey, De-Hua Chui, Kentaro Tanemura, Shinji Sato, Ohoshi Murayama, Koichi Ishiguro, Yoshitaka Tatebayashi, and Akihiko Takashima	Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hypophosphorylation through Differential Implications for Alzheimer's Disease	The Journal of Neuroscience	24(10)	2401-2411	2004
Ryota Hashimoto, RE Straub, CS Weickert, TM Hyde, JE Kleinman and DR Weinberger	Expreeion analysis of neuregulin-1 in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia	Molecular Psychiatry	9	299-307	2004