

は、アルミニウムマルトール処理群で 100kDa 付近のバンドの増加が認められた。mature BACE(約 70kDa) 及び immature BACE(約 50kDa)は 2 量体を形成することが報告されている。アルミニウムマルトール処理により増加が見られた 100kDa 付近のバンドは immature BACE の 2 量体である可能性がある。mature BACE の 2 量体の活性は単量体のそれに比べて活性が高いことがわかっているが、immature BACE に関しては不明である。そこでアルミニウムマルトール処理により内在性の BACE 活性が変化するかどうかを調べることにした。

BACE 活性を消光性基質 MOCAc-SEVNL-DAEFRK(Dnp)-RR-NH₂ を用いた assay で測定したところ、組み換え体 BACE と BACE 過剰発現細胞の lysate を用いた際は活性が測定できたが、内在性 BACE 細胞では測定に必要な蛍光強度が得られなかった。そこでペプチドを基質として用いるのではなく、 β APP 全長を基質とした新たな *in vitro* BACE assay を確立を試みた。

swAPP 発現細胞を S³⁵ で 20 分ラベルした後粗膜分画を抽出し、それを 150mM クエン酸ナトリウム pH6.4 の溶液中で 40 分間反応させた。RIPA で可溶化された分画を抗 APP 抗体で免疫沈降し autoradiography を行った。この条件で CTF- β の増大が認められた。さらにプレセニン/ γ -secretase 阻害剤を添加すると CTF- β の増加が増強された。また CTF- β の産生は BACE 阻害剤で抑制された。よって内在性の BACE 活性を測定する系が確立された。

アルミニウムマルトール、0, 10, 100 μ M の濃度で 24 時間及び 48 時間処理した細胞を、上述した系を用いて BACE 活性を測定した。その結果、対照と比べて有意な CTF- β の産生増加は認められなかった。

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、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、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てきた。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関与していることを明らかにした。さらに、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。

近年、アミロイドカスケードの上流に位置する BACE 活性や mRNA 量が酸化ストレスや TNF- α などのサイトカインにより増加することが報告されている。また孤発性 AD において BACE 活性が上昇していることも明らかになりつつある。BACE 活性が上昇すると CTF- β 産生が増大し、引き続いて起こるプレセニン/ γ -secretase による膜内タンパク分解によって産生される A β の量が増加すると考えられている。またアルミニウム負荷により TNF- α などのサイトカインが上昇することが報告されている。従ってアルミニウムにより何らかの炎症性変化が生じ、サイトカインが上昇し、BACE 活性が増加することが予想される。つま

リアミロイドカスケードの上流にもアルミニウムが関与している可能性がある。そこで我々はアルミニウム負荷による BACE の mRNA 量、総タンパク量を調べたが、両者とも変化を認めなかった。しかし、アルミニウム負荷によりパルス実験で immature BACE の 2 量体の分子量に相当するバンドの増加を認めた。これが BACE 活性を上昇させているかどうかを調べるため、内在性の BACE 活性を測定できる系を確立し検討したが、有意な変化は認められなかった。よってアルミニウム負荷は BACE の代謝に影響を及ぼしている可能性はあるものの、mRNA 量や総タンパク量、および今回用いた系では活性に変化は及ぼしていないことが示唆された。

E. 結論

アルミニウム負荷によりアミロイドカスケードの上流に位置する BACE の mRNA 量や総タンパク量は変化しないこと、またその活性にも変化が認められないことがわかった。さらに、アルミニウムなどの金属は、プレセニリン/ γ -secretase 活性に対する直接的な影響は及ぼさない。従ってアルミニウムなどの金属が老人斑形成に及ぼしている影響は、これらの酵素を介してではなく、アミロイドペータの凝集過程にあることが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文

Okochi, M., Takeda, M.
Possible assessment of Alzheimer's γ -secretase activity by level of A β -like peptides

Psychogeriatrics (2004), 4: 23-27

Okochi, M., Fukumori, A., Satoh, Y., Aidaraliev, N., Tanii, H., Kamino, K., Tanaka, T., Kudo, T., Takeda M.
Alzheimer's γ -secretase mechanism produces Amyloid- β -protein like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments
Molecular Neurobiology of Alzheimer Disease and Related Disorders, Karger Press, 2004, pp31-41.

大河内正康、武田雅俊 アミロイド前駆体蛋白遺伝子変異によるアルツハイマー病
日本臨床 62 巻 増刊号 1, 痴呆症候学 (2) 臨床編 (2004) 86-89.

大河内正康、武田雅俊 アルツハイマー病の分子病態.

日本医師会雑誌 131 巻、第 12 号、特別号 精神障害の臨床 (2004) S12-S13.

大河内正康 田上真次 武田雅俊 A β の毒性発現機構

Molecular Medicine 41-No. 4 2004 427-431

Okochi, M. アルツハイマー病の診断バイオマーカーの新たなコンセプト: A β -様ペプチド

Psychiatry Today, No. 4 pp32-33

Okochi, M. Introduction of novel candidates for biological diagnosis marker for Alzheimer's type dementia
International Conference on Biological Psychiatry 2004, Symposium, Sydney, Australia 2004/2/11

大河内正康

アルツハイマー病誘発物質の産生を予知するバイオマーカー
近畿バイオインダストリー振興会議・近畿バイオ産業クラスター部会・技術シーズ交換会 2004/2/27. 大阪・大阪科学技術センター

大河内正康 アミロイドβ蛋白産生の異常がアルツハイマー病につながる
平成16年度・文部科学省科学研究費補助金・研究成果公開促進費
「研究成果公开发表 (A)」補助事業
第19回「大学と科学」公開シンポジウム
アルツハイマー病 治療の可能性を探る
2004/010/31, 福岡・イムズホール

大河内正康 Notch-1 と・APP の膜内蛋白切断
第2回γセクレターゼ関連データ交換会
2004/06/26, 大阪大学・医学部講堂

Fukumori, A., Tagami, S., Okochi, M., Kimura, R., Jiang, J., Tanii, H., Kudo, T., Takeda, M.
γ-secretase cleavage of βAPP on intracellular membrane.
第19回日本老年精神医学会大会、松本、2004. 6. 26

BACEによるAβの切断について
田上 真次 福森 亮雄 大河内 正康
武田 雅俊
第2回γセクレターゼ研究会、大阪大学、2004. 6. 26

Tagami, S., Okochi, M., Fukumori, A., Kimura, R., Jiang, J., Takeda, M.

The mechanism of intracellular amyloid beta degradation

9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Philadelphia, 2004. 7. 18

Fukumori, A., Okochi, M., Tagami, S., Tanii, H., Kimura, R., Jiang, J., Steiner, H., Haass, C., Kudo, T., Takeda, M.
Biochemical separation of γ-cleavage of βAPP on the plasma membrane from that on the intracellular membrane
9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders, Philadelphia, 2004. 7. 21

Fukumori, A., Okochi, M., Jiang, J., Kimura, R., Tanii, H., Kudo, T., Tagami, S., Takeda, M.
Subcellular localization of γ-cleavage of βAPP.
第47回日本神経化学学会大会、大阪、2004. 9. 21

プレセニリンγセクレターゼによるデュアル膜内蛋白分解機構は基質間で共通だが基質内では異なる
大河内正康、福森亮雄、田上真次、木村亮、姜経緯、武田雅俊
第23回日本痴呆学会 2004/09/29、タワーホール船堀

福森亮雄、大河内正康、谷井久志、姜経緯、工藤喬、田上真次、武田雅俊
γ-secretaseによるβAPPの細胞内切断部位についての検討
第23回日本痴呆学会 2004/09/29、タワーホール船堀

Fukumori, A., Okochi, M., Tagami, S.,
Tanii, H., Jiang, J., Steiner, H., Iwase,
M., Kudo, T., Haass, C., Takeda, M.
 γ -secretase cleavage of β APP on
intracellular membrane.
34th Neuroscience Meeting USA, San Diego,
2004. 10. 23

特許申請

セル・フリー・Notch 切断分析方法および
薬剤スクリーニング方法
出願人： 大河内正康、武田雅俊、大阪 TLO
国際出願： PCT/JP2004/16685
提出日： 2004/11/10

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：アルミニウムによって引き起こされるアストロサイトのアポトーシスの分子機構）

分担研究者 飯塚舜介 鳥取大学大学院医学系研究科・生体高次機能学

研究要旨

低濃度のアルミニウムアミノ酸錯体がアストロサイトの初代培養に細胞核の分散、クロマチンの凝縮といった特徴をもつアポトーシスを引き起こすことを示した。しかしながら、このような顕著な形態学的変化についての分子機構については説明がなされていない。そこで、今回アポトーシスに関係する蛋白質の遺伝子発現に対するアルミニウムの影響を明らかにすることを目的とした実験を初代アストロサイトを用いて行った。アルミニウム錯体はアルミニウムグリシンを用いた。ウェスタンブロッティングあるいは、半定量的RT-PCR分析の結果は、Bax、およびBcl2の蛋白質発現、あるいは遺伝子発現に対して、アルミニウムはなんらの変化を引き起こさなかった。しかし、DNA修復に関係するといわれるPARPとLaminはアルミニウムの存在で、2つのバンドに分裂した。PARPとLamin蛋白質の分裂はアポトーシスの一つの証拠となっている。短時間(6時間)暴露後、通常の培養液に戻して7日間培養すると、蛋白質フォールド不全によるストレス(UPR)の証拠であるIre1 β の発現が見られた。同様の測定を、短時間の暴露、あるいは24時間暴露では、Ire1 β の発現は見られなかった。このことは形態学的変化とUPRに関係する遺伝子発現が一致していることを示している。これに対して、ツニカマイシンはIre1 α の発現量を上昇させる。ツニカマイシンとアルミニウムはそれぞれIre1 α とIre1 β の遺伝子の発現に影響が現れた。UPR刺激に対して、異なる機構が存在することが示唆された。さらに、アルミニウムグリシンは、多くの蛋白質の遺伝子発現を抑制していることが分った。この抑制を受ける遺伝子には、ERの分子シャペロンであるBiP/GRP78、およびCa²⁺結合シャペロン(calnexin、およびcalreticulin)やstanniocalcin2およびOASISなどが含まれる。そこで、蛋白質のフォールディングを促進してUPRストレスから細胞を守る機能のあるシャペロンの抑制や活性化をしないことは、アポトーシスによる細胞死を誘導すると説明される。アストロサイトは神経細胞に比べて、はるかにERストレスに対して強いことが知られている。最近、このアストロサイトが強い特徴が解明された。その機構は、新たに発見されたERストレスに対するセンサーであるOASIS蛋白質の過剰発現が、CREおよびERSEの活性化を経由して、シャペロンのBiP/GRP78を誘導しているためであることが示された。ところが、アルミニウム刺激ではアストロサイトはOASIS蛋白質を誘導しないことが示された。このように、アポトーシスに対する抵抗性を発揮できないため、細胞死に至ることが分った。

Key word:アルミニウム取り込み、アストロサイト、アポトーシス、OASIS、ERストレス

A. 研究目的

アルミニウムグリシネートなどの低濃度のアルミニウムアミノ酸錯体がアストロサイトの初代培養に核の分散、クロマチンの凝縮といった特徴をもつアポトーシスを引き起こすことを示してきた。しかしながら、このような顕著な形態学的変化についての分子機構については説明がなされていない。そこで、今回アポトーシスに関する蛋白質の遺伝子発現に対するアルミニウムの影響を明らかにすることを目的として、初代アストロサイトを用いて分子機構の解析を行った。蛋白質の発現についてはウェスタンブロッティング法を用いた。また、目的蛋白質をコードする遺伝子の転写については RT-PCR 法を用いて行った。典型的な ER ストレスによるアポトーシスを引き起こすことで知られるツニカマイシンと比較することによって、アルミニウムの特徴的な作用が明らかとなったので報告する。

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。アルミニウムグリシネート暴露の後、細胞を採取し、RNA を定法により採取した。

2) ウェスタンブロッティング

アストロサイトを超音波破碎後、遠沈により上清として蛋白質分画を得た。定法によ

り、SDS-PAGE により蛋白質を変性状態で分離し、ゲルから PVDF 膜にブロットした。それぞれの抗体を一次抗体とし、ECL 法で結合した 2 次抗体を観測した。標準は α -チューブリンを用いた。

3) RT-PCR

逆転写酵素により、mRNA から DNA を合成して実験試料とした。目的蛋白質遺伝子配列からプライマーを設計し、DNA 合成によりプライマーを得た。PCR 法により DNA を増幅し、アガロース電気泳動により、産物を分離しエチジウムブロマイド染色で観測した。標準は GAPDH を用いた。

4) 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。

C. 研究結果

アルミニウム錯体はアルミニウムグリシネートを用いた。ウェスタンブロッティングあるいは、半定量的 RT-PCR 分析の結果は、Bax、および Bcl2 の蛋白質発現、あるいは遺伝子発現に対して、アルミニウムはなんらの変化を引き起こさなかった。しかし、DNA 修復に関係するといわれる PARP はアルミニウムの存在で、2 つのバンドに分裂した。PARP 蛋白質の分裂はアポトーシスの一つの証拠となっている。短時間 (6 時間) 暴露後、通常の培養液に戻して 7 日間培養すると、蛋白質フォールド不全

によるストレス (UPR) の証拠である Ire1 β の発現が見られた。同様の測定を、短時間の暴露、あるいは 24 時間暴露では、Ire1 β の発現は見られなかった。このことは形態学的変化と UPR に関係する遺伝子発現が一致していることを示している。アルミニウムは Ire1 α には影響を与えなかった。これに対して、ツニカマイシンは Ire1 α の発現量を特徴的に上昇させるが、Ire1 β は発現しなかった。ツニカマイシンとアルミニウムはそれぞれ Ire1 α と Ire1 β の遺伝子の発現に影響が現れた。UPR 刺激に対して、異なる機構が存在することが示唆された。

さらに、アルミニウムグリシンは、多くの蛋白質の遺伝子発現を抑制していることが分った。この抑制を受ける遺伝子には、ER の分子シャペロンである BiP/GRP78、および Ca²⁺結合シャペロン (calnexin、および calreticulin) や stanniocalcin2 および OASIS などが含まれる。

D. 考察

ミトコンドリア刺激によって引き起こされるアポトーシスは、Bax、および Bcl2 の蛋白質発現、あるいは遺伝子発現に対して影響を与えることが多い。しかし、アルミニウムグリシネートは、これらのミトコンドリア関係の蛋白質に影響を与えなかった。一方、アポトーシスを引き起こすことで知られる代表的な化合物であるツニカマイシンは Ire1 α の発現量を上昇させる。Ire1 α は ER の外膜に特異的に発現している蛋白質である。そのため、ER ストレスのマーカーとしてよく用いられる。今回の実験で、ツニカマイシンとアルミニウムはそれぞれ Ire1 α と Ire1 β の異なる遺伝子の発現に影響

が現れた。UPR 刺激に対して、異なる機構が存在することが示唆された。

さらに、アルミニウムグリシネートは、多くの蛋白質の遺伝子発現を抑制していることが分った。この抑制を受ける遺伝子には、ER の分子シャペロンである BiP/GRP78、および Ca²⁺結合シャペロン (calnexin、および calreticulin) や stanniocalcin2 および OASIS などが含まれる。これらの蛋白質のフォールディングを促進して UPR ストレスから細胞を守る機能のあるシャペロンの抑制や活性化をしないことは、アポトーシスによる細胞死を受けやすくすると考えられる。アストロサイトは神経細胞に比べて、はるかに ER ストレスに対して強いことが知られている。最近、このアストロサイトが ER ストレスに強い特徴が解明された。その機構は、新たに発見された ER ストレスに対するセンサーである OASIS 蛋白質の過剰発現が、CRE、および ERSE の活性化を経由して、シャペロンの BiP/GRP78 を誘導しているためであることが示された。ところが、アルミニウム刺激ではアストロサイトは OASIS 蛋白質を誘導しないことが今回分ったわけである。従って、ER ストレスによって引き起こされるアポトーシスに対する抵抗性を発揮できないため、細胞死に至ると説明される。このようにアストロサイトの特異的な性質を分子機構の解析から明らかにすることができた。

E. 結論

アルミニウム暴露では、UPR 刺激により引き起こされる細胞死について、従来分っていたものと異なる分子機構が存在することが示唆された。また、アルミニウム暴露は ER ストレスによって引き起こされるアポ

トーンシスに対する抵抗性を発揮する OASIS 蛋白質を誘導しないため、細胞死をおこしやすいと説明される。

conference on magnetic resonance in biological systems. Abstract p146 (Hyderabad India, 2005).

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 on Trace Elements. (2004) 15(1), 66-68.

Matsuzaki S, Manabe T, Katayama T, Nishikawa A, Yanagita T, Okuda H, Yasuda Y, Miyata S, Meshitsuka S. and Tohyama M. Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the Presenilin-2. Journal of Neurochemistry. (2004) 88,1345-1351.

Aremu DA, Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. Brain Research (2005) 1031, 284-296.

2. 学会発表

NMR analysis of activating domain C of the rat Hex with GST tag

Akihiro Sakurai¹, David A. Aremu¹, Tamio Noguchi² Shunsuke Meshitsuka¹
日本生化学大会 (2004, 10 横浜).

Sakurai A, Aremu DA, Kurita J, Noguchi T, Meshitsuka S, NMR studies of activating domain of transcription factor Hex with GST. XXI International

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新生という側面にて検討した。アルミニウム長期投与による海馬の神経新生への影響を調べるために、成体マウスに25mMアルミニウム/マルトール溶液200 μ lを一日一回、2週間連続で腹腔投与を行った。神経新生を評価するために、2週間アルミニウム/マルトール溶液投与したマウスに対し、細胞周期のS期にチミジン類似物質としてDNAに取り込まれる5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (75mg/kg)を腹腔投与した。BrdU投与24時間後に灌流固定を行い、BrdU抗体を用いた免疫染色法により新生した細胞を標識、可視化し、顕微鏡下で陽性細胞をカウントした。BrdU陽性細胞の数は、コントロール群に対して、アルミニウム/マルトール群で減少傾向を示していたが、有意な差は見られなかった。2週間の投与終了時点において、アルミニウム/マルトール溶液投与群では、投与開始前と比べて有意に体重が減少しており、BrdU陽性細胞数と体重の変化に正の相関がみられた。これらの結果から、新生細胞の減少傾向は慢性的なアルミニウム投与による体重の減少と同様に二次的な影響によるものと考えられた。これらの結果により、アルミニウム投与は神経新生に直接的な影響を及ぼさない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、金属、神経新生

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。

一方、アルツハイマー病患者脳において海馬の神経新生が増加することが報告されている。また変異型アミロイド前駆体蛋白を過剰発現したアルツハイマー病のモデルマウスを用いた研究では、側脳室下帯および海馬歯状回での神経新生が増加するという報告と減少するという報告がある。また、家族性アルツハイマー病のプレセニリン1のミューテーションのノック

アウトマウスやプレセニリン1の脳特異的ノックアウトマウスでは、神経新生が減少することが報告されている。これらの結果は、アルツハイマー病の病態と神経新生の関連性を示唆するものである。

中枢神経の神経細胞は主に胎生期に作られ、成体では形成された神経回路網が固定化されていると考えられていたが、近年、成体動物の海馬などで細胞が新生することが明らかにされた。このような細胞の新生はヒトの海馬においても認められ、新生した細胞の約60%はその後少なくとも4週間生存し、そのうち約80%は、神経細胞特異的なたんぱく質を発現している。新生した神経細胞は、樹状突起・軸索を伸ばしてCA3領域の錐体細胞とシナプスを形成し、電気生理学的に機能する神経細胞に分化することが示されている。また、神経新生はストレスなどの環境因子等、種々の刺激によって調節されるが、加齢に伴って減少し、またその増加/減少は、海馬依存的な記憶・学習の形成/障害との関連が指摘されていることから、アルツハイマー病などの神経変性疾患との関連性が注目されている。

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。また、アルミニウムがA β の凝集を促進し、細胞毒性を示すことが示唆されているが、その神経新生への影響は明らかにされていない。そこで今回の研究では、そのような毒性を示すアルミニウムが神経新生に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

生後15週齢の成体マウス(C57/BL6J、雌)に対し、25 mM アルミニウム/25 mM マルトール溶液200 μ lを一日一回、2週間連続で腹腔投与した。アルミニウム投与による動物への影響の指標として、投与開始前、開始1週間後、投与終了後における体重変化を記録した。

アルミニウム投与による神経新生の評価のために、2週間アルミニウム/マルトール溶液を投与したマウスに対し、細胞周期のS期にチミジン類似物質としてDNAに取り込まれる5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (75 mg/kg)を腹腔投与した。BrdU投与24時間後、ペントバルビタールによる麻酔を行ったマウスに、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行った。摘出した脳組織は後固定した後、30%スクロース溶液に浸潤し、クライオスタッドにより海馬を含む厚さ40 μ mの冠状切片を作成した。この冠状切片を用いて以下のように免疫染色を行った。切片は、2時間の2NHCl処理によりDNAを変性させた後、10%過酸化水素/10%メタノール/TBS溶液、10%正常ヤギ血清/TBS溶液でブロッキングを行った。次に、ラットモノクローナル抗BrdU抗体(1:200, Accurate Chemical & Scientific Corporation)を一次抗体として用いて4度にてオーバーナイトでインキュベートし、TBS溶液で5分間3回洗ったのち、ビオチン化抗マウスIgG抗体(1:1000, Vector Laboratory)を2次抗体としてさらに室温で2時間インキュベートした。TBS溶液で

5分間3回洗ったのち、アビジン・ビオチンコンプレックス(Vector Laboratory)にて30分インキュベートした。最後に、TBS溶液で5分間3回洗い、ジアミノベンジジンで発色し可視化した。海馬における新生細胞は、顕微鏡下でカウントを行った。作成した連続切片のうち6枚に1枚を染色に用い、カウントした結果を6倍することで、全陽性細胞数を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究の動物実験は、研究機関の倫理委員会の審査にて承認されており、苦痛を最小限にするなどの必要な処置を講じている。

C. 研究結果

BrdU投与24時間後の海馬におけるBrdU陽性細胞の数は、コントロール群(25 mM マルトール投与群)(848 \pm 94.1; n = 8)に対して、アルミニウム/マルトール溶液投与群(540 \pm 120; n = 5)で減少傾向を示していたが、有意な差は見られなかった(p = 0.068)。また2週間の投与終了時点において、コントロール群では、投与開始前と比べて体重変化が見られなかったのに対し(投与前, 21.0 \pm 0.3; 投与後, 21.2 \pm 0.3; p = 0.67)、アルミニウム/マルトール溶液投与群では、有意に体重が減少しており(投与前, 21.5 \pm 0.3; 投与後, 18.2 \pm 0.6; p < 0.001)、BrdU陽性細胞数と2週間の投与終了時点と投与開始時点での体重の差の間に正の相関がみられた。これらの結果から、新生細胞の減少傾向は慢性的なアルミニウム投与による体重の減少と同様に二次的な影響によるものであり、2週間のアルミニウム投与は神経新生に直接的な影響を及ぼさない可能性が示唆された。

D. 考察

アルツハイマー病脳にて、神経新生が増加するとの報告があり、アルツハイマー病モデルマウスでは逆に神経新生が減少していることが報告されている。これらの結果は、一見、相反するものであるが、アルツハイマー病における神経新生の増加は、神経細胞死に対する代償的な作用によるものと考えられる。また、モデルマウスでは、変異型APPやプレセニリン1の作用による病態プロセスが顕著にあらわれており、代償的に増加する神経新生をうわまわる神経新生の抑制

効果がある可能性が考えられる。

本研究においては、アルミニウム投与によって、有意な神経新生の変化は認められなかったが、減少する傾向にあった。この結果は、以下の二通りに解釈できる。一つ目は、アルミニウム投与による非特異的なストレスが、神経新生を減少させているという考えである。我々の実験系においては、アルミニウム投与群では、コントロール群と比較して有意な体重の減少が認められた。また、この体重の変化は、神経新生の程度と正の相関があることから、アルミニウム投与による全身的な変化の一部として神経新生の減少が起こっている可能性がある。ストレスを負荷することにより、一般的に体重が減少するが、このストレス負荷は、神経新生を減少させる重要な因子として知られている。つまり、アルミニウム投与は、ストレスラーとして働き、その結果、神経新生が減少することが考えられる。

二つ目は、アルミニウム投与による神経毒性が、神経新生にアルツハイマーの病態を介して少なからず影響を与えているという可能性である。アルミニウムがどのようなメカニズムで神経毒性を持つかについては、まだ不明な点が多いが、APP やプレセニリン1 のアルツハイマーモデルマウスでは、神経新生が減少する報告が多いことから、アルミニウムがプレセニリン1、APP を介して神経毒性をもつ可能性が考えられる。

E. 結論

我々は、マウスを用いて、アルミニウムの神経新生に対する影響について検討した。その結果、アルミニウム投与は、神経新生を減少させる傾向にあり、アルツハイマー病における神経細胞数の減少や海馬体積の減少につながる可能性が示唆された。しかし、その効果自体は大きなものではなく、しかも本研究においては体重が減少する程度の大量のアルミニウムを投与量しているため、環境中のアルミニウムがヒトの脳における神経新生に影響を与え、アルツハイマー病の発症に関与する可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto R, Okada T, Kato T, Kosuga A, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. The breakpoint cluster region (BCR) gene on chromosome 22q11 is associated with bipolar disorder. *Biological Psychiatry* (in press)

Miki R, Hattori K, Taguchi Y, Tada M, Isosaka T, Hidaka Y, Hirabayashi T, Hashimoto R, Fukuzako H, Yagi T. Identification and characterization of coding single-nucleotide polymorphisms within human protocadherin-alpha and beta gene clusters. *Gene* (in press)

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. A missense polymorphism (H204R) of a Rho GTPase-activating protein, the chimerin 2 gene, is associated with schizophrenia in men. *Schizophr Res*, 73(2-3): 383-385, 2005.

Hashimoto R, Suzuki T, Iwata N, Yamanouchi Y, Kitajima T, Kosuga A, Tatsumi M, Ozaki N, Kamijima K, Kunugi H. Association study of the frizzled-3 (FZD3) gene with schizophrenia and mood disorders. *J Neural Transm*, 112(2):303-307, 2005.

Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H, Hashimoto R. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 13(21):2699-2708, 2004.

Hashimoto R, Straub RE, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Weinberger DR. Expression Analysis of Neuregulin-1 in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia, *Mol Psychiatry*, 9(3):299-307, 2004.

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima

K, Kunugi H. Association analysis of the -308G>A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia, *J Neural Transm*, 111(2):217-21, 2004.

Kunugi H, Hashimoto R, Yoshida M, Tatsumi M, Kamijima K. A missense polymorphism (S205L) of the low-affinity neurotrophin receptor p75^{NTR} gene is associated with depressive disorder and attempted suicide. *Am J Med Genet*, 129B:44-46, 2004.

Tadokoro K, Hashimoto R, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. Analysis on enhancer activity of a dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and its association with bipolar disorder. *Neuropsychobiology*, 50(3):206-10, 2004.

Weickert CS, Straub RE, McClintock BW, Matsumoto M, Hashimoto R, Hyde TM, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain, *Arch Gen Psychiatry*, 61:544-555, 2004.

Kusumi I, Masui T, Kakiuchi C, Suzuki K, Akimoto T, Hashimoto R, Kunugi H, Kato T, Koyama T. Lack of association between XBP1 genotype and calcium signaling in the platelets of healthy subjects. *Neurosci Lett*. 369(1):1-3, 2004.

Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, Sakamoto K, Inada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Yamada K, Yoshikawa T. No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder in Japanese: a multi-center study. *Biol Psychiatry*. 56(5):376-8, 2004.

Numakawa T, Ishimoto T, Suzuki S, Numakawa Y, Adachi N, Matsumoto T, Yokomaku D, Koshimizu H,

Fujimori KE, Hashimoto R, Taguchi T, Kunugi H. Neuronal roles of integrin-associated protein (IAP/ CD47) in developing cortical neurons. *J Biol Chem*, 279(41):43245-53, 2004

2. 学会発表

Hashimoto R, Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(23), 2004.

Masui T, Kusumi I, Kakiuchi C, Suzuki K, Akimoto T, Tanaka T, Hashimoto R, Kunugi H, Kato T, Koyama T. Relationship between XBP1 gene polymorphism and intraplatelet calcium signaling or personality traits. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(23), 2004.

Hattori S, Hashimoto R, Miyakawa T, Maeno H, Wada K, Kunugi H. Enriched environment influences depression-related behaviors and hippocampal neurogenesis in mice. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(24), 2004.

Numakawa T, Yagasaki Y, Hashimoto R, Kunugi H. Glucocorticoid depress brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced glutamate release in cultured neurons. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(26), 2004.

Law AJ, Lipska B, Weickert CS, Hyde TM, Hashimoto R, Harrison PJ, Weinberger DR, Kleinman JE. Splice variant - specific alterations of Neuregulin-1 gene expression in the hippocampus in schizophrenia. Society for neuroscience annual meeting, San Diego, USA, October 23-27(23), 2004.

Hashimoto R, Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, Okada T, Suzuki T, Iwata N, Ozaki N, Taguchi T, Tatsumi M, Kamijima K, Straub RE, Weinberger DR, Kunugi H. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. IPA / Asia Pacific Regional Meeting, Seoul, Korea, September 8-11(9), 2004.

Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H. Association analysis of the -308G>A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia, International Congress of Biological Psychiatry, Sydney, Australia, February 9-13(11), 2004.

統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
センリライフサイエンスセミナー、ブレインサイエンスシリーズ第17回、大阪、10.19, 2004.

橋本亮太、田所 和幸、岡田武也、鈴木竜世、岩田仲生、山之内芳雄、北島剛司、尾崎紀夫、加藤忠史、巽雅彦、上島国利、功刀浩
低分子量Gタンパク質 Rho 関連遺伝子と精神疾患
第12回日本精神・行動遺伝医学会、東京、10.16, 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口 隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩
シンポジウム：こころの病の遺伝学
統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
第49回日本人類遺伝学会、東京、10.12-15(13), 2004.

橋本亮太、尾崎紀夫、岩田仲生、山之内芳雄、鈴木竜世、北島剛司、巽雅彦、上島国利、功刀浩
Chimerin2 遺伝子の H204R ミスセンス多型は男性において統合失調症と関連する
第49回日本人類遺伝学会、東京、10.12-15(13), 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口 隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩
統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
第27回日本神経科学学会・第47回日本神経化学合同年会、大阪、9.21-23(21), 2004.

服部聡子、橋本亮太、宮川剛、前野浩巳、和田圭二、功刀浩
豊かな飼育環境と抗うつ効果：マウスにおける検討
第27回日本神経科学学会・第47回日本神経化学合同年会、大阪、9.21-23(22), 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口 隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩
統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析
第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(23), 2004.

橋本亮太、尾崎紀夫、岩田仲生、山之内芳雄、鈴木竜世、北島剛司、巽雅彦、上島国利、功刀浩
Chimerin2 遺伝子の H204R ミスセンス多型は男性において統合失調症と関連する
第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(22), 2004.

服部聡子、橋本亮太、宮川剛、前野浩巳、和田圭二、功刀浩
豊かな飼育環境と抗うつ効果：マウスにおける検討
第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(23), 2004.

野口広子、橋本亮太、中林哲夫、岩瀬真生、梶本修身、堀弘明、森健之、根本清貴、原田誠一、平林直次、有馬邦正、渡辺剛、穴見公隆、武田雅俊、斉藤治、功刀浩

統合失調症における認知機能障害の検討：統合失調症の包括的遺伝子解析研究に向けて

第34回日本神経精神薬理学会・第26回日本生物学的精神医学会合同年会、東京、7.21-23(22), 2004.

橋本亮太、沼川忠広、矢ヶ崎有希、石本哲也、岡田武也、鈴木竜世、岩田仲生、尾崎紀夫、田口隆久、巽雅彦、上島国利、Richard E. Straub, Daniel R. Weinberger、功刀浩

統合失調症脆弱性遺伝子ディスバインジンの関連解析と神経細胞における機能解析

「疲労および疲労感の分子・神経メカニズムとその防御に関する研究」平成16年度第1回全体班会議、福岡、7.15-16(16), 2004.

Ryota Hashimoto,

Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia

FES Tutorial Session Friday Evening Seminar, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, 7.2, 2004.

野口広子、橋本亮太、中林哲夫、岩瀬真生、梶本修身、堀弘明、森健之、渡辺剛、穴見公隆、武田雅俊、斉藤治、功刀浩

統合失調症における認知機能障害の検討：統合失調症の包括的遺伝子解析研究に向けて

第100回日本精神神経学会総会、札幌、5.22-24(23), 2004.

橋本亮太、藤巻康一郎、功刀浩、荘徳茂

リチウムの神経保護効果とそのメカニズム：臨床的作用機序への可能性

第24回リチウム研究会、東京、4.24, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

橋本亮太、功刀浩：躁うつ病の発病しやすさに影響する遺伝的素因を有するか否かを検査するための方法。特願2004-246447(2004年8月26日)

2. 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 : 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: 動物モデルを用いたアルミニウムとアルツハイマー病発症の関連の検討)

分担研究者: 高島明彦 独立行政法人理化学研究所 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、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。一方、アルミニウムの神経原線維変化形成への効果について、AFM、細胞系、動物を用いて検討を行った。その結果、アルミニウムはタウを重合するのだがそれは繊維化ではなくアモルファスな重合を引き起こすことが示された。細胞でもアルミニウム添加によって不溶性タウが出現することが確認された。しかし、動物モデルでは神経原線維変化形成の加速は観察されなかった。これらの結果から、アルミニウムはアルツハイマー病発症に関与するアミロイド重合、タウ線維化に影響を及ぼさないと推測された。

keywords: アルミニウム、タウ、アミロイド

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関しては関与するという報告と関与しないという互いに矛盾する結果が報告されており、今のところ結論を得ていない。これは、アルツハイマー病を呈する確たる動物モデルが無いためであると考えられる。今回我々は神経原線維変化を呈するマウスモデルおよび試験管内タウ凝集系を用いてアルミニウム服用と神経原線維変化形成

について検討した。

B. 研究方法

試験管内タウ凝集実験; ヒト4リピート、リコンビナントタウは高速液体クロマトグラフにより単離精製されたものを実験に用いた。タウ蛋白はヘパリンまたはAlCl₃と37℃でインキュベーションしチオフラビン蛍光で β 凝集を測定し、さらに原子感力顕微鏡にて凝集体の形態を観察した。

細胞培養 ; N2A 細胞の P 3 0 1 L ヒト型タウを安定的に発現する細胞株は 10%、牛胎児血清を含む DMEM で 5 % CO₂ 下で培養を行った。

動物モデル ; V337M 変異を持つヒト 4 リピータウを PDGF プロモーターによって脳で特異的に発現するマウス及び野生型 B 6 マウスを用いて実験を行った。A1 マルトースは皮下注入によってマウスに投与された。

アルミニウム定量 ; 脳サンプルは加熱分解し、偏光ゼーマン原子吸光にて定量した。

C. 研究結果

1. タウ重合におけるアルミニウムの影響

タウ蛋白をポリアニオンなどとともにインキュベーションするとタウはβシート構造を持つ凝集線維を形成するこれはアルツハイマー病等で見られる PHF と同様のものである。この条件下で 0.2 mM から 20 mM までの濃度範囲で A1 をインキュベーション溶液に加えチオフラビンの蛍光測定を行った。0.2 mM アルミニウム添加ではチオフラビン蛍光の立ち上がりまた最大値は 4 0 0 時間後に計測されコントロール（何も入れなかった場合）の半分であった。1mM 以上のアルミニウムの添加はチオフラビン蛍光増大を完全に阻害した。原子間顕微鏡観察では明らかなタウ線維の減少が観察された。次にアルミニウムそのものがポリアニオンのようにタウの繊維化を促進するかどうかをヘパリンなしでタウを 0.2 mM から 20 mM までの濃度範囲の A1 インキュベートしチオフラビン蛍光を測定したが全く増大を示さなかったが原子間力顕微鏡ではタウの構造物を観察することが出来た。これらの構造物は一定の形態を示さずむしろアモルファス凝集体を形成すると考えられた。すな

わち、アルミニウムはタウのβ結合による繊維化を阻害しアモルファス凝集を増大させることが示された。

2. 細胞モデルにおけるアルミニウムの効果
細胞を 0-2 0 0 μM のアルミニウムマルトールで処理し SDS 不溶性タウの形成能を調べた。タウを発現する細胞では 5 0 μM アルミニウムで不溶性タウの出現が観察された。CHIP を同時に発現する細胞ではアルミニウム濃度の増大とともに SDS 不溶性タウの量が減少した。これは、アルミニウムによってアモルファスタウ凝集体が SDS 不溶性タウとして生じるが、CHIP、プロテアソーム分解系で容易に分解されるためアルミニウム濃度の増大とともに生じるアモルファス凝集が分解されるため SDS 不溶性タウが減少すると解釈される。

3. 個体でのアルミニウムの効果

まず、脳内アルミニウム濃度増大を調べるため 3 日間 1 0, 2 5, 5 0 mM アルミニウムマルトール腹腔内に 2 0 0 μl 連続投与した。マウスでは通常 5 μM のアルミニウムが存在していることが判った。それぞれの濃度のアルミニウム 3 日連続投与後直線的に増大し、それぞれ 9.6, 11, 16 μM となった。50mM 投与群は肝臓に障害が見られた。脳では神経原線維変化の増大は見られなかった。25mM を選択し 2 週間のアルミニウム連続投与を行った。ここでは最終的に約 2 0 μM のアルミニウム脳内濃度となった。しかし、肝臓にやはり異常が見られ脳では何ら異常所見は得られなかった。

D. 考察

アルミニウムの効果を個体、細胞、分子のレベルでタウ重合に関して検討をおこなった。脳内アルミニウムはアルミニウム摂取により蓄積を示すが、脳内の濃度がタウ

凝集を細胞で示す濃度 50 μ M になる前に内臓の障害が顕著に表れる。これは脳よりも他の臓器にアルミニウムの蓄積が起こりやすいことを示している。細胞及び試験管内タウ凝集の実験からはアルミニウムによるタウ凝集は NFT で見られるタウ線維とは異なりアモルファスであり細胞内分解系によって速やかに分解されることが示唆された。

E. 結論

上記のことからアルミニウム摂取は脳よりも他の臓器に異常をもたらす。更にアルミニウムによるタウ凝集は PHF と異なることからアルミニウムのアルツハイマー病発症への寄与は非常に少ないと結論できる。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論分発表

Takashima A: The role of GSK-3 β in the formation of neurofibrillary tangles. *Psychogeriatrics* 4: 17-22 (2004)

Shigetsugu H, Matsumoto M, Kamura T, Murayama M, Chui D-H, Planel E, Takahashi R, Nakayama K-I, and Takashima A: U-box protein carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) mediates poly-ubiquitylation preferentially on four-repeat Tau and is involved in neurodegeneration of tauopathy. *J. Neurochem* 91: 299-307 (2004)

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* 24: 2401-2411 (2004)

Hashimoto Y, Tsukamoto E, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Aiso S, Takashima A, Nishimoto I: Amino- and carboxyl-terminal mutants of presenilin 1 cause neuronal cell death through distinct toxic mechanisms: Study of 27 different presenilin 1 mutants. *J Neurosci Res* 75 (3): 417-428 (2004)

2. 学会発表

Akihiko Takashima: Tau protein hyperphosphorylation and Alzheimer's Disease. 中国 Alzheimer 病学会 July1-3, 2004, Changsha, CHINA

Akihiko Takashima: The 9th International Conference on Alzheimer's Disease and Related Disorders. July17-22, 2004. Pennsylvania Convention Center, USA.

Maeda S., Murayama M., Takashima, A. Mechanism of neurofibrillary tangle formation: tau accumulation and fibril formation. The 5th Neurobiology of Aging Conference 2004 October 21-22, 2004. San Diego, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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：アルミニウムが誘導するプレセニリン2スプライシング変種と

孤発性アルツハイマー病発症に関する研究)

分担研究者 遠山正彌 大阪大学大学院医学系研究科・ポストゲノム疾患解析学

研究要旨

我々は、アルツハイマー病（AD）原因遺伝子の変異体やスプライシング変種が発現した場合に小胞体ストレス脆弱性が誘導されADでみられる神経細胞死を誘導することを報告してきた。すなわち、家族性ADにおいてはPS1変異体、孤発性ADにおいてはPS2Vが発現することで神経細胞死が誘導されることを示してきた。今研究課題において、アルミニウム（Al）とPS2V発現の関連についてこれまで報告しており、Alにより誘導されるN-myc・HMGA1aが引き金となってPS2V発現が促進されることを報告してきた。一方で、我々は小胞体ストレスを介した神経細胞死の経路でcaspase4が誘導されること、アミロイドβ蛋白質負荷によってもcaspase4が誘導されることを報告した。そこで今年度は、PS2V発現細胞及びAl長期負荷細胞を用いてcaspase4の発現の促進が起きているのかどうかを検討した。また、Alが発現誘導するPS2Vが実際の脳サンプルで神経細胞死と関連性を示すのか、免疫染色法を用いて検討した。一方、昨年は、老人斑形成（アミロイドβ蛋白質の凝集）とAlおよびその他の金属の関連性を報告したが、今年度はNFT形成と関連性を示すのかということを中心に検討した。

key word: アルミニウム、PS2V、ERストレス、神経細胞死、caspase 4、リン酸化タウ

A. 研究目的

現在我が国は、急速に高齢化社会へと向かっている。それに伴い、アルツハイマー病（以下AD）を中心とした痴呆性疾患は社会的問題として注目されている。痴呆性疾患は罹患している患者のみならず、その周囲で生活する多くの人へ多大な負担を強いることとなる。そこで我々は、未だ解明されないADの発症機序を解明することを目的に実験を進めてきた。

ADの一部は遺伝子変異のあるFADであるが、大多数は家族歴の無いSADである。いずれも脳内に沈着するアミロイドβ蛋白質（以下Aβ）からなる老人斑とタウ蛋白質の異常なリン酸化によっておこる神経原線維変化(NFT)、神経細胞の顕著な脱落を特徴的な病理所見とする進行性の神経変性疾患である。まず我々はFADの原因遺伝子の変異体(PS1変異体)がどのようにFAD発症に寄与するのかを検討した。その結果、PS1変異体がERストレス脆弱性を誘導すること報告した。一方、SADにおいては原因遺伝子の変異が認め

られないにも関わらず、FADと同様の病理所見を呈する。そこで、PS1変異体と同様にERストレス脆弱性を引き起こす機構があるのではないかと仮説を立て検討した結果、PS2のエクソン5を欠損したスプライシング変種PS2Vが見いだされた。さらに、PS2Vは低酸素刺激によって発現すること、ERストレス脆弱性を惹起させ神経細胞死を誘導することを示した。さらなる検討の結果、PS2Vの発現機序も解明した。即ち、低酸素刺激により神経細胞ではN-mycがまず発現誘導され、このN-mycがHMGA1aを発現誘導し、次いでHMGA1aがPS2Vを発現誘導する事を明らかとした。

一方で、“腎不全透析患者において痴呆が発生する（透析痴呆）”、“透析痴呆は透析に使用した水道水や薬剤中のAlが原因であり、脳内にAlが蓄積することである”、“飲料水中のAl濃度とAD患者発生に相関関係がある”といった、AlとAD発症の関連性を示す報告、つまり、AlがADの危険因子（リスクファ

クター) であるとする報告が多数なされてきた。

そこで我々は、PS2V 発現と AI に関連があるのか否かを検討した。結果、神経系の細胞に毒性を示さない低濃度 AI を長期間負荷したところ、低酸素刺激での PS2V 発現誘導が促進される事を見いだした。そこで本研究では AI により誘導促進される PS2V が低酸素刺激による発現と同様の機序で発現誘導されるか、また AD の病態病理にどのように関与するかを明らかにする事を試みた。

B. 研究方法

①: 低濃度 AI 及び PS2V による神経細胞死と caspase 4 発現の関連性

低濃度 AI 長期負荷群および PS2V が小胞体ストレス脆弱性を誘導し、神経細胞死が促進されることを報告してきた。また、AD で見られる ER ストレスを介した神経細胞死 (アポトーシス) は caspase4 を介した経路で進むことを我々は報告してきた。そこで、PS2V 発現細胞、及び AI 負荷細胞において caspase4 が誘導されるのか否かを検討した。すなわち、PS2V 発現細胞及び AI 長期負荷細胞において小胞体ストレス負荷時に PS2V が発現するのか、発現するとして促進しているのかどうかを確認した。方法として、ER ストレスとして tunicamycin (以下 Tm: Tm は小胞体での蛋白質糖鎖修飾を阻害することで小胞体ストレスを誘発) を $1.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度で使用し、ウェスタンブロッティング法により caspase 4 の発現を確認した。

②: PS2V によるタウ蛋白質コンフォメーション変化への影響の検討

PS2V 発現細胞及び mock 細胞を用いてタウ蛋白の変化を確認した。タウの検出には tau2 抗体を用いたウェスタンブロッティング法を用いた。小胞体ストレスとしてはツニカマイシンを用い、各条件下でのタウ 2 抗体陽性バンドの変化調べた。

③人脳サンプルを用いた AD 主要病理像出現と PS2V 発現の関連性の検討

AD 患者脳及び疾患コントロールとなる脳サンプルを用いて、海馬領域を中心とした免疫染色を行った。この際に、AD の特徴的な病理像である A β 凝集体 (老人斑)、リン酸化タウ凝集体との発現部位でのリンクを共染色で確認した。また、PS2V の海馬内での発現

量をヘマトキシリン・PS2V の共染色で確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は培養細胞を主として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。また、今回用いた脳サンプルは、実験に用いる旨同意を頂いたものである。

C. 研究結果

①: 低濃度 AI 及び PS2V による神経細胞死と caspase 4 発現の関連性

AI の一過性負荷では caspase4 への影響は認めなかったが、低濃度 AI ($2.5 \mu\text{M}$) 長期負荷群ではツニカマイシン負荷をしていない 0 時間の段階から caspase4 活性上昇を認めた。このことは、長期に渡る AI 負荷が caspase4 活性に影響を与えることを意味している。また、PS2V 発現細胞と mock 細胞を比較した場合に PS2V 発現細胞で caspase4 活性の上昇を認めた。このことから、孤発性 AD で見られる神経細胞死に caspase4 が関与していることが示唆される。

②: PS2V によるタウ蛋白質コンフォメーション変化への影響の検討

PS2V 発現細胞ではタウの単量体を示すバンドが減少し、凝集を示す多量体以上のバンドの増加を認めた。また、ER ストレスを負荷することで多量体を示すバンドのさらなる増加を認めた。一方で、AI は A β 凝集については AI、PS2V ともに促進的に働いた。また、 β -sheet 変化については、AI は軽度抑制を PS2V はかなりの抑制傾向を示した。免疫染色においては PS2V 発現細胞内にタウ抗体陽性な凝集体蓄積を示すガリアス染色陽性細胞が認められた。また、PS2V 発現細胞周囲に老人斑形成を認めた。さらに、ブランクの NFT 分類で示される NFT の変動に先だって PS2V が発現していることも免疫染色で明らかとした。

③: 人脳サンプルを用いた AD 主要病理像出現と PS2V 発現の関連性の検討

PS2V の発現であるが、もっともコントロール群と差が付いたのは DG 部での発現であった。また、PS2V の発現を海馬内 (DG を除く) でみた場合に、細胞死が進むといわれている領域ほど顕著な差を認めた。このことは、AD でみられる神経細胞死・神経細胞の脱落に深く PS2V が関与していることを示している。

タウの凝集体 (NFT) を確認する目的でガリアス染

色を行った。PS2V 発現細胞内にガリアス染色陽性の凝集体 (NFT) を認めた。このことは、また、PS2V 陽性細胞で NFT を認めないものはあったが、死細胞をのぞいてガリアス陽性で PS2V 陰性のものは認めなかった。このことは、PS2V が何らかのトリガーとなり NFT 形成を引き起こしていることを示唆している。

老人斑と PS2V の発現については、PS2V により神経細胞死が認められた領域を追いかける形で認められた。PS2V・リン酸化タウ・A β (オリゴマー) が神経細胞死を誘導した後に形成されている可能性を示す。

D. 考察

AI を長期間負荷することで神経系の細胞は PS2V の発現が誘導される。この PS2V は小胞体センサー機能を障害し小胞体ストレスに対し神経細胞を脆弱化する事、それにより神経細胞に小胞体ストレスが負荷されると神経細胞死が惹起される事を明らかとした。また ER ストレスによる神経細胞死の機構には caspase4 が関与しており、アポトーシスが誘導されること我々は報告している。そこで、PS2V 発現細胞と AI 長期負荷細胞での caspase4 活性を確認したところ、caspase4 活性の上昇が認められた。これらの結果から、AD で見られる神経細胞死に caspase4 が関与しており、AI および PS2V がその機構に深く関わっていることを示している。一方、PS2V は AD の病理の特徴である NFT 形成にも重要な関与を果たしている事が免疫染色の結果から示唆され、さらに PS2V がタウの凝集体形成に促進的に働くという事実から、AI 及び PS2V が NFT 形成にも重要な関与を果たしている可能性を強く示唆している。さらに、免疫染色の結果から PS2V は神経細胞死・神経細胞脱落に深く関与しており、AI-PS2V 系が AD の病理・細胞死に関与していることを示唆した。

E. 結論

AI は N-myc・HMGA1a といった AI 分子を誘導することで PS2V 発現に促進的に働く。さらに、この PS2V は小胞体ストレス脆弱性を誘導することで細胞死を促進した。AI は AD の病理形成にも重要な役割を果たしている事が明らかとなった。即ち、AI は NFT・老人

斑形成においても促進的に働く可能性を示唆した。このことから、AI は PS2V を介して AD を惹起しその病態形成に深い関与を果たしている可能性が示された。

F. 論文および学会発表

1. 論文発表

Possible involvement of the expression and phosphorylation of N-Myc in the Novel induction of HMGA1a by hypoxia in the human neuroblastoma cell line. *Neurosci. Lett. in press*

Novel function of PS2V: change in conformation of tau proteins. *Biochem Biophys Res Commun. 2004 May 28;318(2):435-8.* Role of ARF4L in recycling between endosomes and the plasma membrane. *Cell Mol Neurobiol. 2004 Feb;24(1):137-47.*

Metals accelerate production of the aberrant splicing isoform of the presenilin-2. *J Neurochem. 2004 Mar;88(6):1345-51*

Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death.

J Cell Biol. 2004 May 10;165(3):347-56

Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett. 2004 Mar 4;357(2):127-30.*

2. 学会発表

CREST 終了報告会・蛋白の一生・プラザ研究報告会など

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

特になし