

2004012588

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

総合研究報告書

主任研究者 武田 雅俊

平成 17 年(2005 年)3 月

目 次

I. 総合研究報告書

- アルミニウムなど金属とアルツハイマー病発症機構との因果関係に関する研究……1
武田雅俊

II. 分担研究報告書

1. 神経可塑性に対するアルミニウムの影響に関する研究……14
武田雅俊
2. 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…18
大河内正康
3. 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……24
飯塚舜介
4. 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
5. 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……38
高島明彦
6. 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……45
遠山正彌

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……49

IV. 研究成果の刊行物・別刷り……51

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

我々の通常の生活環境にありふれて存在するアルミニウムが毒性を発揮する場合があることは人工透析によるアルミニウム脳症の例を見ても明らかである。アルツハイマー病発症には遺伝的因子と環境因子の両方が関与するが、その環境因の一つとしてアルミニウムが挙げられることについては世界中から多くの研究結果が蓄積されている。しかしながら、アルミニウムのアルツハイマー病発症への効果の程度について評価するような系統立てた試みは報告がなく、我々が健康な生活を続けていく上で科学的に精査検討すべき問題であった。

いくつかのアルツハイマー病発症メカニズム仮説が提起されているが、本研究計画ではアルミニウムのそれらのアルツハイマー病発症メカニズムへの影響について分子レベルで系統立てた詳細な検討を行った。前半3年間の研究に引き続き我々は(1)アルミニウムの摂取・吸収・代謝への影響、(2)アルミニウムの神経機能・発達へも影響、(3)アルミニウムの神経細胞死への影響、(4)アルミニウムのアミロイドβ蛋白の産生・凝集・蓄積・代謝への影響、(5)アルミニウムのタウ蛋白のリン酸化・蓄積への影響、(6)アルミニウムのPS2Vを介したアルツハイマー病発症機構への影響について分子レベルで検討を深めた。

多くの実験事実はアルミニウムが神経毒性・神経機能障害・神経発達障害の原因となることを示唆した。一方、アルツハイマー病の病理過程仮説に基づいた検討では以下のような結果が得られた。

(1)世界的に最も流布している「Aβ仮説」に基づいた病理過程への効果を詳細に検討したところ、Aβやタウなどの関連蛋白質の産生や凝集にアルミニウムなどの金属は確かに影響を及ぼしているが、その影響の仕方は「アルツハイマー病を引き起こすそれとは微妙に異なる」点で共通していた。つまりアルミニウムは「Aβ仮説」に法ったアルツハイマー病発症を促進しない。

(2)ER ストレス仮説に基づいた病理過程に対して同様に検討したところアルミニウムはPS2V産生を増大させた。この結果はアルミニウムがアルツハイマー病発症に促進的に働く可能性を示唆し注目に値する。

(3)アルツハイマー病の器質的異常として注目されているシナプス障害について検討したところアルミニウムは強いシナプス障害の原因となった。しかしこのシナプス障害はAβによって誘導されるそれとは異なった。つまりアルミニウムはアルツハイマー病で起こっているようなシナプス障害を引き起こさない。

結論として、アルミニウムは神経機能障害を引き起こすが、総合的に判断すると「アルミニウムが孤発性アルツハイマー病の原因である」と現時点で断定するだけの証拠は見つからなかった。

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、シナプス毒性、アミロイド、老人斑、神経原線維変化

A. 研究目的

アルミニウムは地球環境を構成する元素のうち3番目に多い元素である。従ってこれを過剰に摂取してしまう機会が多いと考えられる。アルミニウムとアルツハイマー病の関連を示唆する報告として、飲水中アルミニウムとアルツハイマー病発症との関係、透析中のアルミニウムによる透析脳症の発症、アルミニウム投与動物脳での実験的神経原線維変化の形成などが挙げられる。また最近、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こと、アルミニウムや亜鉛といった微量金属がアルツハイマー病の老人斑に蓄積していること、銅イオンがアミロイドベータ蛋白と直接結合しラジカル発生の原因となっていること、さらには、アルミニウムなどの金属が老人斑形成の速度を修飾することが相次いで報告されている。一方で経口摂取をしない環境、即ち高カロリー輸液中に微量の金属イオンを混入しなければ、神経障害を始め様々な臓器の障害が生じることも周知の事実である。

家族性アルツハイマー病患者より同定されたPS1, 2, 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。しかしながら、アルミニウムのアルツハイマー病発症への効果の程度について評価するような系統立てた試みは報告がなく、我々が健康な生活を続けていく上で科学的に精査検討すべき問題であった。

そこで今回我々はアルミニウムとアルツ

ハイマー病の因果関係を分子生物学的に得られた知見、手法をもとに解析・解明することを目的として実験を開始した。

B. 研究方法

アルツハイマー病研究の進歩により病理過程が明らかになりつつある。その内最も人口に膾炙しているのがA β 仮説である。それに関連してアルツハイマー病患者に共通するシナプスの減少がA β により引き起こされ、実際の症状に直接関連すると考えられ最近注目されている。また、ERストレス反応に対する応答性の変化がアルツハイマー病をはじめとする神経変性疾患に共通するという考え方も最近は多くの研究者が提唱しはじめており注目されている。これらの仮説について、その病理過程の各々のステップに対するアルミニウムの効果を分子レベルで専門家が詳細に検討する方法を採用した。

つまり、我々はアルツハイマー病を引き起こす過程に関する仮説とそれらの病理過程の詳細に関して、現在までに多くの実験結果を蓄積してきている。それを利用して(1)アルミニウムなどの金属による神経細胞障害のメカニズムと神経変性との関連、(2)アルツハイマー病老人斑形成とその毒性の発揮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、(3)アルミニウムがアルツハイマー病で神経細胞死を引き起こす因子をどのように誘導するか、(4)アルミニウムの体内蓄積メカニズムとその予防の可能性を探る、(5)神経原線維変化に蓄積する異常リン酸化タウ蛋白の生成にアルミニウムが果たす役割、(6)アルミニウムや重金属の脳老化またはアルツハイマー病発症への影響、などについて、培養細胞実験系とモデルマウス実験系を駆使して

分子レベルでの病理過程促進効果があるかどうか検討した。

(倫理面への配慮) 本研究ではアルミニウム投与を必要とする動物実験が予定されているが、これは十分な訓練と教育を受けたものが担当し動物愛護上の配慮もなされている。

C. 研究結果

(1) アルミニウムの摂取と代謝・蓄積

我々は日本人の食生活習慣でどれくらいアルミニウムが摂取され、また代謝されているか検討した。食物からのアルミニウム摂取量を測定し、日本人の平均的食生活におけるアルミニウム1日摂取量を求めたところ4.2~5.9mgであった。また、尿中アルミニウム1日排泄量は12~24 μ gであった。市販されているアルミニウム含有鎮痛剤服用後の尿中アルミニウム排泄量は対照群に比べて有意に増加した。コンピュータシミュレーションによって、脳へのアルミニウムの移行割合は80歳以下では0.0001、また80歳以上では0.00001であった。高齢者では、移行率は10倍に増加するという結果が得られた。アルミニウム排泄に関与する遺伝子をDifferential displayにより検討したところ23種類の特異的なバンドを確認した。このうち6種類は未知の遺伝子であった。

アルミニウムの摂取量はアルミニウムがどのような形態で摂取物に含まれるかで大きく異なる。したがって、アルミニウムの摂取量は沈殿しやすいアルミニウム塩の形で摂取することで減らすことができる。また、そのメカニズムは不明であるが、我々は比較的大量にアルミニウムを摂取した場

合でも、アルミニウムの尿中排泄量の増加により体内蓄積を防ぐことができる。

アルミニウムの脳内への吸収・代謝は動物種によって異なる。例えばウサギの脳内にアルミニウムを接種した場合実験的神経原線維変化ができるのに対し、ネズミではこれができない。また、摂取したアルミニウムの脳内移行もネズミでは効率が悪いようである。この原因は詳細は今後の検討を待たねばならないが脳血液関門の性質に依存する可能性がある。

(2) アルミニウムの神経機能・発達・神経細胞死への影響

アルミニウムの細胞骨格と軸索輸送に対する影響に関して検討した結果、細胞骨格及び軸索輸送障害がみられた。また軸索形成以前の培養開始6時間目にアルミニウムをパルス投与したところ、培養4日目には軸索輸送障害がみられ、その後遅れて神経アポトーシスによる細胞死が生じていた。この結果は妊娠マウスへのアルミニウム摂取実験でも確認され、またアルツハイマー病モデルマウスであるPS1 I141T変異体ノック・イン・マウスで促進されることが明らかになった。さらに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。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。つまりアルミニウムは軸索輸送障害を引き起こし、そのため神経機能発達に重大な影響を及ぼす。この障害は程度が強くなると神経細胞死を引き起こすことが明らかになった。また、アルミニウムは数十 μ Mの濃度で神経細胞だけ

ではなくアストロサイトにアポトーシスを引き起こすことも明らかになった。

以上のようにアルミニウムの多量の摂取は軸索輸送障害・神経発達障害の原因となり神経細胞死に至る重大な毒性の原因となることが明らかになった。

(3) アルミニウムの神経可塑性への影響

マウス海馬神経細胞スライスを用いてアルミニウム灌流を行ないそのあとでシナプスの機能について電機生理的検討を行った。アルミニウムフリー環境下と同様に fEPSP に差はみられなかったが、STP・LTP には著明な低下が観察され、灌流後 50 分でアルミニウムフリーと比較して fEPSP の振幅は約 50% まで低下がみられた。つまり、アルミニウムは明らかな LTP 阻害作用を示した。この結果から、アルミニウムはシナプス活動に対し毒性を有することが結果から示唆された。さらに、100 μ M アルミニウムマルツ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。この結果からアルミニウムは LTD の阻害作用も有することが明らかになった。まとめるとアルミニウムはシナプスの重要な機能である LTD や LTP の産生維持に障害をもたらすことが明らかになった。

(4) アルミニウムのアミロイド β 蛋白の産生・凝集・蓄積・代謝への影響

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、同時に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も著しく遅延させることを明らかにした。さらに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ところ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る様に見えた。さらに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、プロトフィブリル形成、フィブリル形成を阻害し、 β シート構造とは異なる不溶性のアモルファス蓄積物の産生を猛烈に加速していることが明らかになった。この A β 蓄積物は不溶性が強いがアミロイドではない。

アルツハイマー病病原性点突然変異体 PS1 をノックインした遺伝子組み換えマウスとアルツハイマー病病原性点突然変異体 APP を過量発現させた遺伝子組み換えマウスを交配し、そのマウスにアルミニウムを投与したところ、特定の濃度ではアミロイドベータ蛋白沈着であるマウス老人斑の形成速度が加速する可能性を示唆する結果を得た。

以上まとめると、A β 産生に対するアルミニウムの効果は、A β の凝集速度の著しい増大により産生の低下があるように見えたが実際はなかった。A β の凝集に対するアルミニウムの効果は非常に強く、実際不溶性の蓄積物を生じるが、その形態はアミロイドフィブリルとは異なるアモルファスな構造であった。つまりA β 産生凝集に対するアルミニウムの効果はアルツハイマー病のそれとは似て非なるものである。

(5) アルミニウムなど金属によるタウ蛋白のリン酸化・神経原線維変化形成への効果について検討する。

タウ蛋白変異による家族性痴呆症としてFTDP-17が知られているが、このタウ蛋白アミノ酸変異における神経変性機序とアルミニウム神経毒性とに何らかの関わりがあるかどうかについて研究をおこなった。野生型および変異タウ遺伝子導入PC12細胞を用いて、アルミニウムによる神経細胞死、神経突起伸張、タウ蛋白リン酸化の程度について検討した。アルミニウムにより、NGF分化後のPC12細胞の神経細胞死が誘導されたが野生型、P301L、R406Wのタウ蛋白導入細胞の中ではR406Wにおいてアルミニウム誘導性細胞死が多かった。NGF分化誘導による神経突起伸張は野生型、P301L、R406Wのタウ蛋白導入細胞間では有意な差を認めなかったが、250 μ M アルミニウム/マルトールによりNGF分化誘導による神経突起伸張は阻害され、またこの効果は変異タウ導入細胞で大きかった。野生型、P301L、R406Wのタウ蛋白導入細胞の中では非刺激時において変異タウ導入細胞においてタウ蛋白リン酸化のレベルが高く、またアルミニウム刺激によって誘導されたタウ

ウ蛋白リン酸化の程度も変異タウ導入細胞において高かった。上記の結果はアルミニウムが対蛋白を介してアルツハイマー病病理過程を促進する可能性を示している。

次にタウ重合におけるアルミニウムの影響について検討した。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。

以上まとめると、タウ蛋白の異常なリン酸化とそれに由来する異常な蓄積について検討したところ、アルミニウムはタウ蛋白のリン酸化を促進し、不溶性蓄積物の生成を促進したが、その蓄積物の構造はアルツハイマー病のそれとは異なった。

つまりタウ蛋白のリン酸化・凝集に対するアルミニウムの効果はアルツハイマー病のそれとは似て非なるものである。

(6) アルミニウムのアルツハイマー病発症に関連するHMG-I,PS2V誘導への効果。

アルミニウムは小胞体ストレス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

ることが明らかなった。さらに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。

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。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。

まとめると、アルミニウムは PS2V 産生機構に影響を与え、この経路を介した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。

D. 考察

アルツハイマー病の発症に至る病理過程はアミロイド β 仮説と ER ストレスを介したストレス応答仮説などが知られている。今回の我々は各仮説の分子基盤を専門とする研究者が各々その部分についてアルミニウムの効果を検討した。結果として危惧されたとおりアルミニウムは広範な神経細胞毒性を示したにもかかわらず、アルツハイマー病とアルミニウムの直接的な因果関係を断定するだけの証拠は集まらなかった。

A β 仮説に関して検討したところ、<アルミニウムによる「A β の産生・凝集の異常」、「タウ蛋白のリン酸化と凝集の異常」はアルツハイマー病のそれとは似て非なるもの

であった>。さらにアルミニウムはアルツハイマー病の臨床症状の根本として考えられているシナプス障害の強い原因となったが、そのシナプス障害はアルツハイマー病で起こるような A β オリゴマーの作用ではなかった。一方 ER ストレスを介したアルツハイマー病発症プロセスに当てはめて考えるとアルミニウムはその過程を促進している可能性が示唆された。

このような結論の齟齬の原因はアルツハイマー病の病理過程を説明する仮説が単一でないことに起因する。A β 仮説は多くの研究結果の示唆する強力な仮説であり、それに基づいて薬剤の開発が進んでいる。上記のようにこの仮説に法って考えるとアルミニウムのアルツハイマー病発症への関連は小さいと結論できる。しかし、ER ストレス反応に対する応答性の変化が多く神経変性疾患発症の共通メカニズムとして注目されていることも事実である。したがって今回の結果の中でアルミニウムは PS2V 産生機構に影響を与え、この経路を介したアルツハイマー病の発症に関与する可能性も無視するわけにはいかない。今後、アルツハイマー病の病理過程を明らかにする研究の進歩に伴い明らかにされていく問題であると考えられる。

E. 結論

アルミニウムは神経機能障害を引き起こすが、総合的に判断すると「アルミニウムが孤発性アルツハイマー病の原因である」と断定するだけの証拠は見つからなかった。

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
- Yamamori H, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Amyloid-beta down-regulates XIAP expression in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport.* 2004 15(5):851-4.
- C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene affects plasma homocysteine level and is genetic factor for late-onset Alzheimer's disease
T Kida, K Kamino, M Yamamoto, D Kanayama, T Tanaka, T Kudo, M Takeda
Psychogeriatrics 4, 4-10, 2004
- Nicergoline augmentation treatment of late onset depression
A Watanabe, Y Ikejiri, M Takeda
Psychogeriatrics 3, 115-118, 2003
- Donepezil increases regional cerebral blood flow in a case of Korsakoff syndrome
A Ogino, T Nishikawa, Y Sugita, M Takeda
Psychogeriatrics 3, 119-122, 2003
- Efficacy of combination treatment of fluvoxamine and tiapride for repetitive behaviors in frontotemporal lobar degeneration
Y Masaki, Y Ikejiri, T Nishikawa, N Hatta, H Kazui, M Takeda
Psychogeriatrics 3, 123-126, 2003
- Discussions on the role of neprilysin and degrading system
Takaomi Saido, Masatoshi Takeda, Katsuya Urakami, Mikio Shoji, Nobuo Ito, Takeshi Iwatsubo, Akira Tamaoka, Kazutomi Kanemaru
PSYCHOPGERAITRICS 4,S13-18, 2004
- Discussions on laminin as a possible biomarker for neurodegenerative
Kazunori Matsuda, Masatoshi Takeda, Katsuya Urakami, Masato Hasegawa, Koichi Ishiguro, Takaomi Saido, Mikio Shoji, Kazutomi Kanemaru, Akira Tamaoka, Takeshi Iwatsubo, Nobuyuki Okamura, Nobuo Ito, ,
PSYCHOPGERAITRICS 4,S13-18, 2004
- Discussions on phosphorylated tau and other biochemical markers
Katsuya Urakami, Koichi Ishiguro, Takaomi Saido, Takeshi Iwatsubo, Nobuyuki Okamura, Nobuo Ito, Kazutomi Kanemaru, Akira Tamaoka, Masato Hasegawa, Mikio Shoji Akihiko Takashima, Makoto Hamamoto, Kazunori Matsuda, Hiroyuki Arai, Masatoshi Takeda, *PSYCHOPGERAITRICS* 4,S45-50,

2004

Okochi M, Fukumori A, Satoh Y, Aidaraliev N, Tani H, Kamino K, Tanaka T, Kudo T, Takeda M. Alzheimer's gamma-secretase mechanism produces Ab-like peptides simultaneously with release of intracellular signaling fragments
Molecular Neurobiology of Alzheimer's disease and Related Disorders. Basel, Karger, 2004, pp31-41

Kamino K, Kida T, Takeda M
Clinical assessment of the genetic risk functions in Alzheimer's disease
Molecular Neurobiology of Alzheimer's disease and Related Disorders. Basel, Karger, 2004, pp71-78

Cacabelos R, Fernandez-Novoa L, Pichel V, Lombardi V, Kubota Y, Takeda M
Pharmacogenomic studies with a combination therapy in Alzheimer's disease
Molecular Neurobiology of Alzheimer's disease and Related Disorders. Basel, Karger, 2004, pp94-107

Kudo T, Katayama T, Imaizumi K, Kanayama D, Sowa M, Okochi M, Tohyama M, Takeda M
Involvement of unfolded protein responses in Alzheimer disease.
Molecular Neurobiology of Alzheimer's disease and Related Disorders. Basel, Karger, 2004, pp123-133
Tanaka T, Yamamori H, Wasa-Isoe K, Tsujio I, Takeda M
Activated protein kinases and phosphorylated tau in Alzheimer disease
Molecular Neurobiology of Alzheimer's disease

and Related Disorders. Basel, Karger, 2004, pp225-235

Cacabelos R, Lombardi V, Fernandez-Novoa L, Kubota Y, Corzo L, Pichel V, Takeda M
A functional genomics approach to the analysis of biological markers in Alzheimer disease
Molecular Neurobiology of Alzheimer's disease and Related Disorders. Basel, Karger, 2004, pp236-285

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.
Induced HMGA1a expression causes aberrant splicing of Presenilin-2 pre-mRNA in sporadic Alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 2003 Jun;10(6):698-708.

The cytosolic inclusion bodies that consist of splice variants that lack exon 5 of the presenilin-2 gene differ obviously from Hirano bodies observed in the brain from sporadic cases of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett.* 2002 Aug 9;328(2):198-200.

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.
- 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 Hsc7-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)
- 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.* Jan 21;100(2):721-6(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. *J. Biol Chem*, 278(9): 6748-6754(2003).
- Yuji Yoshiike, De-Hua Chui, Takumi Akagi, Nobuo Tanaka, and Akihiko Takashima. Specific compositions of amyloid- β peptides as the determinant of toxic β -aggregation. *The Journal of Biological Chemistry*:vol.278,No.26 (2003) 23648-23655
- Kenjiro Ono, Yuji Yoshiike, Akihiko Takashima, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, and Masahito Yamada
Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. *The Journal of Neurochemistry*:87(2003)172-181
- Philippe Marambaud, Paul H. Wen, Anindita Dutt, Junichi Shioi, Akihiko Takashima, Robert Siman, and Nikolaos K. Robakis A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/e-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutants. *Cell*:114 (2003)635-645
- Planel E, Sun, X, Takashima A., Role of GSK-3 β in Alzheimer's disease pathology", *Drug Dev. Res.* 56, 491-510 (2002)

- Sato, S, Tatebayashi, Y., Akagi, T., Chui, D-H, Murayama, M., Miyasaka, T., Planel, E., Tanemura, K., Sun, X, Hashikawa, T., Yoshioka, K., Ishiguro, K., Takashima, A. Aberrant tau phosphorylation by GSK-3 β 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.* May;81(3):434-40 (2002)
- Xia X, Wang P, Sun X, Soriano S, Shum WK, Yamaguchi H, Trumbauer ME, Takashima A, Koo EH, Zheng H. The aspartate-257 of presenilin 1 is indispensable for mouse development and production of {beta}-amyloid peptides through {beta}-catenin-independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 8760-8765 (2002)
- Tanemura, K., Akagi T., Murayama, M., Hashikawa, T., Tominaga T., Ichikawa, M., Yamaguchi, H., and Takashima, A. Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau. *J. Neurosci.* 22, 133-141 (2002)
- X. Sun, S. Sato, O. Murayama, M. Murayama, J.-M. Park, H. Yamaguchi, and Takashima A. Lithium inhibits amyloid secretion in COS7 cells transfected with amyloid precursor protein C100. *Neurosci. lett.* 15, 61-64 (2002)
- Sun, X, Cole, GM, Chu, T., Xia, W., Galasko, D., Yamaguchi, H., Frautschy SA., 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)
- Aremu DA, Meshitsuka S. Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex and its apoptotic effect. *Brain Research* 1031, 284-296 (2005).
- Aremu DA, Sakurai A, Meshitsuka S. Uptake of aluminum amino acid complexes in cultured astrocytes. *Biomedical Research Trace Elements* 15(1) 66-68 (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 1345-1351 (2004).
- Meshitsuka S, Tominaga L, Hikita J, Inoue M, Aremu DA, Matsushima F. Intake, metabolism and excretion of aluminum. *Trace Elements Electrolytes* 20(1), 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).

Aremu DA, Olawuyi JF, Meshitsuka S, Sridhar MK, Oluwande PA. Heavy metal analysis of groundwater from Warri, Nigeria. *International J. Environmental Health Research* 12, 261-267 (2002).

Meshitsuka S, Aremu DA, Nose T. A risk of Alzheimer's disease and aluminum in drinking water, *Psychogeriatrics* 2,263-268 (2002).

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 p75NTR 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

Hashimoto R, Senatorov V, Kanai, H, Leeds P, Chuang D-M. Lithium Stimulates Progenitor Proliferation in Cultured Brain Neurons, *Neuroscience*, 117(1):55-61, 2003.

Hashimoto R, Fujimaki K, Jeong MR, Christ L, Chuang D-M. Lithium-induced Inhibition of Src Tyrosine Kinase in Rat Cerebral Cortical Neurons: A Role in Neuroprotection against N-methyl-D-aspartate Receptor-mediated Excitotoxicity, *FEBS Lett*, 538(1-3):145-8, 2003.

Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS, Chuang DM. Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett* 542(1-3): 74-78, 2003.

Matsumoto N, Nakamura Y, Kashiwagi Y, Hashimoto R, Kudo T, Tanaka T, Shinosaki K, Takeda M. Involvement of Rho-associated kinase in neurite sprouting and amyloid beta production of rat cortical neurons cultured in insulin-free medium, *Psychogeriatrics*, 3(1):21-28, 2003.

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)

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
大河内正康、武田雅俊 PCT/JP2004/1668

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究課題名：アルミニウムなどの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に関する研究)

分担研究者 武田雅俊 大阪大学大学院医学系研究科・精神医学・教授

研究要旨

アルミニウムがアルツハイマー病 (AD) のリスクファクターであるか否かに関する議論は依然として決着をみていないが、本研究では神経可塑性に対するアルミニウムの影響について検討した。20 週齢のマウス海馬スライスを対象とし、指標としては field EPSP (fEPSP) の傾きと長期増強 (LTP) を用いたところ、LTP の持続形成に明らかな障害がみられ、導入後 50 分で約 50% まで低下がみられた。また、アルミニウムの神経可塑性への影響を検討する目的で長期減少現象 (LTD) における AMPA 受容体の代謝について検討した。LTD で取り込まれた AMPA 受容体は、アルミニウム非存在下では、速やかに分解されるが、プロテアソーム阻害薬あるいはアルミニウム存在下では、AMPA 受容体の代謝が低下しており、LTD 形成に支障を来すことが推測される。GFPu 導入神経芽細胞腫でプロテアソーム機能をモニターすると、アルミニウムによりプロテアソーム機能が低下することが観察された。合成基質を用いたプロテアソーム活性測定でも、アルミニウムによる活性の低下が観測された。以上のように、アルミニウムは LTP および LTD に影響を及ぼし、特に LTD においてはアルミニウムによるプロテアソーム機能低下が AMPA 受容体の代謝を阻害することが明らかとなった。従って、比較的高用量のアルミニウムはプロテアソームを阻害することで、神経可塑性に影響を及ぼすことが示された。

A. 研究目的

アルツハイマー病 (AD) の発症機構とアルミニウムの因果関係については、否定的な意見が多いものの、結論が得られているわけではない。一方、近年 Mild Cognitive Impairment (MCI) 芽、痴呆前駆状態として注目されている。神経細胞脱落が顕著でない MCI だが、AD の病理過程は既に進行しているとされ、MCI の診断治療が注目されている。本研究は、この神経細胞が明らかではなく神経機能に変調をきたしている MCI を想定し、分子レベルでの神経可塑性発現に、アルミニウムが如何に関与するかを検討する。すなわち、シナプスの長期増強現象 (LTP) に対するアルミニウムの影響に関し、電気生理学的に検討し、長期減少現象 (LTD) の分子機構とアルミニウムの関係について検討した。

B. 研究方法

・海馬スライスを用いた LTP の電気生理学的検討
マウス (20 週齢) はエーテル麻酔後断頭し、摘出した脳は酸素消費度を減らすため、95%O₂/5%CO₂ にて十分に飽和し氷冷した人工脳脊髄液 (ACSF: NaCl 126mM, NaHCO₃ 26mM, D-glucose 10mM, KCl 5mM, NaPO₄ 1.25mM, MgSO₄ 1.8mM, CaCl₂ 2.5mM, pH7.4) 中で 5 分間冷却した。次に海馬体を含む脳ブロックを切り出し、Tissue Chopper (Stoelting 社) を用いて厚さ 450 μm の海馬スライスを作製した。作製した海馬スライスは直ちに室温で 95%O₂/5%CO₂ にて飽和した ACSF 中に 2 時間静置してスライス作製手技による組織損傷からの回復を待った。fEPSP の細胞外記録のため、ACSF を満たしたガラス電極 (抵抗 ~1MΩ) を海馬 CA1 領域の stratum radiatum に静置し記録を行った。反応は低頻度刺激 (0.2Hz, 0.05ms) で Schaffer 側枝をタングステン電極で刺激し、field EPSP (fEPSP) の最大振

幅の 40%の反応が得られるように刺激強度を調整した。記録中海馬スライスには 95%O₂/5%CO₂にて飽和した ACSF にて灌流した。安定した記録が得るため最低でも 30 分間刺激を続けた後、基礎シナプス活動として 10 分間 fEPSP を記録した。スライスに高頻度刺激 (HFS : 3 train、100Hz で 1 秒、train 間隔 5 秒) を行い LTP を誘導した。誘導後は再び 0.2Hz にて継続して刺激を行い、fEPSP の変化を記録した。アルミニウム曝露は海馬スライスを 100 μM アルミニウム含 ACSF にて灌流することにより、HFS 直前の 10 分間行った。アルミニウムは不溶性のリン酸化物や硫化物を形成するため、ACSF の組成を一部変更した modified ACSF を使用した。Modified ACSF で灌流を行った際、fEPSP の振幅に減弱がみられたが (3~9%) 持続した低下はみられず、LTP の誘導にも影響はみられなかった。記録したデータの取り込みと解析には Axon 社の pCLAMP (Ver 8.0) を使用し、fEPSP の傾きを指標として測定した。

・ビオチン化でのグルタミン酸レセプター(GluR)の免疫組織

AMPA 刺激により GluR は神経細胞内に取り込まれ、プロテアソームにて代謝されることで、LTD は行われることが知られている。アルミニウム添加 (100、500 μM) 及びプロテアソーム阻害薬添加培養細胞を 4℃ の PBS++ (PBS、MgCl₂ 1mM、CaCl₂ 2.5mM) で洗浄し、Sulfo-NHS-SS-biotin 1.5mg/ml / PBS++を加えて 4℃・20 分間静置し細胞表面をビオチン化させた。その後 Glycine 50mM / PBS++ に置き換えてビオチン化反応を止め、通常の培地に戻して 37℃・5 分間培養した。その後 37℃の PBS で細胞を一度洗った後、AMPA 100μM、Tetrodotoxin 1μM、D-APV 50μM を加えた培地で 37℃・15 分間培養した。これを 4℃に冷却したグルタチオン溶液 (Glutathione 50mM、NaCl 75mM、EDTA 10mM、1% BSA、NaOH 0.075N) で 2 度洗浄することで細胞表面のビオチンを除去し、更に Iodoacetamide 5mg/mL / PBS++ で 2 度洗浄し脱ビオチン化反応も停止させた。この細胞を Zamboni 液 (ピクリン酸 0.21g、パラホルムアルデヒド 4% / PBS) で固定した後 PBS で洗浄し、streptavidin-FITC / PBS を加えて 37℃・30 分間静置し、洗浄した上で位相差蛍光顕微鏡にて観察した。

・プロテアソーム活性の測定

アルミニウムを含んだ培地で細胞を 24 時間培養し、PBS で一度洗ったのち Lysis Buffer (Tris-HCl (pH 7.5) 50 m M、NaCl 100mM、CHAPS 0.2%、EDTA 5mM、EGTA 1mM、NaN₃ 3mM、Protease Inhibitor Cocktail) で細胞を集め、45000rpm で 30 分間遠心して上清を回収した。プロテアソーム活性に対する蛍光基質はそれぞれ、トリプシン様活性に対しては Boc-LRR-AMC、キモトリプシン様活性に対しては Suc-LLVY-AMC、カスパーゼ様活性に対しては Z-LLE-AMC を用い、これらが 50μM になるように反応液 (Tris-HCl (pH 7.3) 50 m M、NaCl 100mM、EDTA 5mM、EGTA 1mM、NaN₃ 3mM、DTT 2mM) で調整した。この反応液 100μL と細胞抽出液 80μL を混合し、遮光して 15 分間 37℃で反応させた後、380nm で励起し 440nm で発光させてその蛍光強度を測定した。この測定値をそれぞれの抽出液の蛋白質濃度で標準化し、それぞれの基質についてコントロール群を 1 とした際の相対的な蛍光強度を算出した。

・プロテアソームのサブユニットの RT-PCR

アルミニウムで 24 時間刺激した細胞を回収し、QIAGEN RNeasy kit を用いて RNA を抽出した。RNA の濃度を測定してそれぞれの濃度を 100ng/μL に調整したのち、ABI cDNA Archive kit を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、Taqman PCR kit と ABI より購入したプライマーセットを用いて RealTime PCR を行い、その増幅率からそれぞれの遺伝子の発現量を算出した。

(倫理面への配慮)

マウスの扱いにあたっては、大阪大学動物実験指針に則って行った。

C. 研究結果

海馬スライスをアルミニウムによる灌流を行い電気生理学的検討したところ、アルミニウムフリー環境下と同様に fEPSP に差はみられなかったが、STP・LTP には著明な低下が観察され、灌流後 50 分でアルミニウムフリーと比較して fEPSP の振幅は約 50%まで低下がみられた。

AMPA により刺激すると、ビオチン化された GluR は神経細胞内に取り込まれ、速やかに代謝されるが、プロテアソーム阻害薬で処理しておくこと、GluR は代謝されずに神経細胞内に残存しており、LTD が障害され

ることが示唆された。アルミニウム添加では、プロテアソーム阻害薬まではいかなくとも、GluR の細胞内残存がみられ、LTD 障害されることが示された。

アルミニウムの LTD に対する効果は、プロテアソーム阻害によると予想されるため、アルミニウム存在下のプロテアソームについて測定した。3種類の基質 Boc-LRR-AMC (トリプシン様活性)、Suc-LLVY-AMC (キモトリプシン様活性)、Z-LLE-AMC (カスパーゼ様活性)を用いてアッセイしたところ、全ての基質に対し、アルミニウム濃度依存的に活性低下が認められた。

アルミニウムのプロテアソームへの直接的影響をみる目的で、プロテアソームサブユニット PA28、Rpn10、b1、b6 の発現レベルについて RT-PCR で検討した。プロテアソーム阻害薬ではそれぞれのサブユニットの誘導が認められたが、アルミニウムにはそれが認められなかった。

D. 考察

近年、AD の前駆状態とも言うべき MCI が注目されている。即ち、神経変成に至る前でのシナプス機能の変化や神経可塑性の変化は、AD の病理過程を考える上でも、極めて重要であると考えられる。神経細胞はグルタミン酸刺激により細胞表面の GluR 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 GluR 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。アルミニウムの添加が AMPA による細胞内に移行された GluR の代謝を阻害することが、今回の検討で明らかになったが、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。しかし、プロテアソームのサブユニットの刺激誘導は通常のプロテアソーム阻害剤では起こるが、アルミニウムではそれが観察されず、アルミニウムによるプロテアソームの阻害形式は一般の阻害剤とは違う可能性を示唆した。

E. 結論

今回のマウスを用いた我々の研究では、アルミニウムは明らかな LTP 阻害作用を示した。使用した濃度

は $100\mu\text{M}$ と比較的高濃度でかつ急性投与の毒性をみるものであったが、少なくとも一定条件下でアルミニウムはシナプス活動に対し毒性を有することが結果から示唆される。

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

アルミニウムの神経可塑性への影響を検討する目的で長期減少現象(LTD)における AMPA 受容体の代謝について検討した。LTD で取り込まれた AMPA 受容体は、アルミニウム非存在下では、速やかに分解されるが、プロテアソーム阻害薬あるいはアルミニウム存在下では、AMPA 受容体の代謝が低下しており、LTD 形成に支障を来すことが推測される。GFPu 導入神経芽細胞腫でプロテアソーム機能をモニターすると、アルミニウムによりプロテアソーム機能が低下することが観察された。合成基質を用いたプロテアソーム活性測定でも、アルミニウムによる活性の低下が観測された。以上のように、アルミニウムは LTP および LTD に影響を及ぼし、特に LTD においてはアルミニウムによるプロテアソーム機能低下が AMPA 受容体の代謝を阻害することが明らかとなった。

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

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

Yuka Yasuda, Takashi Kudo, Taiichi Katayama,

Kazunori Imaizumi, Misako Yatera, Masayasu Okochi, Hidenaga Yamamori, Naohiko Matsumoto, Takayuki Kida, Akio Fukumori, Masayo Okumura, Masaya Tohyama, and Masatoshi Takeda
Biochem Biophys Res Commun. 296, 313-318, 2002

Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1 Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C. EMBO J 21(20):5408-5416, 2002

C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene affects plasma homocysteine level and is a genetic factor of late-Onset Alzheimer's disease

Tomoyuki Kida, Kouzin Kamino, Mitsuko Yamamoto, Daisuke Kanayama, Toshihisa Tanaka, Takashi Kudo, and Masatoshi Takeda
Psychogeriatrics, 4(1):4-10, 2004.

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（生活安全総合研究事業）

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：アルミニウムなどの金属による神経毒性および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

初年度では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(1-2mM)を行なった。その結果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。次年度では、アルミニウムなどの金属がアミロイドベータ蛋白(A β)の凝集過程にどのように関与しているかを検討した。A β 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た結果、アルミニウムなどの金属イオンが試験管内では、A β 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。低濃度アルミニウム(10-100 μ M)を負荷した培養細胞系を用いた実験結果もこれを支持した。さらに重要なこと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ことを *de novo* A β 定量・定性システムを用いて明らかにした。最終年度では、アミロイドカスケードの最上流に位置する BACE がアルミニウム負荷による影響を受けるかどうかを検討した。その結果 BACE の mRNA 量及び総タンパク量は、アルミニウム負荷によって変化しなかった。次にアルミニウム負荷による BACE 活性の変化を、 β APP 全長を基質とした *in vitro* BACE assay 系を新たに確立し検討した。その結果、低濃度アルミニウム負荷による BACE 活性の変化は認められなかった。以上よりアルミニウムなどの金属は、アミロイドカスケードの最上流に位置する BACE の mRNA 量や総タンパク量に変化は来さないこと、また BACE の活性やプレセニリン γ -secretase 活性には直接影響を及ぼさないことが明らかになった。まとめるとアルミニウムなどの金属は、高濃度では神経細胞に毒性を呈し、比較的低濃度では、生成された A β の凝集過程に変化を来すことで、老人斑形成に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。