

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 (BAPP) 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。そこで我々はアルミニウムが神経細胞に及ぼす毒性の機序を調べるとともに、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。プレセニリン PS1 野生型、変異体 $\Delta E9$, PS1L250S を定常的に発現する SH-SY5Y を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ト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。SH-SY5Y 細胞を用いた神経毒性の実験ではさらに LIVE/DEAD EukoLight Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes) を用いて測定した。

4) 免疫組織化学

培養細胞を TBS で洗浄・固定した後、各種一次抗体で 24 時間 4 $^{\circ}$ C インキュベートを行った。蛍光標識二次抗体を反応させ、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

5) *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°C, 30 分間インキュベートした。100,000 xg 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。

6) BACE の mRNA 定量

培養液にアルミニウムマルトールを 0, 10, 100 μ M の濃度で添加し、培養 24 時間及び 48 時間後、細胞をそれぞれ回収した。回収した細胞から mRNA を定法で抽出、RT-PCR 法を用いて BACE mRNA を定量した。

7) BACE の総タンパク量定量

培養液にアルミニウムマルトールを 0, 10, 100 μ M の濃度で添加し、培養 24 時間及び 48 時間後の細胞をそれぞれ回収した。回収した細胞を RIPA で溶き、可溶分画をタンパク定量の後 SDS-PAGE を行い、抗 BACE 抗体 (CHEMICON; MAB5308) でウェスタンブロッティング解析を行った。

8) BACE の発現量定量

培養液にアルミニウムマルトールを 0, 10, 100 μ M の濃度で添加し、培養 24 時間及び 48 時間後の細胞をそれぞれ S^{35} で 20 分ラベルした。その後回収した細胞を RIPA で溶き、可溶分画を抗 BACE 抗体 (R&D MAB9311) で免疫沈降の後 SDS-PAGE を行い autoradiography 解析をした。

9) in vitro BACE assay

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。その後 S^{35} で 20 分ラベルの後回収し、定法により粗膜分

画を抽出した。37°C, 40 分間インキュベートした後、RIPA で可溶化し、抗 APP 抗体で免疫沈降の後 SDS-PAGE を行い autoradiography 解析をした。産生された CTF- β の量を BAS を用いて測定した。

C. 研究結果

家族性アルツハイマー病の突然変異を導入した神経細胞系に対して、高濃度アルミニウム (1mM, 2mM) のパルス曝露を行なったところ、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。次に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。swAPP を発現させた HEK 細胞に、細胞毒性を呈さない低濃度のアルミニウムマルトール (最高 100 μ M) 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、マス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。アミロイドベータ蛋白単量体の分泌量の低下が、産生の低下によるのか否かを調べるために、*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ト法で、その分子種をマスマスプロト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。

次に swAPP 発現細胞を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 時間処理した際の mRNA 量を測定した結果、対照と比べて有意な差は認められなかった。次に同様の処理を行った細胞の内在性 BACE の発現量をパルス実験で検討したところ、mature BACE の量は全く変化がなかった。さらにウェスタンブロット法による BACE 総タンパク量は対照と比較して差が認められなかった。しかしパルス実験では、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とした。

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の神経毒性を調べるとともに、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は、高濃度では細胞骨格および

軸策輸送系に障害を与えること、その程度はプレセニンに変異があるとさらに重度になることを見出した。さらにアルミニウムは試験管内では、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。また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。つまり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

アルミニウムはアルツハイマー病の環境危険因子の一つとして考えられている。家族性アルツハイマー病において、ニューロフィラメントの分布異常や軸策輸送障害が促進されていたことより、プレセニンはアミロイドベータ蛋白を切り出す複合体を構成する因子であるとともに、細胞骨格にも何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。また低濃度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、アミロイドベータ蛋白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.

Presenilins mediate a dual intramembranous γ -secretase cleavage of Notch-1

Annual Report of Osaka University-Academic Achievement 2002-2003, 22 Graphics Selections, pp. 63

Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lammich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., Haass, C.

Identification of a beta-secretase activity, which truncates amyloid beta-peptide after its presenilin dependent generation.

J Biol Chem. (2003) 278:5531-5538

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

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 鳥取大学大学院医学系研究科 助教授

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の取り込みを測定したところ、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。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。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Alでアポトーシスが観測されたのは例がない。Alの毒性はさらに研究が必要である。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群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Alの添加によってバンドに変化は見られなかった。一方、Ire1 β の発現が見られ、形態学的変化と蛋白質フォールド不全（UPR）に関係する遺伝子発現が、一致していた。また、Al刺激ではアストロサイトはOASIS蛋白質を誘導しなかった。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は、アポトーシスによる細胞死を誘導すると考えられる。これらの結果より、低濃度のAl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。

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

A. 研究目的

加齢により、脳にAlが蓄積していくことが知られている。Alに中枢神経毒性があるため、脳内におけるAlの化学種を特定し、

その性質を明らかにすることは重要である。

脳における細胞外液中のアルミニウムの存在状態はよく分っていない。血液中にはFe運搬体であるトランスフェリンと結合して

いる Al が 90%をしめているといわれる。脳でも同様である可能性もあるが、細胞外液中では Al-citrate が主成分であるという説もある。また、血液脳関門を通過するのは Al-citrate であるとも言われている。また、glutamate と結合した Al が活性種であるという説もあり、未解明の分野である。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用い、アルミニウムの影響を研究した。また、中枢神経系細胞の分化を制御している転写因子の神経変性疾患との関連を探索的に調べた。

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。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。

2) NMR の測定

$^1\text{H}\{^{13}\text{C}\}$ HSQC の測定は Varian Unity Inova-500 で行った。試料に 10% D_2O を添加した。測定条件は pulse width=13.5 μs , acquisition time = 0.197s, spectral width = 5200Hz (^1H), 13000Hz (^{13}C), number of transient = 128, number of increment = 256, decoupler sequence = garpl, temp = 25°Cであった。ケミカルシフトは乳酸のメチル基を ^1H :1.33ppm, ^{13}C :21.2ppm とした。

3) アルミニウムの分析

試料に濃硝酸を加え、ヒートブロック上で加熱し湿式灰化法により有機物を分解したものを分析試料とした。器具はプラスチック製を用い、硝酸は超高純度 (ワコー純薬製) のものを用いた。分析は日立偏光ゼーマン原子吸光分光光度計 (HITACHI AA180-80) にチューブ型グラファイト炉を用いて検量線法によって行った。

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、Hoechst33258 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

6) アポトーシス関連たんぱく質のウェスタンブロットティング

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 μ g/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。

7) 高分解能 NMR による蛋白質の構造解析

大腸菌で Hex 蛋白を大量発現し、C13, N15 で標識した。HSQC, CBCANH, CBCACONH などの測定をプロトン共鳴周波数 500MHz で行った。スペクトルの解析は NMRPipe, Sparky で行った。

C. 研究結果

アストロサイトは培養液中に citrate を放出するが、放出された citrate は再びアストロサイトに取り込まれることはなかった。また、培養液中の citrate に結合した Al は取り込まれなかった。一方, Al-glycine, Al-serine, Al-glutamine はアストロサイトによる取り込みが見られたが, Al-glutamate については, Al 濃度 0.1mM では有意な取り込みは見られなかった。ところが, glutamine synthetase の特異的阻害剤である MSO(methione sulfoximine)の存在下では, Al-glycine, Al-serine に加えて, Al-glutamate が顕著に取り込まれることが示された。一方, Al-glutamine は MSO 存在の場合でも取り込みが増加しなかった。Al の取り込みは細胞のアミノ酸代謝の影響を受けていることを示している。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。取り込みの実験の時間内ではアストロサイトの viability には、今回用いた濃度の Al-アミノ酸錯体では顕著な影響はなかった。ところが、これらの Al-アミノ酸の存在下で 6 時間培養し、その後通常培養液に交換して長時間培養 (10 日) 後、DNA を抽出し電気泳動したところ、DNA の分解が観測された。Al-アミノ酸錯体は 0.1mM の濃度でアストロサイトにアポトーシスを引き起こすことが示された。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 Al 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 Al 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。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、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蛋白質フォールド不全 (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た。ツニカマイシンと A1 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、異なるセンサー機構が存在することが示唆された。さらに、A1-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。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。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は、アポトーシスによる細胞死を誘導すると考えられる。

中枢神経系細胞の分化を制御している転写因子 Hex の構造を NMR で研究した。活性化ドメイン C の全ての原子の帰属を決定した。

D. 考察

生体内の A1 のケミカルスペシエーションについては、未だ不明のことが多い。特に、中枢神経系においては存在量が少ないため、未解明の領域である。特に、glutamine synthetase の特異的阻害剤である MSO(methionine sulfoximine)の存在下では、Al-glutamate が顕著に取り込まれ、一方、

Al-glutamine は MSO 存在の場合でも取り込みが増加しなかった。アストロサイトは、細胞毒性のあるグルタミン酸を取り込み、グルタミンを放出する機能をもっている。グルタミン酸の供給がないと、グルタミンの放出ができないので、細胞は、グルタミン酸の取り込みを亢進させようとする。このことは、今回の Al-glutamate を加えたとき、A1 が顕著に取り込まれた結果をよく説明することが出来る。glutamine synthetase の酵素活性を変化させるような環境要因の暴露がある場合に、疾病との関連があるかもしれない。

今回の実験で、A1 のアミノ酸錯体は中枢神経系における A1 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、A1 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 A1 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A1でアポトーシスが観測されたのは例がない。A1の毒性は一層の研究が必要である。A1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 A1-アミノ酸錯体が A1 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。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。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 の活性化を經由して、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、Al 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、Al 刺激に対して、アストロサイトは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。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。

G. 研究発表

1. 論文

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).

2. 学会発表

Sakurai A, Aremu DA, Meshitsuka S: NMR studies of activating domain of transcription factor Hex with GST. XXI International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems Abstract. p146 (Hyderabad India, 2005).

Aremu DA, Sakurai A, Meshitsuka S: Uptake of aluminum and apoptosis in cultured astrocytes. 第 14 回日本微量元素学会抄録集 p167 (2003).

Aremu DA, Tominaga L, Meshitsuka S: Differential uptake of aluminum-amino acid complexes by cultured astrocytes. Abstract of 11th International Symposium on Trace Elements in Man and Animals p34 (Berkeley USA, 2002).

Meshitsuka S, Hikita J, Tominaga L, Aremu

DA: NMR studies of the effects of aluminum on the metabolism and functions of the cerebellar astrocytes in culture. Abstract of 11th International symposium on Trace Elements in Man and Animals p34-35 (Berkeley USA, 2002).

Aremu DA, Meshitsuka S: Inhibition of glutamine synthetase enhanced uptake of aluminum glutamate by cultured astrocytes. 第 13 回日本微量元素学会抄録集 p136 (2002).

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新生という二つの側面にて検討した。ラット初代神経培養細胞系において、低濃度アルミニウムの長期間暴露は神経細胞生存度に影響を与えなかったが、酸化ストレスによる神経細胞死を亢進した。この効果は、栄養因子欠乏やグルタミン酸による興奮毒性においては認められなかった。また、アルミニウム長期投与によるマウス海馬の神経新生への影響について、BrdU抗体を用いた免疫染色法により新生した細胞を標識して検討した。BrdU陽性細胞の数は、コントロール群に対して、アルミニウム投与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。アルミニウム投与群では、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とから、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による二次的な影響によるものであると考えられた。よって、アルミニウムはある特殊な条件下で神経毒性を持ち、神経新生を抑制する傾向にあると考えられた。本研究から、コリナージックニューロンに対しても、アルミニウムは神経毒性・神経新生抑制効果を持ち、その結果、アセチルコリン分泌を傷害する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、神経細胞死、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参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や、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、アルミニウムの神経生存度・新生に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) 神経細胞生存度の解析

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、 $5 \times 10^5/cm^2$ 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(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。

2) 神経新生の解析

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 200ul 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40um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2N HCl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。培養細胞を用いた実験に関しては、特に倫理面への配慮は必要としていない。

C. 研究結果

1) 神経生存度の検討

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 μ Mから500 μ M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 μ M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 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。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 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。そこで、過酸化水素(50 μ M、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 μ M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 μ M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。

2) 神経新生の検討

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、二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

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ところにあるのかもしれない。

また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

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、アルミニウム投与は、マウス海馬の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、培養神経細胞においても単独で神経毒性が認められ、体重が減少する程度の大量のアルミニウムを投与していることから、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。本研究から、コリナージックニューロンに対しても、アルミニウムは神経毒性・神経新生抑制効果を持ち、その結果、アセチルコリン分泌を傷害する可能性が示唆された。

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

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.

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.

橋本亮太、

統合失調症の包括的遺伝子解析研究
精神医学セミナー、名古屋大学大学院、名古屋、11.27,
2003.

橋本亮太、吉田満吏子、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

統合失調症の候補遺伝子 dysbindin の検討

第 11 回日本精神・行動遺伝医学会、長崎、10.25,
2003.

橋本亮太

精神疾患の包括的研究

東京大学精神神経科集団会、東京、10.2, 2003.

橋本亮太

統合失調症の死後脳における遺伝子発現解析

第 16 回北海道ニューロトランスミッターと疾患研
究会、札幌、9.12, 2003.

橋本亮太

リチウムの神経保護作用

第71回ニューロサイエンス談話会、札幌、9.11, 2003.

橋本亮太

統合失調症の統合的研究

北海道大学医学部精神科教室行事、札幌、9.10, 2003.

Ryota Hashimóto, Richard E. Straub, Cynthia Shannon Weickert, Thomas M. Hyde, Joel E. Kleinman and Daniel R. Weinberger

統合失調症の背外側前頭前皮質におけるニューレグリン1の発現解析

Expression Analysis of Neuregulin-1 in the Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia
第46回神経化学会、新潟、9.24-26(24), 2003.

橋本亮太, Cynthia L. Shannon Weickert, 松本光之, Thomas M. Hyde, Joel E. Kleinman, Daniel R. Weinberger, and Richard E. Straub

統合失調症の脆弱性遺伝子である Dysbindin のトランスクリプトの統合失調症の背外側前頭前皮質における発現の異常な増加

第26回日本神経科学大会、名古屋、7.23-25(25), 2003.

橋本亮太

海馬障害モデル<精神神経疾患の仮説と最新モデル研究>

第32回新潟神経学夏期セミナー、新潟、7.17-19(17), 2003.

橋本亮太

精神医学奨励賞受賞講演

第99回日本精神神経学会総会、東京、5.28-30(29), 2003.

橋本亮太, Cynthia L. Shannon Weickert, 松本光之, Thomas M. Hyde, Joel E. Kleinman, Daniel R. Weinberger, and Richard E. Straub

統合失調症の脆弱性遺伝子である Dysbindin のトランスクリプトの統合失調症の背外側前頭前皮質における発現の異常な増加

第99回日本精神神経学会総会、東京、5.28-30(28), 2003.

橋本亮太, Cynthia L. Shannon Weickert, 松本光之, Thomas M. Hyde, Joel E. Kleinman, Daniel R. Weinberger, and Richard E. Straub

統合失調症の脆弱性遺伝子である Dysbindin のトランスクリプトの統合失調症の背外側前頭前皮質における発現の異常な増加

第25回日本生物学的精神医学会、金沢、4.16-18(18), 2003.

橋本亮太, 松本光之, Cynthia L. Shannon Weickert, Thomas M. Hyde, Joel E. Kleinman, Daniel R. Weinberger, and Richard E. Straub

統合失調症の脆弱性遺伝子である Dysbindin のトランスクリプトの発現解析

第25回日本生物学的精神医学会、金沢、4.16-18(17), 2003.

橋本亮太, 藤巻康一郎, 鄭美羅, Vladimir Senatorov, Lori Christ, Peter Leeds, 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25回日本生物学的精神医学会、金沢、4.16-18(17), 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)

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：金属イオンのアミロイド凝集とその毒性発現における役割）

分担研究者 高島明彦 理化学研究所アルツハイマー病研究チーム

研究要旨

アルツハイマー病は老人斑、神経原線維変化、神経細胞脱落が病理学的特徴である。金属イオンとアルツハイマー病発症の関係はこれまで多くの報告が存在するが明確に肯定あるいは否定する論拠とはなっていない。われわれは、アルツハイマー病の発症は神経原線維変化を伴う脳老化が起きている状況下においてアミロイドが神経細胞に作用して神経原線維変化と神経細胞死を加速することによって記名力低下から痴呆症を生ずると考えている。そこで、今回はアミロイド毒性に対する金属イオンの効果を調べた。アミロイドはアモルファスと β -会合という2つの自己会合を生じる毒性を示すのは β -会合をした時である。金属イオン特に亜鉛はアミロイドの会合を促進することが報告されているが、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

社会が急速な高齢化社会を迎えるに当たって老人性痴呆症の克服とその基礎過程となる脳老化の解明が今後の社会のあり方について大きな影響を与える課題となっている。脳老化というのは記憶力の減退、名前が思い出せないというのを実感とする現象ですが、脳老化を研究対象とする上では実体として何が脳の老化を示すかという明確な指標が必要となります。さらに付け加えれば、その指標は老化に伴う脳機能低下を

説明することのできるものでなければなりません。Strehler は老化の定義として普遍性、内在性、進行性、有害性を挙げています。私たちの研究室では、神経原線維変化が脳老化の指標あると考え、加齢に伴う脳機能障害について調べています。神経原線維変化はアルツハイマー病やほかの神経変性疾患でも脳で観察される病理的变化です。この神経原線維変化はタウタンパクが主要構成成分で形成されています。このタウタンパクは神経細胞の細胞骨格を形成してい