

アルミニウムとアルツハイマー病：動物実験の結果

秋山 治彦

東京都医学総合研究所認知症プロジェクト プロジェクトリーダー



私からは、アルミニウムをアルツハイマー病のモデル動物に投与したらどうなるかという実験のお話をさせていただこうと思います。実験結果の一部は、以前のこの会でご紹介しておりますので、本日はその続きとお考えください。これまでアル海の問題、3.11以降皆さまが興味をお持ちの放射線の問題についてのご講演があり、また、この後は認知症に関して非常に身近なお話がありますので、私は少し専門的なお話をいたしますがご容赦下さい。

田平先生から最初にご紹介がありましたように、30分以内の昼寝はアルツハイマー病の予防にいいようです。私の話もちょうど30分で終わりますので、私が話している間に寝て、話し終わるまでに目を覚ましていただきますと、ちょうどその「30分以内のお昼寝」になります。どうぞお気になさらず、寝ていただいてもよろしいかと存じます。

■アルツハイマー病の特徴

田平先生からのイントロダクションがありましたので簡単にいきますが、もう一度、復習ということでアルツハイマー病の紹介をします。左上の写真が、アルツハイマー博士です(図1)。アルツハイマー病は、このアルツハイマー博士が報告した病気です。この病気にかかると脳が縮みます。上の写真が正常な高齢者の方、下がアルツハイマー病の方です。それから、先ほどお話がありましたように、老人斑というアミロイドβ蛋白質の固まりが脳にたくさんできます。また神経原線維変化というタウ蛋白質の蓄積が神経細胞の中に起こります。

それぞれどのようなものか簡単にご紹介します。先ほどの田平先生の写真にもありましたが、こちらの図2は、1911年にアルツハイマー博士が当時の技術で撮った顕微鏡写真です。黒い斑状のものが老人斑です。

図3は、アルツハイマー博士のスケッチです。さすがに当時は写真に撮るのは難しかったのでしょう。神経細胞の中に核がありますが、その核の外側に黒く紐

状に描かれているのが神経原線維変化です。このように老人斑と神経原線維変化という二つの病変ができるのが、アルツハイマー病の特徴です。

老人斑がアミロイドβ蛋白質の固まりであることは1984年に分かりました(図4)。また、その2年後に、神経原線維変化がタウ蛋白質の固まりであることが分かりました(図5)。

■アルツハイマー病が生じる過程

なぜこんなものが脳にできるかという、病気のメカニズムについて少しお話しします(図6)。正常な蛋白質は一つ一つの分子がばらばらになっていますが、そのうちの一つが"変な"格好を取りますと、それが元になって、同じように"変な"格好のものができそれらがくっつきます。このようにアルツハイマー病では、正常な構造の蛋白質が、異常な構造の蛋白質の影響で、同じように異常な構造をとってそこにくっつくというプロセスが繰り返されると考えられます。そして、同じ蛋白質分子がどんどん集まって大きな固まりを作ると、それが老人斑や神経原線維変化になります。これは病気によって生じる異常なプロセスであり、正常ではこのようなことは起こりません。

体の中には、たくさんの種類の蛋白質があります。人間の遺伝子は随分たくさんありますが、一つの遺伝子は一つの蛋白質をコードしていますから、蛋白質の種類も多数あるわけです。その中で、アミロイドβ蛋白質が老人斑を作り、タウ蛋白質が神経原線維変化を作ります。どちらの蛋白質も、もともとは病気とは関係ないのですが、それらが異常な構造をとり多数集まって固まりを作ることが問題なのです。それによってアルツハイマー病が生じるわけです。

二つの蛋白質がなぜ異常になってたまるのかという点ですが、おそらく年齢とともに脳の中にタウ蛋白質がたまりやすくなる要因ができてくるのだらうと思います(図7)。そのような要因が強くなっている状態のところにアミロイドβ蛋白質がたまると、これが加

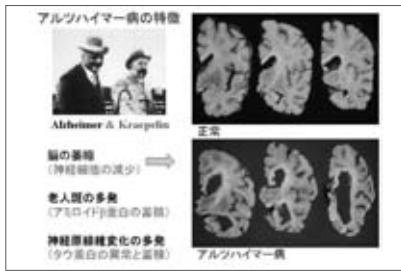


図1

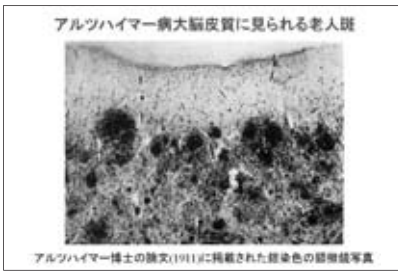


図2

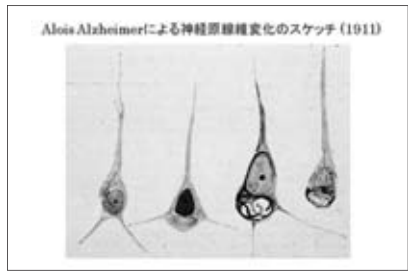


図3

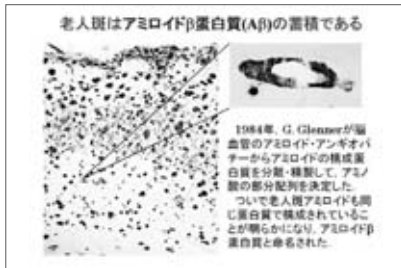


図4

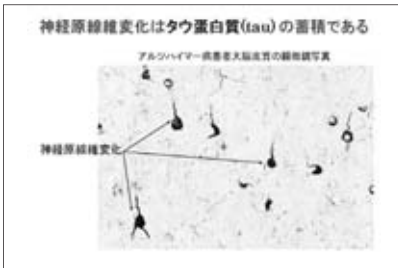


図5

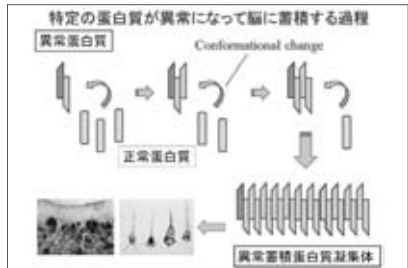


図6

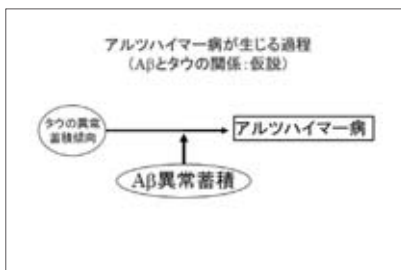


図7



図8

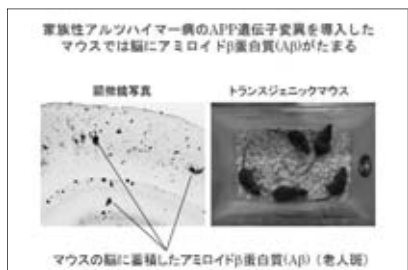


図9

速因子になってアルツハイマー病になっていくのではないか、このように考えると、アルツハイマー病で観察される脳の変化は説明がつかず。

■アルツハイマー病の実験モデル

薬の開発や検査法の開発、また、それらより少し手前のステップである病気の原因の解明をするためには、患者さんの脳を観察させていただくことも重要ですが、実験モデルがないとなかなか研究が進みません。図8にお示した動物には、アルツハイマー病の実験モデルとしてそれぞれ問題があります。

例えば、サルはヒトに近く、老化によって脳にアミロイドβ蛋白質もたまりませんが、寿命が長く、扱うのが難しいという問題があります。一方、マウスは、寿命も1~2年で実験に使いやすいのですが、歳をとってもアミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質が脳にたまりません。クマやツシマヤマネコにはたまりますが、こういった動物はなかなか研究に使えません。今回のテーマである、アルミニウムがアルツハイマー病を加速するかどうかという実験も、サルやクマ、ツシマヤマネコではできません。

そこでアルツハイマー病の研究では、遺伝的操作によってアミロイドβ蛋白質が脳にたまる特殊なマウスを作り、そのマウスを用いて実験をします。これが最も多く使用されているアルツハイマー病のモデルマウスです。タウ蛋白質もマウスでは自然にはたまりませんので、やはり遺伝子操作してタウ蛋白質がたまるようなマウスを作るのですが、タウ蛋白質の遺伝的操作はアミロイドβ蛋白質の場合とは少し違います。アミロイドβ蛋白質がたまるマウスは、家族性アルツハイマー病の遺伝子異常を利用して作ることができます(図9)。一方、タウ蛋白質がたまるマウスは、アルツハイマー病とは別の(しかし、やはりタウ蛋白質が異常になって脳にたまる)病気の遺伝子異常を導入することで作ることができます(図10)。

ただし、アルツハイマー病はおもな病変が大脳皮質にある病気なので、そのモデルも大脳皮質にタウ蛋白質がたまらなくてはならないのですが、現在利用可能なタウ蛋白質の異常蓄積マウスは、そのままだとなかなか大脳皮質にタウ蛋白質がたまりません(むしろ脊髄や脳幹と呼ばれる場所にたまります)。しかしこのマウスと、アミロイドβ蛋白質が大脳皮質にたまるマ

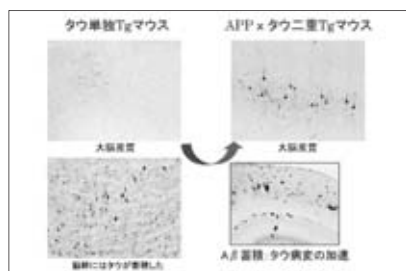


図10



図11

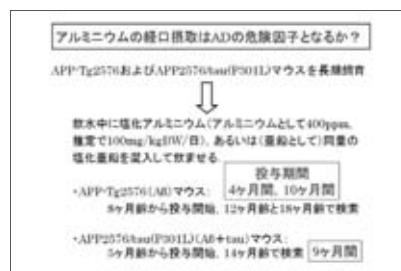


図12

ウスとを掛け合わせて両方の遺伝子異常を持つマウスを作ると、大脳皮質にもタウ蛋白質がたまるようになります。このマウスにおける大脳皮質へのタウ蛋白質蓄積は、アルツハイマー病の場合と同じように、アミロイドβ蛋白質の蓄積によって加速されていると考えられます。そこで、私たちはアミロイドβ蛋白質が脳にたまるマウス、アミロイドβ蛋白質とタウ蛋白質の両方がたまるマウスの二種類を使って実験をしました。

■アルミニウムはアルツハイマー病の原因にはならない

これも田平先生がイントロダクションでお話しになった研究ですが、以前、腎不全治療の目的で水酸化アルミニウム製剤が使われていました。それを大量に服用し、アルミニウム脳症を起こした患者さんの脳を調べたところ、アルツハイマー病の病理所見は認められなかったという、日本人研究者による論文があります(図11)。アルミニウムをたくさん取ってもアルツハイマー病の原因にはならない、という点については、たった一人の患者さんの報告ですが、これで十分です。

■アルミニウムの経口摂取はアルツハイマー病の危険因子となるか？

しかし、原因にはならないけれども、アルツハイマー病になりやすくなるという可能性は残っています。この違いはちょっと難しいのですが、病気になりやすくなる要因は医学では"危険因子"と呼ばれ、必ず病気を引き起こす"病因"とは区別する必要があります。ですから、今回の研究は、アルミニウムがアルツハイマー病の原因にはならないことが分かっているという前提の上で、アルミニウムをたくさん口から摂取したときにアルツハイマー病になりやすくなるかどうかーもう少し具体的に言うと、アルツハイマー病の病変が加速するかどうか、という実験になります。

図12は、私たちが行った実験のデザインです。APP-Tg2576が、アミロイドβ蛋白質だけがたまるマウスです。これにtau (P301L) という、タウ蛋白質がたま

るマウスを掛け合わせて両方の遺伝子異常を持ったマウスを作ると、そのマウスでは、アミロイドβ蛋白質の塊である老人斑とタウ蛋白質の異常蓄積である神経原線維変化の両方が生じます。

これら二種類のマウスを使い、投与期間は短いもので4カ月間、長いもので9~10カ月間としました。マウスの寿命は1年から2年ですのでヒトにあてはめるとかなりの長期間になります。なお、研究では一般に、異常という結果が出るとその実験は論文になるのですが、異常が出ないと論文になりにくいということがあります。そこで、異常という結果が出そうなものとして、亜鉛を投与する実験も一緒に行いました。実は、これまでの様々な研究から、亜鉛の方がアミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質の凝集を促進する可能性が高いと考えられているのです。言ってみれば、亜鉛の投与実験と一緒にやるのであれば、投与による影響が出ない可能性があるアルミニウムについても調べてみてほしいかな、ということだったわけです。

いずれの金属も体重1kg当たり100mgを1日量として経口投与しました。体重50kgの人に換算しますと5gですから、これはかなり多量です。しかし、このぐらいの量であれば、亜鉛でもアルミニウムでも、マウスは体重減少などの問題を起こさず、長期間投与することが可能でした。

■顕微鏡で見えるタイプのAβ蓄積について

ここから先は、実験の、細かい技術的な話になります。ヒトでもマウスでも、脳にアミロイドがたまるといっても、脳の部位によって程度はさまざまです。図13の上は、1匹のマウスの右側の脳半球と左側の脳半球です。黒い点~斑状の構造が全部アミロイドなのですが、左右でこれだけ違います。このように一匹のマウスでも脳の部位によって大きくばらつくものを対象に、どうやってマウス個体間の比較をしたらよいかという問題があります。図の上は18カ月齢まで飼ったマウスですが、これより若いマウスでは状況はさら

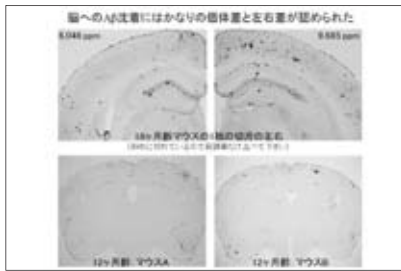


図13

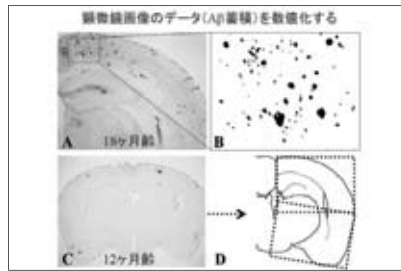


図14

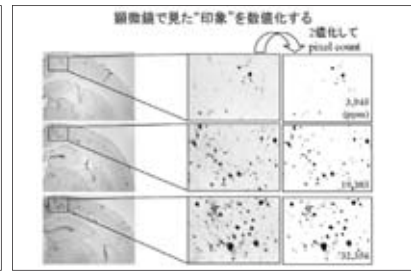


図15

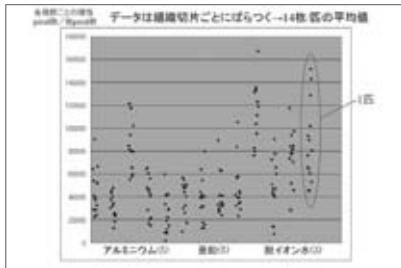


図16

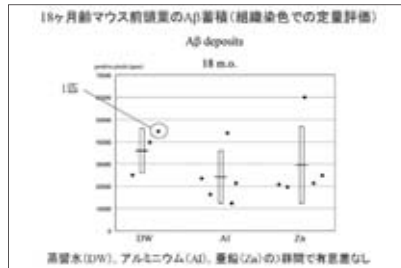


図17

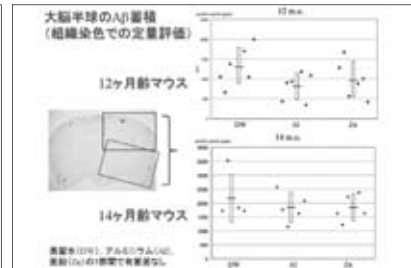


図18

に大変です。図の下は12カ月齢のマウスですが、アミロイドはぱらぱらとしかありません。これだけしかないアミロイドの量を、顕微鏡による観察で評価し比較する方法を考える必要がありました。

そのため、まず顕微鏡写真を撮り、アミロイドがたまっている部分をコンピュータで黒い点に変換して、その点の数を数えることにしました(図14)。18カ月齢のマウスでは大脳皮質の中で最もたくさんのアミロイドがたまっている視野を選んで写真を撮り、その視野に含まれる黒い点の数を数えてアミロイドの蓄積量を推定しました。一方、12~14カ月齢のマウスはアミロイドがさらに少なく、視野の選び方で結果が大きく変わってしまうため、非常に広い範囲—実際には大脳半球全体—の顕微鏡写真を、この図のように撮って、アミロイドの量を数値化しました。

図15は、一例を示しています。見ていただくとすぐに、アミロイドの蓄積は上の写真が少なく、真ん中が中くらいで、下が一番多いという印象を持たれると思いますが、実際に点の数を数えると、それぞれ3,945、19,283、32,356と、得られた値も見た目の印象と一致しています。

ただ、さきほども申しましたように、一匹のマウスでも脳の部位によって値がばらつきました。図16は、生のデータをそのままお示ししています。縦1列が1匹について脳の異なる組織標本(部位)で測定したアミロイドの量(点の数)なのですが、値はこのように広い範囲にまたがります。しかし、よく見ていただくと、ばらついてはいますが、それぞれ個体ごとに一定の傾向があることがお分かりになるとと思います。そこ

で1匹当たり14枚の脳組織標本について測定し、その平均値を出してみました。

これがその結果の一つです(図17)。18カ月齢まで生存し、そのうち10カ月間、大量のアルミニウムもしくは亜鉛を投与したマウスのアミロイドβ蛋白質のたまり具合を点で表しています。この図では平均値を示していますので、一つの点が一匹です。アルミニウムを含む水を飲んだマウスも脱イオン水(DW)を飲んだマウスも、どちらも老人斑の量は変わりませんでした。亜鉛を含む水を飲んだマウスも当初の予想に反して変わらなかったため、これは全部陰性のデータということになります。

ほかの月齢のマウスの結果もお示しします(図18)。14カ月齢というのは、アミロイドβ蛋白質とタウ蛋白質の両方がたまるマウスです。統計学的に解析してみたのですが、普通の水、アルミニウム、亜鉛の3群で差はないという結果が出ました。12カ月齢でも、亜鉛もアルミニウムも変わらないという結果でした。従って、顕微鏡で見えるようなアミロイドβ蛋白質の蓄積に対しては、かなりの量を負荷したにもかかわらず、アルミニウムも亜鉛も影響を与えなかったという結論になりました。

■顕微鏡では見えないタイプのアミロイドβ蛋白質蓄積について

先ほど田平先生がオリゴマーという言葉をおられました。顕微鏡で見えているのは、たくさんのアミロイドβ蛋白質分子が凝集して水に溶けないくらいに大きな固まりになったものですが、脳には、水に溶

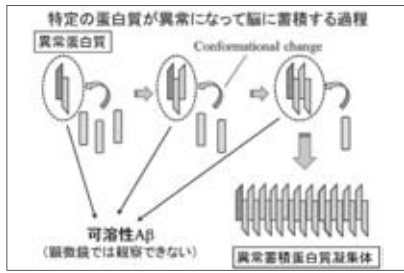


図19

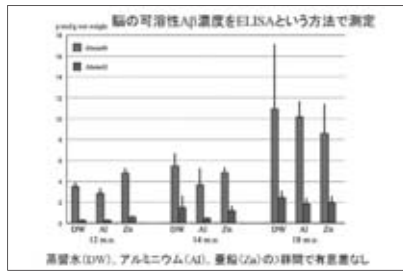


図20

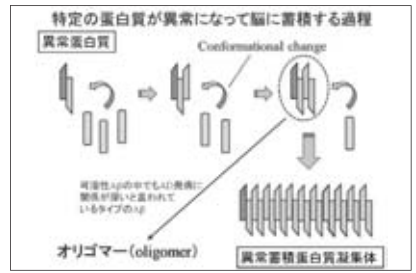


図21

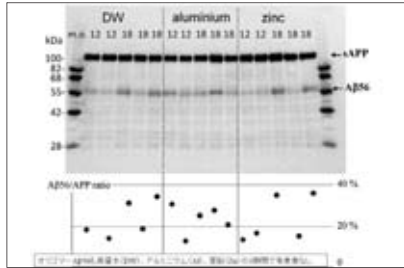


図22

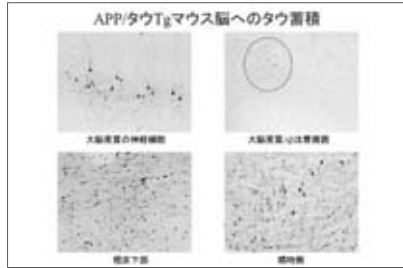


図23

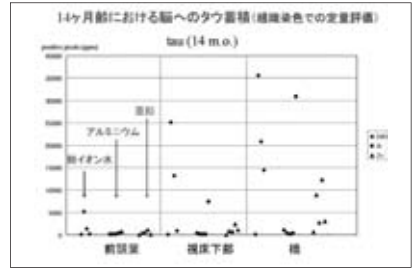


図24

ける程度の小さい(凝集したアミロイドβ蛋白質の分子の数が少ない)固まりになったアミロイドβ蛋白質(Aβ)も蓄積します。これをAβオリゴマーと呼びます(図19)。

まず、水に溶けるとか溶けないとか、そういった細かいことは言わずに、脳にたまったAβ全部を特別な薬を使って溶かし、液体中のいろいろな物質の濃度を測る時に使われるELISAという方法で調べました(図20)。アミロイドβ蛋白質(Aβ)にはいくつかの種類がありますが、この方法では、脳にたくさんあるAβ40と、よりアルツハイマー病に関係は深いけれども量は少ないAβ42とを分けて測ることができます。こうして測ったAβ全体の量も、顕微鏡で観察した、水に溶けない大きな塊を作ったAβと同様、アルミニウム投与マウス、亜鉛投与マウス、普通の水を飲んだマウスの間で差がないという結果が出ました。

次に、さきほど申し上げたAβオリゴマーという、神経細胞にはかなり毒性が強そうだけれども水に溶けるAβを、イムノブロットという方法で調べてみました(図21)。イムノブロット(図22)というのは、分子の大きさと蛋白質を分け、さらに特定の蛋白質(この場合はアミロイドβ蛋白質)に対する抗体を使って、その蛋白質だけに色を付けて肉眼で見えるようにする解析方法です。本来の(単一分子の)Aβは分子量が小さいので、この図では検出できていません。55kDaと書いてある辺りに少し濃いバンドが見えていますが、これがAβオリゴマーの中でも一番よく調べられるAβ56です。一匹一匹のマウスのAβ56のバンドの濃さを測ることで、このAβオリゴマーの量を比べて

みました。なおAβは、もっと分子量が大きな前駆蛋白質から切り出されてできるのですが、その前駆蛋白質が一番上に濃いバンドとして見えています(sAPPと表示)。

イムノブロットの下の点グラフが、定量したAβ56(Aβオリゴマー)の量をプロットして比べてみたものですが、Aβオリゴマーについても、亜鉛も含めて3群のマウス間で差がなかったというのが結論です。

このように、アルミニウムや亜鉛を、私たちの日常生活では考えられないくらい大量に、それも長いものでは10カ月間、つまりマウスでは一生の約半分に対応する長期間にわたって飲ませましたが、脳へのアミロイドβ蛋白質の蓄積には差が生まれませんでした。

■脳へのタウ蛋白質の蓄積

では、タウ蛋白質はどうでしょうか。タウ蛋白質も、異常になって蓄積しますと、このように顕微鏡で観察できるようになります(図23)。このような大脳皮質への蓄積がアルツハイマー病と類似の病理プロセスを示すと申し上げましたが、タウ蛋白質も先ほどのAβのときと同じ方法で脳のいくつかの部位における蓄積を顕微鏡で調べてプロットしてみました。こちらはAβ以上に、マウス個体による差が大きいです(図24)。ただ、いずれにせよアルミニウムや亜鉛の投与により差が生じているようには見えません。今回の実験では、これらの金属の長期経口摂取は、マウス脳におけるタウ蛋白質の蓄積にも影響を与えなかったと考えられます。

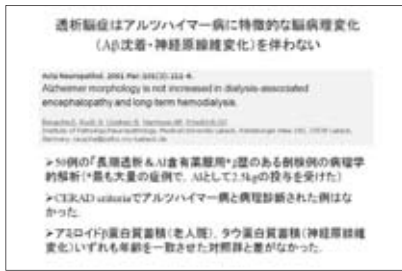


図25

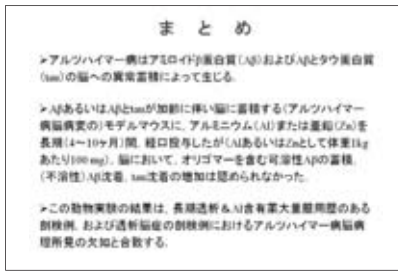


図26

■実験の結果についての考察

このように、遺伝的操作を行ってアルツハイマー病に似た脳病変が生じるようにしたマウス (Tg2576およびTg2576/P301L) に、短いもので4カ月間、長いものでは一生の約半分に当たる9~10カ月間、アルミニウムもしくは亜鉛をたくさん含んだ水を投与したけれど、アルツハイマー病の特徴であるアミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質の蓄積に影響を与えることはできなかった、というのが今回の実験結果です。私たちはこういうものを、ネガティブ・リザルト (陰性の結果) の実験といいます。ネガティブ・リザルトの実験は、なかなか論文になりにくくて大変でした (一応、論文にはしましたが)。

なお2001年に、50例の透析脳症の方の脳を丹念に解析したヨーロッパの神経病理学者が論文を書いています (図25)。アルミニウムのことなどあまり配慮されていなかった時代から長期透析を受けていた患者さんで、しかも、昔はリンの過剰な吸収を防ぐために透析患者さんにアルミニウムを含む薬を飲んでいただいたりもしたので、二重にアルミニウムの摂取が多かったのですが、そういう人たちの脳を調べても、アルツハイマー病と診断された頻度は、同じ年齢層の普通の人たちと変わらなかったという結果が得られています。ヒトでも過剰なアルミニウム摂取によりアルツハイマー病は増加しなかったわけで、私たちの実験結果は、結局、それを確認したということなのかなと思います。

■まとめ

アルツハイマー病の特徴である脳へのアミロイドβ蛋白質の蓄積、タウ蛋白質の蓄積はどちらも異常な変化です。この二つの異常が起きるとアルツハイマー病になるわけですが、遺伝子操作でこの二つの異常が起こるようにしたマウスに、アルミニウムあるいは亜鉛という、ある種の負荷をかけて、このマウスにおいてアミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質の異常蓄積 (病変) が加速されるかどうかを調べてみました。しかし、こ

れらの操作では、顕微鏡で見えるような (水に溶けなにかたまりを作った) アミロイドβ蛋白質やタウ蛋白質の蓄積も増えなかったし、顕微鏡では見えないような、水に溶けるAβオリゴマーの蓄積も増えなかった、というのが今回の結論だろうと思います。先ほどお話ししたように、ヒトで得られている知見と一致しているので、想定範囲内の結果という気もいたします。

もちろん動物実験ですので、例えば実験に用いるマウスの系統が違えばどうなるか、あるいは投与量や投与方法を変えたらどうなるか、といったことについては、やってみないと分からない、というのが正確なところですが、ただ、アルツハイマー病のモデルとして標準的な、非常に幅広く使われているマウスモデルを採用し、かなりの量のアルミニウムや亜鉛を投与してもアルツハイマー病の病変は加速されませんでしたので、たとえばアルミ缶に入ったビールを飲んでいただいても大丈夫だろうという気がした次第です。

以上が、私の動物実験の話です。30分より少し短かったので、早目に「起きてください」と申し上げなくてははいけないのですが、これで終わりにしたいと思います。