

## Jurkat 細胞においてインターロイキン -2 発現を制御する 転写調節因子に対するアルミニウムイオンの影響

秋 山 珠 璃<sup>1)†</sup>, 中 村 優 斗<sup>2)</sup>, 岡 本 健 吾<sup>3)</sup>, 片 山 豪<sup>4)</sup>, 田 中 進<sup>2)</sup>  
 ( <sup>1)</sup>東都大学 管理栄養 管理栄養\*, <sup>2)</sup>高崎健康福祉大学 健康福祉 健康栄養\*\*, <sup>3)</sup>高崎健康福祉大学 農 生物生産\*\*\*, <sup>4)</sup>高崎健康福祉大学 人間発達 子ども教育\*\*\*\*)  
 (受付 2025 年 8 月 25 日, 受理 2025 年 10 月 8 日)

### Aluminum ions modulate interleukin-2-related transcription factors in Jurkat cells

Shuri AKIYAMA<sup>1)</sup>, Yuto NAKAMURA<sup>2)</sup>, Kengo OKAMOTO<sup>3)</sup>, Takeshi KATAYAMA<sup>4)</sup>, Susumu TANAKA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Nutritional Sciences, Faculty of Nutritional Sciences, Tohto University

<sup>2)</sup>Department of Nutrition, Faculty of Health and Welfare, Takasaki University of Health and Welfare

<sup>3)</sup>Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture,  
Takasaki University of Health and Welfare

<sup>4)</sup>Department of Child Education, Faculty of Human Development,  
Takasaki University of Health and Welfare

### Summary

Aluminum (Al), the third most abundant element in the Earth's crust, is widely distributed in nature and used in various industries and products, including pharmaceuticals, food additives, and cosmetics. Although it is a non-essential element for the human body, it plays important roles, such as serving as an active ingredient in the digestive drug sucralose and as a vaccine adjuvant in the form of aluminum phosphate. On the other hand, exposure to Al has been linked to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis, as well as to breast cancer. Because of its toxicity, many studies have been conducted on its biological effects.

Recent studies on the immune system have reported that Aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) suppresses the production of interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in human and chicken T lymphocytes. These findings suggest that AlCl<sub>3</sub> modulates cytokine production in T cells. However, the mechanism of IL-2 suppression by Al is not yet fully understood. In this study, we examined the effects of Al on concanavalin A-induced IL-2 production and mRNA expression in Jurkat cells. We also focused on its influence regarding the transcription factors NF- $\kappa$ B, AP-1, and NFATc1, which regulate IL-2 gene expression. Our results demonstrate that Al modulates IL-2 expression by suppressing NF- $\kappa$ B, AP-1, and NFATc1 activity, thereby leading to reduced T cell cytokine production.

アルミニウム (Al) は、地殻中で3番目に豊富な元素で、広く自然界に存在している。Al は三価の陽イオンで安定しており、ヒトにとって必須の元素ではないものの、工業分野や医薬品の製造において重要な役割を果たしている。また、食品添加物、化粧品、その他の日用品としても幅広く使用され、その用途は広い<sup>1)</sup>。医薬品としての Al はリン酸アルミニウム化合物がワクチンのアジュバンドとして、Al を成分としたスクラルファートは胃炎・消化性

潰瘍治療剤として使用されている<sup>2,3)</sup>。かつては、血液透析液中に微量の Al が含まれていることがあり、その管理が課題とされていた<sup>4)</sup>。また、食品添加物に使用されているミョウバンやベーキングパウダーにおいても Al が含まれており、制酸剤、制汗剤にも Al が利用されている<sup>5)</sup>。一方で Al はアルツハイマー病 (AD)、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病性認知症 (PDD)、自閉スペクトラム症 (ASD) などの神経変性疾患や乳癌の発症に

\*所在地：埼玉県深谷市上紫町西4-2-7 (〒366-0052)

\*\*所在地：群馬県高崎市中大類町37-1 (〒370-0033)

\*\*\*所在地：群馬県高崎市中大類町54 (〒370-0033)

\*\*\*\*所在地：群馬県高崎市中大類町58-2 (〒370-0033)

†連絡先：E-mail: akiyama.shuri2024@gmail.com (秋山)

関連があると報告されており<sup>6-10)</sup>, Alの毒性作用や生物学的な影響については現在までに多くの研究が行われている。中でも免疫毒性に関する研究は数多く報告されており<sup>11)</sup>, 特に細胞性免疫において中心的な役割を果たすTリンパ球に対する影響が注目されている。例えば, アルミニウム工場の労働者を対象とした研究では, 平均24年間Alに曝露された群で活性化Tリンパ球のレベルが増加した一方, 平均16.5年間曝露された群ではそのレベルが減少していたと報告されている<sup>12)</sup>。また, Zhuらは, 飲料水中の塩化アルミニウム( $\text{AlCl}_3$ ) (0.144 mM, 0.288 mM, 0.576 mM) に120日間曝露された雄Wistarラットにおいて, 活性化Tリンパ球数の有意な減少を確認している<sup>13)</sup>。さらに, 細胞実験においては,  $\text{AlCl}_3$ が培養ヒトTリンパ球およびニワトリTリンパ球におけるインターロイキン-2 (IL-2) および腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の産生を抑制することが報告されている<sup>14,15)</sup>。

このように,  $\text{AlCl}_3$ はT細胞に対して毒性を示すだけでなく, サイトカイン産生にも影響を及ぼすことが明らかとなっている。しかしながら, AlがT細胞におけるIL-2産生をどのような機構で抑制するのか, その詳細については未だ十分に明らかとされていない。そこで本研究では, ヒトT細胞株Jurkat細胞を用い, アルミニウムイオン( $\text{Al}^{3+}$ ) がコンカナバリンA (ConA) 誘導性のIL-2産生およびIL-2 mRNA発現に与える影響を明らかにすることを目的とした。合わせて, IL-2 mRNAの発現を制御する主要な核内の転写調節因子であるnuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), activator protein-1 (AP-1), nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1 (NFATc1)<sup>16)</sup>に対する $\text{Al}^{3+}$ の影響についても検討したので報告する。

## 実験方法

### 1. 試薬

塩化アルミニウム・6水和物 ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), マイトジェンConA, 3-ヒドロキシ-2-メチル-4-ピロン (マルツール (mal)) は, 富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪) から購入した。Human IL-2 ELISA KIT IIはBD Biosciences (米国カリフォルニア州サンノゼ) から, Jurkat E6.1細胞 (以下Jurkat細胞) はDSファーマバイオメディカル株式会社 (大阪) から購入した。株式会社同仁化学研究所 (熊本) からはCell Counting Kit-8 (CKK-8), サーマフィッシュサイエンティフィック株式会社 (東京) からウシ胎児血清 (FCS), シグマアルドリッチジャパン合同会社 (東京) からストレプトマイシン・ペニシリンを購入した。Active Motif, Inc. (米国カリフォルニア州カールスバッド) からは, NF- $\kappa$ B DNA結合活性測定のため使用したTransAM<sup>®</sup> NF- $\kappa$  Bp65 Activation Assay, NFATc1 DNA結合活性測定のため使用したTransAM<sup>®</sup>

NFATc1 Activation Assay, AP-1 DNA結合活性測定のため使用したTransAM<sup>®</sup> AP-1 c-Jun Activation Assayをそれぞれ購入し, Jurkat細胞の核タンパク質を抽出するため, Nuclear Extract Kitを購入し使用した。バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社 (東京) からはRC DCプロテインアッセイキット II, 株式会社タカラバイオ (滋賀) からはRNAiso Plus, cDNA合成試薬 (Prime Script<sup>™</sup> RT Master Mix), リアルタイムPCR用試薬 (TB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II), リアルタイムPCR用プライマーをそれぞれ購入した。

### 2. Al(mal)<sub>3</sub>の調製

Al(mal)<sub>3</sub>の合成は, Finneganらの報告および我々の先行研究に基づき実施した<sup>17,18)</sup>。 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15.5 g) とmal (9.9 g) を, 160 mLの蒸留水に加え, 穏やかに加熱しながら溶解させた後, NaOH溶液を用いてpHを8.3に調整した。反応液を室温まで冷却したのち, 析出した結晶をアセトンで3回洗浄し, デシケーター内で18時間乾燥させてAl(mal)<sub>3</sub>を得た。

### 3. 細胞毒性の評価

Jurkat細胞を, 終濃度25  $\mu\text{g/mL}$ のConAおよび各濃度のAl(mal)<sub>3</sub>または $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を含む培地で24時間培養した。その後, 各ウェルにCKK-8試薬を10% (v/v)の割合で添加し, 1時間インキュベーションを行った。インキュベーション後, 各ウェルの吸光度をコロナ電気株式会社 (茨城) のマイクロプレートリーダー (SH-1000) を使用し, 450 nmで測定後に細胞毒性を評価した。

### 4. IL-2 タンパク質の定量

Jurkat細胞を, 終濃度25  $\mu\text{g/mL}$ のConAおよび各濃度のAl(mal)<sub>3</sub>または $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を含む培地で24時間培養し, その後, 上清を回収してIL-2測定用のサンプルとした。IL-2の定量には, BD BiosciencesのHuman IL-2 ELISA KIT IIを用い, 付属のマニュアルに従って操作を行った。吸光度の測定は, 450 nmと570 nmの二波長で行った。

### 5. リアルタイムPCRによるIL-2 mRNAの測定

各濃度の $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ とConAを終濃度25  $\mu\text{g/mL}$ となるように培地に添加し, Jurkat細胞を3時間培養した。培養後, 細胞を回収し, 全RNAは株式会社タカラバイオのRNAiso Plusを用いて抽出した。得られたRNAからのcDNA合成には, 同社製のPrime Script<sup>™</sup> RT Master Mixを使用し, さらに同社製のTB Green<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> IIを用いてリアルタイムPCR反応液を調製した。PCR反応は, 株式会社タカラバイオのThermal Cycler Dice Real Time System TP800により実施し, IL-2 mRNAの発現量は内在性コントロールとしてグリセラルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA

の量で補正し、比較定量解析を行った。

## 6. 核内転写調節因子の DNA 結合活性の解析

各濃度の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  と ConA を終濃度  $25 \mu\text{g}/\text{mL}$  となるように培地に添加し、Jurkat 細胞を 3 時間培養した。培養後、細胞を回収し、Active Motif, Inc. の Nuclear Extract Kit を用いて核タンパク質を抽出した。核タンパク質濃度の測定には、Lowry 法を基礎とする Bio-Rad 社製 RCDC プロテインアッセイキットを使用した。核内の転写調節因子 (NF- $\kappa\text{B}$ , AP-1, NFATc1) の DNA 結合活性の測定は、TransAM<sup>®</sup> Kit をそれぞれ用い、製品付属のマニュアルに従って操作を行った。吸光度は 450 nm および 655 nm の二波長で測定し、得られた吸光度は核タンパク質量に基づいて補正し、それぞれの転写調節因子の DNA 結合活性を算出した。

## 7. 統計解析

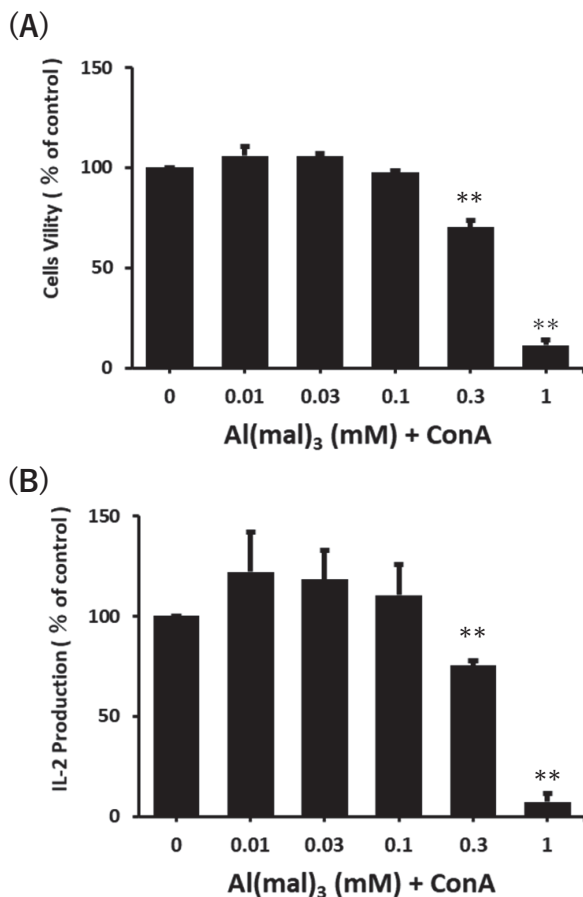
得られた結果は平均値  $\pm$  標準偏差で表し、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  非添加で ConA 添加のコントロール値を対象に Dunnett 検定 (エクセル統計 Ver.4.08, 社会情報サービス: BellCurve for Excel) を用いて解析を行った。有意水準は  $**p < 0.01$  とした。細胞増殖 50% 阻害濃度 ( $\text{GI}_{50}$ ), IL-2

50% 阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ ) は、GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA) を用いて解析した。

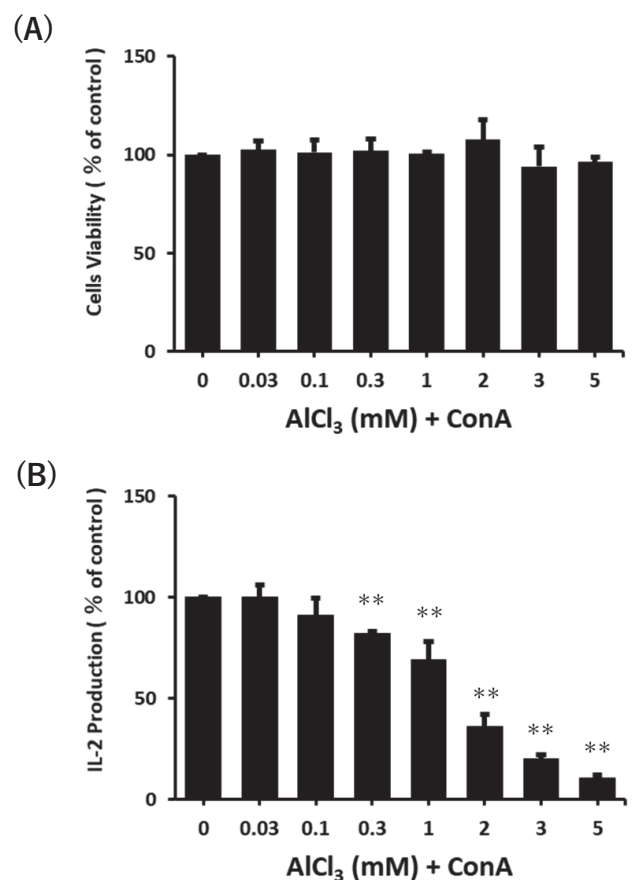
## 結果および考察

本研究では、最初に ConA の存在下で、Al と mal からなる錯体 ( $\text{Al}(\text{mal})_3$ ) が Jurkat 細胞に与える細胞毒性、および ConA によって誘導されるサイトカイン IL-2 の産生に及ぼす影響について検討を行った。(Fig.1 A, B)。その結果、 $\text{Al}(\text{mal})_3$  は ConA のみ添加のコントロールと比較して 0.3 mM の濃度で顕著な細胞毒性を示し、同時に Jurkat 細胞の ConA 誘導性の IL-2 産生も 0.3 mM で有意に低下することが確認された。 $\text{Al}(\text{mal})_3$  の  $\text{GI}_{50}$  と  $\text{IC}_{50}$  を求めたところ、前者が 0.58 mM、後者が 0.55 mM であり、両者の値はほぼ一致した。これらの結果から  $\text{Al}(\text{mal})_3$  による IL-2 産生の抑制は、細胞応答の抑制ではなく、その細胞毒性により細胞機能そのものを損ない、細胞の IL-2 産生や分泌に影響を与えるものと考えられた。

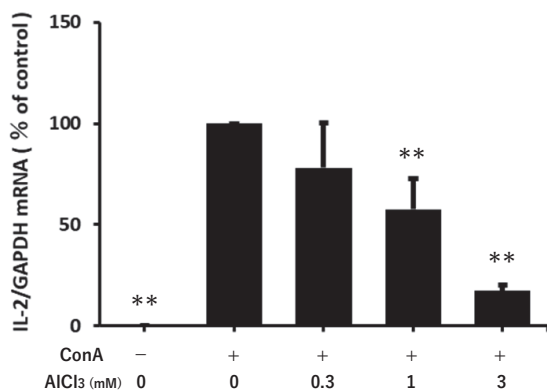
これに対して、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を使用して同様の検討を行ったところ、 $\text{Al}(\text{mal})_3$  とは異なる傾向が観察された。ConA 共存下において本実験で使用した  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  最大濃度 (5 mM) では有意な細胞毒性は認めず、さらに、Jurkat 細胞の ConA 誘導性の IL-2 産生は、0.3 mM で



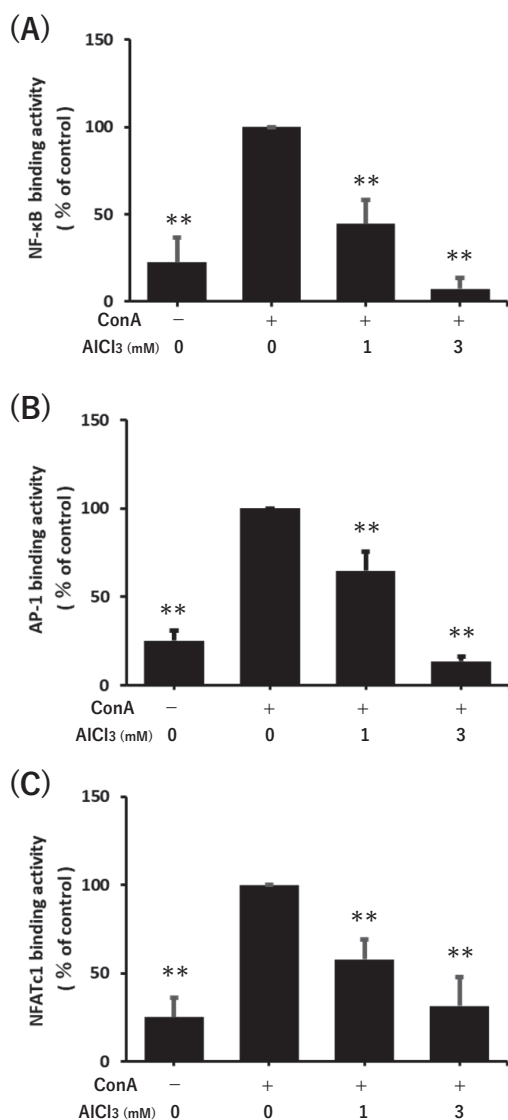
**Fig. 1** Effects of an aluminum complex of maltol,  $\text{Al}(\text{mal})_3$ , on cell viability (A) and concanavalin A-induced IL-2 production (B) in Jurkat cells. Values are mean  $\pm$  SD (n=5).  $**p < 0.01$  (Dunnett's test).



**Fig. 2** Effects of aluminium chloride hexahydrate on cell viability (A) and concanavalin A-induced IL-2 production (B) in Jurkat cells. Values are mean  $\pm$  SD (n=5).  $**p < 0.01$  (Dunnett's test).



**Fig. 3** Effects of aluminum chloride hexahydrate on concanavalin A-induced IL-2 mRNA expression in Jurkat cells. Values are mean  $\pm$  SD (n=5). \*\* $p$  < 0.01 (Dunnet's test).



**Fig. 4** Effects of aluminum chloride hexahydrate on the DNA-binding activity of the transcription factors NF-κB (A), AP-1 (B), and NFATc1 (C) in Jurkat cells. Values are mean  $\pm$  SD (n=5). \*\* $p$  < 0.01 (Dunnet's test).

ConA 添加のコントロール群と比較して有意な抑制が観察された (Fig.2 A, B)。従って、この結果はアルミニウムイオン ( $\text{Al}^{3+}$ ) が、細胞毒性を伴わない濃度で Jurkat 細

胞の IL-2 の産生機構に影響を与えるものと考えられる。これは  $\text{Al}^{3+}$  自体が細胞内シグナル伝達や核内の転写調節因子の活性に影響を及ぼしている可能性を示すものであり、 $\text{Al}^{3+}$  の Jurkat 細胞に対する作用機序は  $\text{Al}(\text{mal})_3$  とは異なるものと考えられた。 $\text{Al}^{3+}$  の IL-2 タンパク質レベルでの抑制が確認されたので、次にリアルタイム PCR を用いて、IL-2 mRNA の発現レベルにおける影響を検討した (Fig.3)。その結果、ConA を添加したコントロール群と比較して 1 mM の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  で処理した群では IL-2 mRNA 発現が有意に低下していた。これは  $\text{Al}^{3+}$  は転写レベルで IL2 の発現を抑制させる作用があることを示している。次に IL-2 mRNA 発現を制御する 3 つの転写調節因子 (NF-κB, AP-1, NFATc1) に対する  $\text{Al}^{3+}$  の影響を調べたところ (Fig.4 A, B, C), 1 mM の  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  でこれら 3 つの転写調節因子の DNA 結合活性が有意に抑制されることが示された。これらの結果から、 $\text{Al}^{3+}$  は 3 つの転写調節因子の転写活性の抑制を介して IL-2 mRNA 発現を低下させ、それに伴い Jurkat 細胞の ConA 誘導性の IL-2 タンパク質産生も抑制することが示された。

ラット副腎褐色細胞腫由来の PC12 細胞を使用した先行研究では、 $\text{Al}(\text{mal})_3$  は細胞増殖能の低下や乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出増加、DNA 断片化、活性酸素種 (ROS) 生成による酸化ストレスが確認されている<sup>19)</sup>。一方、 $\text{AlCl}_3$  では、同条件下での LDH 放出の増加や細胞増殖能の低下は観察されず<sup>19)</sup>、また別の研究では  $\text{Al}(\text{mal})_3$  はミトコンドリア機能障害によるエネルギー代謝低下を引き起こすのに対して、 $\text{AlCl}_3$  は AKT のリン酸化を抑制する傾向があるなど、それぞれの作用が異なることが報告されている<sup>20)</sup>。本研究においても Jurkat 細胞に対する細胞毒性と IL-2 産生に与える影響について異なる結果が得られた。一方、先行研究では  $\text{Al}^{3+}$  は、ラット脳においてプロテインキナーゼ C や  $\text{Ca}^{2+}$  / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼなどのプロテインキナーゼやホスファターゼの機能にも影響を与えることが報告されている<sup>21,22)</sup>。また  $\text{Al}^{3+}$  は電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの阻害をはじめ  $\text{Ca}^{2+}$  を補因子とする酵素を阻害することも報告されている<sup>23)</sup>。本研究で着目した転写調節因子 NFATc1 は、 $\text{Ca}^{2+}$  / カルモジュリン依存性のプロテインホスファターゼであるカルシニューリン (CN) によってリン酸化型 NFATc1 は脱リン酸化型に変換され、細胞質から核内に移行する。我々が行った先行研究においても  $\text{Al}^{3+}$  は、*in vitro* においてヒト CN を阻害することから<sup>18)</sup>、細胞内において  $\text{Al}^{3+}$  と  $\text{Ca}^{2+}$  の競合による CN 活性の低下により、NFATc1 のリン酸化状態が変化し、核移行が阻害された結果、NFATc1 の機能が抑制された可能性が示唆された。またラットの脾臓リンパ球を用いた先行研究では、 $\text{AlCl}_3$  で暴露した細胞は NF-κB mRNA 発現と核内 NF-κB 量が低下することを報告している<sup>24)</sup>。本研究でも  $\text{AlCl}_3$  により NF-κB 活性が低下していることが示されおり、先行研究の結果と一致した。

以上のことから、 $\text{Al}^{3+}$  は細胞毒性を示さない濃度で T



細胞のサイトカイン産生に影響を及ぼすことが明らかとなった。その抑制作用は、IL-2 mRNA の発現に關与する転写調節因子 (NF- $\kappa$ B, AP-1, NFATc1) の転写活性の低下によるものであるが、Al<sup>3+</sup> は細胞内への透過率が低いことが報告されており<sup>25)</sup>、Al<sup>3+</sup> の作用を検討する上で、細胞内の Al 量を原子吸光分析や ICP-MS 等で確認する必要があると思われる。また、今後、Al<sup>3+</sup> が具体的にどのような作用で転写調節因子に影響を与えるか詳細な解析を行っていく必要があると考えられる。

## 文 献

- 1) Niu Q (2018) Overview of the relationship between aluminum exposure and health of human being. *Adv Exp Med Biol* 1091: 1-31. doi: 10.1007/978-981-13-1370-7\_1.
- 2) Oleszycka E, Lavelle EC (2014) Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Curr Opin Immunol* 28: 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.007>.
- 3) Sulochana SP, Syed M, Chandrasekar DV, Mullangi R, Srinivas NR (2016) Clinical drug-drug pharmacokinetic interaction potential of sucralfate with other drugs: Review and Perspectives. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 41: 469-503. doi: 10.1007/s13318-016-0335-4.
- 4) Alfrey AC, LeGendre GR, Kaehny WD (1976) The dialysis encephalopathy syndrome : Possible aluminium intoxication. *New Engl J Med* 294: 184-188. doi:10.1056/NEJM197601222940402.
- 5) Kawahara M, Tanaka K, Kato-Negishi M (2021) Neurotoxicity of aluminum and its link to neurodegenerative diseases. *Metallomics Res* 1 : Rev-47-Rev-65. <https://doi.org/10.11299/metallomicsresearch.MR202104>.
- 6) Kawahara M, Kato-Negishi M (2011) Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. *Int J Alzheimer Dis* 276393. doi: 10.4061/2011/276393.
- 7) Shiraki H, Yase Y (1991) Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinsonism-dementia in the Kii peninsula: comparison with the same disorders in Guam and with Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology* 15: 273-300.
- 8) Shaw CA, Tomljenovic L (2013) Aluminum in the central nervous system (CNS) : toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. *Immunol Res* 56: 304-16. doi: 10.1007/s12026-013-8403-1.
- 9) Sulaiman R, Wang M, Ren X (2020) Exposure to aluminum, cadmium, and mercury and autism spectrum disorder in children: a systematic review and meta-analysis. *Chemical Research in Toxicology* 33: 2699-2718. doi: 10.1021/acs.chemrestox.0c00167.
- 10) Darbre PD (2016) Aluminium and the human breast. *Morphologie* 100: 65-74. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.02.001>.
- 11) Zhu Y, Li Y, Miao L, Wang Y, Liu Y, Yan X, Cui X, Li H (2014) Immunotoxicity of aluminum. *Chemosphere*. 104:1-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.052.
- 12) Zhu FZ, Xie PY, Ning MR (1998) Effects of aluminum on the immune function of workers in aluminum factory. *Rail Occu S Health Environ Pro* 25: 17-19.
- 13) Zhu YZ, Li XW, Chen CX, Wang F, Li J, Hu CW, Li YF, Miao LG (2012) Effects of aluminum trichloride on the trace elements and cytokines in the spleen of rats. *Food Chem Toxicol* 50:2911-2915. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.041>.
- 14) Wei XM, Lu JP, Fang QH, Mo LF (2001) Immunotoxicology of AlCl<sub>3</sub> on the human T-lymphocyte cultivated *in vitro*. *Chin J Prev Med* 35: 213-214.
- 15) Wang Z, Li YF (2008) Immunotoxic effects of aluminium on chicken splenic lymphocyte cultured *in vitro*. *Asian J Ecotoxicol* 3: 174-177.
- 16) Macian F (2005) NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* 5: 472-484. doi: 10.1038/nri1632.
- 17) Finnegan MM, Rettig SJ, Orvig C (1986) A neutral water-soluble aluminum complex of neurological interest. *J Am Chem Soc* 108: 5033-5035.
- 18) 秋山珠璃, 片山 豪, 田中 進 (2020) アルミニウムイオンのカルシニューリン活性に対する影響. *微量栄養素研究* 37: 28-32. [https://doi.org/10.51029/jtnrs.37.0\\_28](https://doi.org/10.51029/jtnrs.37.0_28).
- 19) Ohyashiki T, Satoh E, Okada M, Takadera T, Sahara M (2002) Nerve growth factor protects against aluminum-mediated cell death. *Toxicology* 176: 195-207. doi: 10.1016/s0300-483x(02)00139-7.
- 20) Yu Q, Zhu K, Ding Y, Han R, Cheng D (2022) Comparative study of aluminum (Al) speciation on apoptosis-promoting process in PC12 cells : Correlations between morphological characteristics and mitochondrial kinetic disorder. *J Inorg Biochem* 232: 111835. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111835.
- 21) Johnson GVW, Cogdill KW, Jope RS (1990) Oral

- aluminum alters *in vitro* protein phosphorylation and kinase activities in rat brain. *Neurobiol Aging*. 11: 209–216. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90547-D](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90547-D).
- 22) Kaur A, Joshi K, Minz RW, Gill KD (2006) Neurofilament phosphorylation and disruption: a possible mechanism of chronic aluminium toxicity in Wistar rats. *Toxicology* 219: 1–10 <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.09.015>.
- 23) Kawahara M, Kato-Negishi M, Tanaka K (2023) Dietary Trace Elements and the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*. 15: 2067. <https://doi.org/10.3390/nu15092067>.
- 24) Xu F, Wang J, Cao Z, Song M, Fu Y, Zhu Y, Li Y (2015) cAMP/PKA Signaling pathway induces apoptosis by inhibited NF- $\kappa$ B in aluminum chloride-treated lymphocytes *in vitro*. *Biol Trace Elem Res* 170: 424–431. doi: 10.1007/s12011-015-0461-x.
- 25) Kawahara M, Kato M, Kuroda Y (2001) Effects of aluminum on the neurotoxicity of primary cultured neurons and on the aggregation of  $\beta$ -amyloid protein. *Brain Res Bull* 55:211–217. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00475-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00475-0).