

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590145

研究課題名（和文） 亜鉛による虚血性神経細胞死におけるカルシウムと小胞体ストレスの関与

研究課題名（英文） Molecular mechanism of zinc-induced neurotoxicity: involvement of Ca and ER stress

研究代表者

川原 正博 (KAWAHARA MASAHIRO)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：40224828

研究成果の概要（和文）：

近年、虚血時に過剰放出される亜鉛(Zn)と脳血管性認知症との関連が注目されている。そこで、本研究では、亜鉛による神経細胞死メカニズムについて研究を行った結果、小胞体(ER)ストレス関連遺伝子の発現が増加していることが明らかになった。これらの結果は、亜鉛による神経細胞死メカニズムには細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスおよび小胞体ストレスが関与していることを示唆する新しい知見であり、脳血管性認知症予防薬探索に有用である。

研究成果の概要（英文）：

Zinc (Zn) is neurotoxic and causes neurodegeneration following transient global ischemia and plays a crucial role in the pathogenesis of vascular-type dementia. We investigated the molecular mechanisms of Zn-induced neurotoxicity in vitro. The analysis of upregulated genes during Zn-induced neuronal death revealed that the significance of ER stress. These new results indicate that the disruption of Ca^{2+} homeostasis and ER stress in the molecular mechanism of Zn-induced neurotoxicity, and are useful for the search for protective substances for vasucular dementia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境系薬学

キーワード：中毒学、無機金属毒性

1. 研究開始当初の背景

日本は現在総人口の1割が75歳以上という世界でもまれに見る超高齢化社会に突入している。その結果、老年性認知症患者数は年々増加しており、2025年には300万人を越すことが予想されている。その発症を2年間送らせることが出来れば、治療・介護費用併せて日本全体で5600億円が削減出来ると試

算されており、その予防・治療法開発は急務である。

脳血管性認知症は、老年性認知症の約3分の1を占め、脳虚血後に海馬・大脳皮質などで生じる遅延性神経細胞死が原因と考えられている。虚血時には、神経終末からグルタミン酸が過剰に放出され、NMDA型グルタミン酸受容体を活性化し、アポトーシスの引き

金を引くと考えられてきたが、最近の研究から、虚血後の神経細胞死の過程に亜鉛が重要な働きを示すことが判明してきた。必須元素である亜鉛(Zn)は、体内に豊富に含まれており、脳内では海馬・大脳皮質などの記憶、学習に重要な領域に高濃度で局在している。脳内の亜鉛の多くはシナプス小胞内に局在して、神経細胞の興奮時にグルタミン酸と共に放出される。亜鉛は神経系の発達や情報伝達に重要な役割を果たしている一方で、亜鉛が虚血時に 300 μ M もの高濃度で放出され、グルタミン酸による神経細胞死を *in vitro*、*in vivo* の両方で増強させることが報告されている。

従って、亜鉛による神経細胞死のメカニズムを明らかにし、これを抑制することによって、脳虚血後の遅延性神経細胞死を抑制し、最終的には脳血管性認知症を予防・治療することが可能となることが考えられる。

申請者らは、亜鉛による神経細胞死メカニズム研究の過程で、GT1-7 細胞（不死化視床下部神経細胞）が、亜鉛によって細胞死を引き起こすことを世界で初めて報告した(Kawahara et al., Cell. Mol. Neurobiol. (2002))。しかも、GT1-7 細胞は亜鉛に対する感受性が非常に高く、他の細胞系（海馬初代培養神経細胞、初代培養大脳皮質神経細胞、PC-12 細胞、B-50 細胞など）と比べて低い濃度の亜鉛で細胞死を起こした(Konoha et al. J. KUH (2004))。GT1-7 細胞は、マウス視床下部神経細胞を株化したものであり(Mellon et al., Neuron, 1991)、神経特異的蛋白（ニューロフィラメント、MAP2 等）やイオンチャネル、伝達物質受容体（GABA、ACh 等）を発現するなど神経細胞固有の性質を保持しているにも関わらず、グルタミン酸受容体は発現しておらず、グルタミン酸は GT1-7 細胞の細胞死を起こさない。そこで、申請者は、GT1-7 細胞が亜鉛による細胞死メカニズムを研究する良いモデル系になると考え、これを用いて亜鉛による神経細胞死の性質を検討してきた。

2. 研究の目的

本研究では、Zn に対する感受性が高い GT1-7 細胞をモデル系として用いて、亜鉛による神経細胞死メカニズムを解明することを目的とする。特に、これまでの予備的な研究から判明している細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスと小胞体ストレスの関与に注目し、遺伝子発現、薬理学実験、細胞内 Ca^{2+} イメージングなどの方法を総合的に駆使して研究を行う。

我々は、GT1-7 細胞を用いる亜鉛神経毒性抑制物質のスクリーニング系を開発し、農産物抽出液、魚介類抽出液などのスクリーニングを行ってきた。その結果、マンゴー果実、

ウナギ、ウルメイワシなどに顕著な抑制活性が存在することを見だし、活性成分の単離精製ならびに構造解析を行ってきた。この過程で、クエン酸、カルノシン (carnosine ; β アラニル-ヒスチジン)、ヒスチジンが亜鉛による神経細胞死を顕著に抑制することが明らかになっている (Kawahara et al., Recent Patents on CNS Drug Discovery. (2007))。そこで、これらの毒性阻害物質をツールとして用いて、発症メカニズムの解明を行った。

また、我々は亜鉛がアルツハイマー病・ β アミロイド蛋白質の神経毒性に影響することを報告している(Kawahara et al., Biophys J., (1994))。微量元素が神経疾患の発症に関与しているという報告は数多く、銅のホメオスタシス異常がプリオン病の発症に影響している可能性が示唆されているが、亜鉛など他の金属の影響については未だ明らかではない。そこで、本研究では、亜鉛と他の神経疾患との関連に注目し、プリオン病発症に重要な役割を持つプリオン蛋白の毒性および高次構造変化に及ぼす亜鉛とカルノシンの作用について研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 薬理学的実験

ER からの Ca^{2+} 放出を抑制する thapsigargin、様々なタイプの Ca^{2+} チャネルブロッカーなどを投与して、 Ca^{2+} ホメオスタシスとの関連について検討した。さらに様々な物質を前投与することによって、亜鉛による神経細胞死抑制物質を探索した。

(3) 細胞内 Ca^{2+} イメージング

既に、fura-2 を用いる細胞内 Ca^{2+} イメージングシステムは確立しており、これを用いて、亜鉛が投与 5~10 分後に顕著な細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を GT1-7 細胞において引き起こすことを予備的に見いだしている。そこで、亜鉛による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇について、毒性抑制物質などを投与し、亜鉛による細胞内 Ca^{2+} 濃度増加のメカニズムについて検討した。

(4) 亜鉛による細胞死の過程での遺伝子発現の変化

亜鉛投与前後の遺伝子発現について、DNA マイクロアレイおよび RT-PCR 法を用いて検討した。さらに、(2)で判明した毒性阻害物質が遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。

(5) プリオン蛋白断片ペプチドの高次構造と神経毒性

プリオン蛋白断片ペプチド PrP106-126 を合成し、そのコンフォメーション変化を CD スペクトルにより解析した。さらに、ラット海馬初代培養神経細胞に対する神経毒性を LDH 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 亜鉛による神経細胞死抑制物質の探索

亜鉛は、濃度依存的に GT1-7 細胞のアポトーシスを引き起こし、これは、nimodipine、 ω conotoxin などの Ca^{2+} チャネルブロッカーによって抑制された。一方、ER への Ca^{2+} 流入を抑制する thapsigargin などの細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる薬物は亜鉛による細胞死を増強した (図 1)。

さらに、細胞内 Ca^{2+} イメージングを行った結果、亜鉛は投与 5~30 分間にかけて細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こした。この細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は、亜鉛神経毒性を抑制する Al^{3+} によって阻害された。従って、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスが亜鉛による神経細胞死に関与していることが示唆された (図 2) (Koyama et al., J. Clin Toxic (2012))。

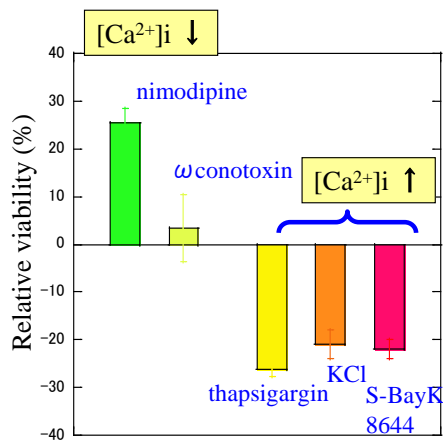


図 1 亜鉛による GT1-7 細胞の細胞死に及ぼす Ca 関連薬物の影響

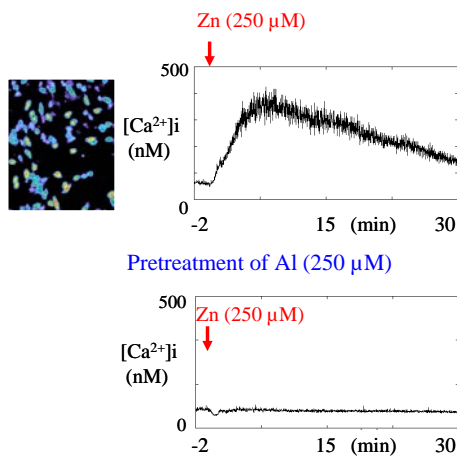


図 2 亜鉛による細胞内 Ca^{2+} 流入に及ぼす Al^{3+} 前処理の影響

(2) 亜鉛による遺伝子発現

亜鉛による神経細胞死の過程で変動する

遺伝子について DNA マイクロアレイ解析を行った結果、亜鉛結合能を持つメタロチオネイン、亜鉛トランスポーター ZnT-1、アミロイド前駆体蛋白 (APP)、記憶・学習に重要な働きを持ち、 Ca^{2+} 流入によって発現が促進される Arc など数十種の遺伝子発現が増加あるいは減少していることを見出した。さらに、海馬初代培養神経細胞と GT1-7 細胞において比較を行った結果、GT1-7 細胞では小胞体ストレス関連遺伝子群 (GADD34、p8 等) の発現が顕著に増加していることが判明した。GT1-7 細胞は、海馬初代培養神経細胞や他の神経系由来の細胞系と比較しても、亜鉛に対する感受性が高く、低濃度の亜鉛によって神経細胞死を起こすことを考えると、小胞体ストレスが亜鉛による神経細胞死に対する GT1-7 細胞の特異性に関与している可能性が考えられる。

そこで、Real-time PCR 法を用いて、これらの遺伝子の亜鉛による発現パターン、カルノシン等の影響を観察した。その結果、カルノシン、 Al^{3+} 、クエン酸などの亜鉛毒性阻害物質は、メタロチオネイン、亜鉛トランスポーターなどの金属関連遺伝子の発現にはほとんど影響しないが、GADD34、p8、Arc の発現を顕著に抑制することが明らかになった。小胞体ストレスは、虚血性神経細胞死のみならずアルツハイマー病を初め多くの神経疾患で変化することが報告されており、本研究により、これらの抑制物質が他の神経疾患の予防につながる可能性も示唆された。

これらの結果を基に、亜鉛による神経細胞死のメカニズムとして、図 3 のようなスキームを提唱している。

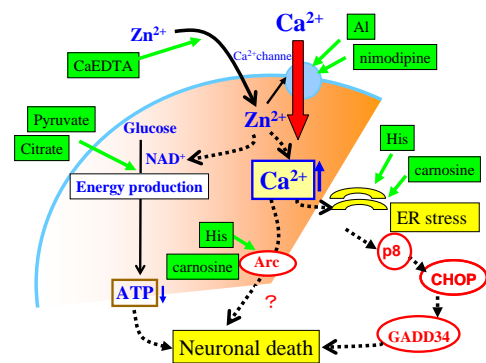


図 3 亜鉛による神経細胞死メカニズム仮説

今後、さらにこのメカニズムの詳細について研究する予定である。

(3) プリオン病に対する亜鉛の効果

プリオン蛋白断片ペプチド PrP106-126 は、溶液状態で数日間振倒することによってコンフォメーションを変化させ β シート構造を取ると共に、海馬初代培養神経細胞の細胞死を引き起こす。

亜鉛および銅によって、PrP106-126 のコンフォメーション変化は顕著に抑制されることが、CD スペクトル解析および thioflavinT 蛍光法により明らかとなった。さらに、神経毒性も減弱した(Kawahara et al., Metallomics (2011))。

(4) カルノシンの生理機能

カルノシンは、筋肉や脳内では嗅球に多く含まれている。抗酸化活性、pH バランス作用など様々な作用を持つが、その生理的役割は不明である (図 4)。

我々は、カルノシンが亜鉛による神経細胞死を抑制することから、脳血管性認知症の治療薬となりうるのではないかと考え、特許を出願している。さらに、カルノシンは蛋白質のクロスリンクによるコンフォメーション変化を阻害する作用を持っており、アルツハイマー病モデルマウスにおけるアミロイドの蓄積を抑制することが報告されている (Corona C et al. PLoS One (2011))。また、我々はカルノシンが PrP106-126 のコンフォメーション変化と細胞毒性との両方を抑制することを見いだしている (Kawahara et al., Metallomics (2011))。

従って、カルノシンは脳血管性認知症に留まらず、様々な神経疾患に対しても有効である可能性が示唆される。

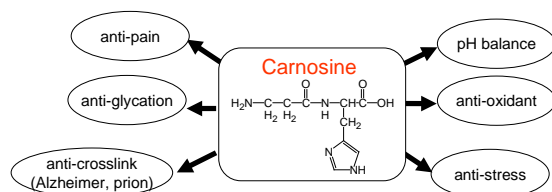


図 4 カルノシンの様々な生理作用

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

① Koyama H, Konoha K, Sadakane Y, Ohkawara S, and Kawahara M: Zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular-type dementia: Involvement of calcium dyshomeostasis and carnosine, J.Clin Toxicol. (2012, in press). (査読有)

② 川原正博: 亜鉛と認知症: 脳の中のヤヌス、ファルマシア 48, 216-220 (2012). (査読無)

③ 川原正博、小山裕也、大河原 晋: 神経疾患と微量金属、金属 82, 19-27 (2012). (査読無)

④ Kawahara M., Ohtsuka I., Yokoyama S., Kato-Negishi M. and Sadakane Y.: Membrane incorporation, channel formation, and disruption of calcium homeostasis by Alzheimer's β -amyloid protein, Int. J. Alzheimer Dis., 304583 (2011). (査読有)

⑤ Kawahara M, Koyama H., Nagata T., Sadakane Y.: Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126, Metallomics, 3, 726-734 (2011). (査読有)

⑥ 川原正博、小山裕也、定金 豊: アミロイド形成蛋白の高次構造変化と神経毒性に及ぼす金属の影響、Biomed. Res. Trace Elements 22, 7-14 (2011). (査読有)

⑦ Kawahara M. and Kato-Negishi M.: Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses, Int. J. Alzheimer Dis., 276393 (2011). (査読有)

⑧ Kawahara M: Role of calcium dyshomeostasis via amyloid channels in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Current Pharmaceutical Design, 16: 2779-2789 (2010). (査読有)

⑨ Sadakane Y, Fukuhara T, Kawahara M, Nakagomi K: Effects of UV-B irradiation on the stability of amino acids and peptides. J. KUHW 11: 147-152. (2010) (査読有)

⑩ Sadakane Y, Konoha K., Kawahara M., Nakagomi K.: Quantification of structural alterations of L-Asp and L-Asn residues in peptides related to neuronal disease by reversed-phase HPLC. Chem. & Biodivers. 7:1371-1379 (2010). (査読有)

⑪ Sadakane Y, Otsuka I, Konoha K, Koyama H, Kawahara M, Hatanaka Y: Ligand structure for photoaffinity labeling of carbohydrate-binding protein. Photomedicine and Photobiology 31: 9-10 (2010) (査読有)

⑫ Sadakane Y., Konoha K., Kawahara M.: Analysis of structural alternation of L-Asp and L-Asn residues in the peptides related to neuronal conformation disease. KURRI-KR 148: 1-5 (2009). (査読有)

⑬ Kawahara M, Negishi-Kato M, Sadakane Y. Calcium dyshomeostasis and neurotoxicity of Alzheimer's beta-amyloid protein. Expert Rev Neurother. 9: 681-93 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

① 定金 豊, 小山 裕也, 川原 正博: アルツハイマー β ペプチドの N 末側アミノ酸の構造的変化と線維化への影響, 日本薬学会第 132 年会(2012.03.28-30、札幌)

② 小山 裕也, 坂口 哲隆, 大河原 晋, 定金 豊, 川原 正博, PrP106-126 の高次構造変化に重要な配列, 日本薬学会第 132 年会, (2012, 03.28-30、札幌)

③ 小山裕也, 永田哲也, 定金豊, 川原正博: PrP 断片ペプチドに対する亜鉛および銅の影響, 日本薬学会第 131 年会 (2011.3.27-29, 静岡)

④ 定金 豊, 小山裕也, 川原正博: コンフォメーション病に関与するペプチド中のアス

パラギンおよびアスパラギン酸残基の構造変化と生理活性, 日本薬学会第 131 年会 (2011.3.27-29, 静岡)

⑤川原正博: 創薬シーズとしてのカルノシン、「第 4 回薬学研究フォーラム in 東京 -九州からの情報発信による企業との共同研究マッチング-」日本薬学会九州支部・九州薬科学研究教育連合主催 (2011.01.23, 東京)

⑥Kawahara M.: Effects of trace elements on the conformational changes of amyloidogenic proteins and their neurotoxicity, 5th International Conference on Metals and Genetics (2011.09.5-8, Kobe, Japan).

⑦Koyama H, Okahara M, Sakaguchi T, Sadakane Y and Kawahara M: Zinc, copper, and carnosine attenuate neurotoxicity of prion fragment PrP106-126, 5th International Conference on Metals and Genetics (2011.09.5-8, Kobe, Japan).

⑧川原正博、小山裕也: アルミニウムの神経毒性と神経疾患との関連、第 22 回日本微量元素学会シンポジウム (2011.07.02, 京都)

⑨小山裕也、永田哲也、定金豊、大塚功、戸泉文江、横山祥子、川原正博: プリオン蛋白による培養細胞に対する亜鉛および銅の影響, 日本薬学会第 130 年会, (2010.3.28-30, 岡山).

⑩鳥や尾 篤、宮越 辰則、反田和宏、渡邊 暁子、坂本 正徳、木葉 敬子、定金豊、川原正博、山崎 哲郎: carnosine 誘導体合成と GT1-7 系における神経細胞保護効果 日本薬学会第 130 回年会 (2010.3.28-30, 岡山).

⑪定金豊、小山裕也、大塚 功、川原正博: プリオンペプチド断片 (106-126) 中のアスパラギン残基の自発的構造変化と生理機能, 第 27 回日本薬学会九州支部大会(2010.12.11-12, 長崎).

⑫小山裕也、永田哲也、定金豊、川原正博: PrP 断片ペプチドの神経毒性に対する亜鉛および銅の影響, 第 27 回日本薬学会九州支部大会, (2010.12.11-12, 長崎).

⑬Kawahara M., Koyama H., Sadakane Y.; Alterations of gene expressions during neuronal death after zinc exposure: implications of calcium dyshomeostasis, Society for Neuroscience (2010.11.16-21, San Diego).

⑭Kawahara M.: Molecular Mechanism of zinc-induced neurotoxicity, ISTERH (International Society for Trace Element Research in Humans), (2011.10.15-21, Antalya, Turkey).

⑮川原正博、小山裕也、定金豊: プリオン蛋白断片ペプチドのコンフォメーション変化と神経毒性に及ぼす微量金属の影響、第 2 回メタロミクス研究フォーラム (2010.11.2-3, 京都)

⑯川原正博: 認知症から脳を保護するカルノ

シン、都市エリア産学官連携事業 第 9 回浜辺のセミナー (2010.10.25, 宮崎)

⑰定金豊、小山裕也、大塚 功、木葉敬子、川原正博: プリオンペプチド断片 (106-126) 中の Asn 残基の構造的変化と生理活性について 第 6 回 D-アミノ酸研究会学術講演会 (2010.9.17, 富山)

⑱川原正博: カルノシンって何? - 宮崎の食で認知症を防ぐ - 都市エリア産学官連携事業 第 8 回浜辺のセミナー (2010.08.30, 延岡)

⑲定金豊、大塚 功、川原正博、畑中保丸: 糖鎖機能の効率的化未明を目指した光反応性糖鎖リガンドの製作 第 32 回 日本光医学・光生物学会 (2010.07.30 東京)

⑳小山裕也、定金豊、大塚功、川原正博: Effects of zinc and copper on conformational changes and neurotoxicity of prion fragment peptide (PrP106-126), 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (SRM2010) (2010.06.25-26, 徳島)

21). 定金豊、木葉敬子、川原正博、畑中保丸: 糖鎖結合タンパク質に適した光化学的スクリーニング法の開発 第 26 回 日本薬学会九州支部大会 (2009.12.12, 福岡)

22). Kawahara M, T. Nagata, K. Konoha, Y. Sadakane: Carnosine inhibits β -sheet formation of PrP106-126 and protects against its neurotoxicity, International Conference on Alzheimer's disease and related disorders (2009.07.11-16, Wien)

23). Sadakane Y, Konoha K, Kawahara M, Nakagomi K: Analysis of Alternation of A-Asp and L-Asn residues in peptides related to conformational disease., International D-amino acid Research (IDAR2009), (2009.07.05, Awazi Inland, Japan)

[図書] (計 5 件)

① Kawahara M., Koyama H., Ohkawara S., Kato-Negishi M.: Disruption of calcium homeostasis in Alzheimer's disease: role of channel formation by β Amyloid Protein, In "Neurodegenerative Diseases / Book 2", ISBN 979-953-307-672-9 (Ed by Ivana Zach) pp115-132 (2011).

② Kawahara M, Konoha K, Tetsuya N and Sadakane Y: Protective substances against zinc-induced neuronal death after ischemia: carnosine as a target for drug of vascular type of dementia. In Frontiers in CNS Drug Discovery, 2010, 1, 21-30 (Atta-ur-Rahman / M. Iqbal Choudhary (Eds.)) Bentham Science Publishers (2010).

③ Sadakane Y, Konoha K., Kawahara M., Nakagomi K.: Quantification of structural alterations of L-Asp and L-Asn residues in peptides related to neuronal disease by reversed-phase HPLC. In D-Amino Acids in

chemistry, Life Sciences and Biotechnology; (ed. Hans Bruckner and Noriko Fujii) Helvetica Chimica Acta, Dec. (2010).

④ Kawahara M: Aluminum and human health: possible link with neurodegenerative disorders. In Metals and Neurodegeneration (Editor: Shile Huang) pp 15-56 Research Signpost (2010)

⑤ 川原正博、定金豊: 認知症予防候補物質の探索と単離・構造決定、「薬学分析科学の最前線」、日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編、じほう(2009)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

特許公開

名称：「脳血管性認知症の治療剤および該治療剤を含有する飲食物、補助食品」

発明者：川原正博、定金豊、木葉敬子

権利者：九州保健福祉大学

種類：特許権

番号：特開 2009-249335

出願年月日：平成 21 年 10 月 29 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 正博 (KAWAHARA MASAHIRO)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：40224828

(2) 研究分担者

定金 豊 (SADAKANE YUTAKA)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：40224828

(H21—H22：研究分担者)

小山 裕也 (KOYAMA HIRONARI)

九州保健福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：70567718