

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 05 月 18 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790138

研究課題名（和文）神経細胞におけるマンガン輸送機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of manganese transport system in neuronal cells

研究代表者

藤代 瞳 (FUJISHIRO HITOMI)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：10389182

研究成果の概要（和文）：マンガン曝露によってパーキンソン病に類似した症状を呈することが報告されている。一方、通常のパーキンソン病患者においても、鉄やマンガンが脳内へ異常蓄積することがあるとの報告がある。これまで、脳神経細胞におけるマンガン輸送については鉄輸送体の divalent metal transporter 1 (DMT1) およびトランスフェリン受容体の関与しか検討されていない。われわれはこれまでに、亜鉛輸送体ファミリー Zrt-, Irt- related protein (ZIP)のうち、ZIP8 および ZIP14 が Mn^{2+} 輸送に関与していることを見出している。そこで本研究では、神経細胞における ZIP8 および ZIP14 の発現と Mn^{2+} 輸送への関与を検討した。細胞は、SH-SY5Y 細胞（ヒト神経芽細胞腫）および HT22（マウス海馬細胞）を用いた。SH-SY5Y 細胞および HT22 細胞における金属輸送体の発現を RT-PCR 法で調べた結果、ZIP8, ZIP14 および DMT1 の発現が確認できた。これまでに、SH-SY5Y 細胞における Mn^{2+} 取り込みに DMT1 が関与していることが報告されている。そこで SH-SY5Y 細胞に、DMT1 siRNA を導入して DMT1 の発現を抑制すると、 Mn^{2+} 取り込み効率はコントロールに比べて顕著に低下した。しかし、 Cd^{2+} および Zn^{2+} 取り込み効率は変化しなかった。次に、ZIP8 siRNA を導入して ZIP8 の発現を抑制した。しかし、 Mn^{2+} , Cd^{2+} , および Zn^{2+} の取り込み効率はコントロールと比較して変化しなかった。一方、ZIP14 siRNA を導入して ZIP14 の発現を抑制すると、 Mn^{2+} および Cd^{2+} 取り込み効率はコントロールの半分以下にまで低下した。しかし、 Zn^{2+} 取り込み効率は変化しなかった。また HT22 細胞を用いた実験においても、SH-SY5Y 細胞と同様に ZIP8 を発現抑制しても Mn^{2+} , Cd^{2+} , および Zn^{2+} 取り込み効率は変化せず、ZIP14 を発現抑制すると Mn^{2+} および Cd^{2+} 取り込み効率は低下した。以上の結果から SH-SY5Y, および HT22 細胞のいずれにおいても ZIP14 の発現を抑制すると、 Mn^{2+} 取り込み効率は低下することが明らかになった。よって神経細胞では、DMT1 のみならず、ZIP14 がマンガン輸送に重要な役割を果たしている新たな可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Manganese (Mn) is an essential element, but exposure to excess amount of Mn causes symptoms similar to Parkinson's disease. Although several transporters may be involved in Mn uptake, only the role of DMT1 and transferrin receptor have been examined regarding Mn transport in nervous systems. To confirm the contribution of DMT1, we first examined the effects of DMT1 siRNA. As a result, the uptake of Mn in human neuroblastoma SH-SY5Y cells was suppressed by introduction of siRNA of DMT1. Next, we focused on zinc transporters, ZIP8 and ZIP14, which can transport Mn as well as Zn and Cd. The uptakes of Mn^{2+} and Cd^{2+} were suppressed by the introduction of siRNA of ZIP14, but not by ZIP8, in both SH-SY5Y and mouse hippocampus HT22 cells. These data suggest that ZIP14 in addition to DMT1 might play an important role in Mn transport in neuronal cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：中毒学・マンガン

1. 研究開始当初の背景

マンガン中毒は、パーキンソン病症状と類似しており、様々な精神症状も報告されている。現在でも鉱石産出国や発展途上国においてはマンガン曝露による職業病として注目されている。また、近年、溶接作業者にマンガン中毒が多発しているという報告があり、マンガン中毒が職業病として新たに注目されてきている。このようにマンガンの過剰摂取によってパーキンソン病様症状などの神経障害を招くことが知られているが、脳神経系細胞におけるマンガン輸送機構についてはほとんど明らかになっていない。

これまでに哺乳動物細胞におけるマンガンの取込みに関しては、下記の3つの輸送経路が推測されている。トランスフェリン (Tf) 受容体は、本来 Fe³⁺-Tf 複合体をエンドサイトーシスにより細胞に取り込む経路であるが、3価のマンガン (Mn³⁺) は脳において Tf と結合するという報告がある。しかし、その詳細は明らかになっていない。2価鉄 (Fe²⁺) 輸送体である divalent metal transporter1

(DMT1) は、Fe²⁺ 以外の2価金属も輸送することが知られており、Mn²⁺の輸送にも関与している可能性がある。実際、パーキンソン病モデルマウスの中脳における DMT1 の発現上昇が報告されている。一方、近年、亜鉛輸送体ファミリーである Zrt-, Irt-related protein (ZIP) のうち、ZIP8, ZIP14 は Mn²⁺にも親和性を示すことが報告されているが、脳神経系においてこれらの亜鉛輸送体が Mn²⁺輸送に関与しているのかどうかは不明である。また、Ca チャネルの一部は Mn²⁺の取込みに関与することが知られているが、その機構もほとんどわかっていない。一方、赤血球を用いて Mn²⁺の取込み機構を検討

した研究により、細胞膜には Mn²⁺に対する親和性の異なる複数の輸送系が存在することが示唆されている。

このように、マンガン輸送に関する基礎的研究データは非常に少ない。マンガンは鉄や亜鉛、カルシウムの輸送経路を介して細胞に取り込まれることが予測されているが、脳神経細胞においてこれらの輸送体が実際にマンガン輸送に関わっているのかどうか、また、脳神経系におけるこれら輸送体の発現とマンガン毒性との関係もほとんど分かっていないのが現状である。

2. 研究の目的

古くからマンガン曝露によるパーキンソン病様症状などの神経疾患が報告されていたが、マンガンの細胞内取り込みや排泄の詳しいメカニズムはほとんど明らかになっていない。本研究者は、これまでにカドミウムの輸送機構の解析を行ってきたが、その研究の過程で、Cd²⁺と Mn²⁺の輸送系の一部は共通することを明らかにした。しかし、神経細胞における Mn²⁺輸送に Cd²⁺と共通の輸送系が関与しているかどうかは全く検討されていない。そこで、本研究では、1) 様々な脳神経系細胞におけるマンガン感受性とマンガン輸送能、輸送機構を比較検討する、2) 神経細胞における Mn²⁺の取り込みに ZIP8 および ZIP14 が関与するかどうか検討し、その寄与度を明らかにすることを目的とする。そのことにより、マンガンが原因とされている疾患の発症メカニズムや治療法の確立に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

本研究は、多種類の神経細胞、グリア細胞におけるマンガン感受性と Mn²⁺取り込み効率を比較検討した。神経細胞として N18TG2 細胞 (マウス神経芽細胞腫)、PC12 細胞 (ラ

ット褐色細胞種)、C6 glioma 細胞 (ラットグリオーマ)、HT22 細胞 (マウス海馬由来)、SH-SH5Y 細胞 (ヒト神経芽細胞腫) を使用した。細胞生存率は alamarBlue 法により調べた。細胞内への金属取り込み効率及び蓄積量は、細胞を 3.0×10^5 cells/well で播種し、24 hr 培養した。実験開始 30 min 前に培地を serum-free 培地に交換した。[^{54}Mn]- MnCl_2 をそれぞれ添加した。1hr 後、serum 入りの培地で 3 回、PBS で 1 回 wash し、細胞を回収し、 γ カウンターで ^{54}Mn の放射活性を測定した。重炭酸の Mn^{2+} 取り込みへの影響は、培地の変わりに HEPES buffer を使用し、重炭酸を含まない buffer と 60 mM 含む buffer を使用した。

各輸送体の mRNA 発現量は細胞から SV Total RNA Isolation System により total RNA を抽出した。それぞれの輸送体の発現量は特異的 primer により、半定量的 RT-PCR 法にて測定した。

これまでに神経以外の細胞において報告されているマンガン輸送体が神経細胞でどのように相互に役割分担しながらマンガン輸送に関わるかについては、siRNA を用いて各輸送体を発現抑制し、 Mn^{2+} 取り込み効率の変化を解析した。金属の蓄積、取り込みについては、アイソトープを用いてトレーサーとして使用して測定し、各輸送体の発現量は、定量的 RT-PCR によって測定した。輸送体の発現抑制については siRNA を電ポレーション法で細胞に導入した。

4. 研究成果

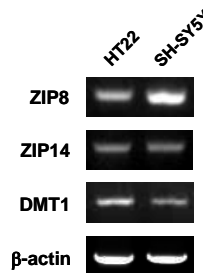
(1) 初年度はマンガン毒性とマンガン感受性の関係を明らかにするために、入手できた様々な神経系細胞におけるマンガン感受性とマンガン輸送能、輸送機構を比較検討した。 MnCl_2 に曝露して 24 時間後の細胞生存率を比較した結果、マウス神経芽細胞 (N18TG2) が最も感受性が低く、ラットグリオーマ細胞 (C6 glioma) が最も高かった。一方、 MnCl_2 を添加後 24 時間のマンガン蓄積量を比較した結果、ラット褐色細胞腫 (PC12) が最も高く、C6 glioma が最も低かった。各神経細胞のマンガン感受性とマンガンの蓄積量にはあまり相関が見られなかったため、神経細胞におけるマンガン毒性にはその他の重要な因子が存在することが示唆された。

これまでの研究により培地に重炭酸を添加すると Mn^{2+} の取り込みが上昇することを見出している。そこで様々な神経細胞の Mn^{2+} 取り込みに対する重炭酸の効果を検討した。その結果、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) に重炭酸を添加した際の Mn^{2+} 取り込み効率の上昇率が最も高かった。亜鉛輸送体の ZIP8 および ZIP14 を介した Mn^{2+} の取り込み効率を重炭酸が促進させることが報告されてい

るため、本細胞においても ZIP8 および ZIP14 が機能している可能性が示唆された。また、程度に違いはあるものの、全ての検討した神経細胞において重炭酸による Mn^{2+} 取り込み効率の亢進が見られたことから、神経細胞におけるマンガン輸送に亜鉛輸送体が関与している可能性が考えられた。

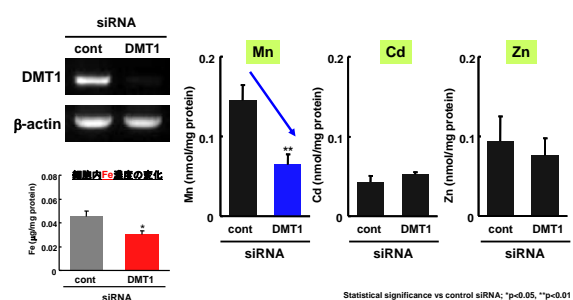
(2) これまで、脳神経細胞におけるマンガン輸送については鉄輸送体の DMT1 およびトランスフェリン受容体しか検討されていなかった。本研究室では亜鉛輸送体ファミリー (ZIP) のうち、ZIP8、ZIP14 が Mn^{2+} 輸送に関与していることを見出している。そこで2年目は、神経細胞における ZIP8 および ZIP14 の発現と Mn^{2+} 輸送への寄与度を検討した。細胞は、パーキンソン病のモデル細胞とされている SH-SY5Y 細胞および HT22 細胞を用いた。SH-SY5Y 細胞および HT22 細胞における金属輸送体の発現を調べた結果、亜鉛輸送体の ZIP8、ZIP14 および DMT1 が発現していることを確認した (図1)。

図1. 神経細胞における金属輸送体の発現



これまでに、SH-SY5Y 細胞における Mn^{2+} 取り込みには、DMT1 の関与が報告されている。そこで SH-SY5Y 細胞において、DMT1 siRNA を導入して DMT1 の発現を抑制すると、 Mn^{2+} 取り込み効率はコントロールの半分以下にまで低下した (図2)。

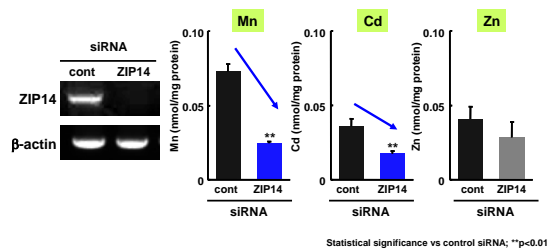
図2. SH-SY5Y細胞のMn取り込みに対するDMT1 siRNAの影響



そこで、SH-SY5Y 細胞における ZIP8 および ZIP14 の Mn^{2+} 取り込みへの寄与について検討を行った。ZIP8 siRNA を導入して発現を抑制すると、 Mn^{2+} 取り込み効率はコントロールと比べて変化しなかった。一方、ZIP14 siRNA を導入して発現を抑制すると、 Mn^{2+} 取り込み効率はコントロールの半分以下にまで低下

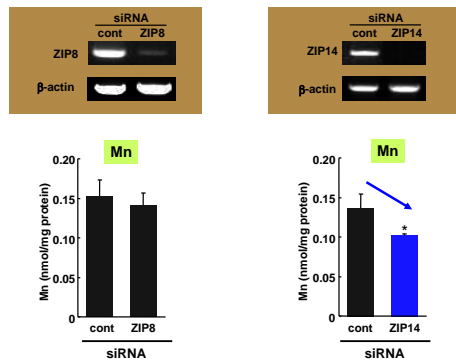
した (図 3)。

図3. SH-SY5Y細胞のMn取り込みに対するZIP14 siRNAの影響



また HT22 細胞を用いた実験でも、SH-SY5Y 細胞と同様に ZIP8 を発現抑制しても Mn²⁺ 取り込み効率に変化せず、ZIP14 を発現抑制すると Mn²⁺ 取り込み効率が低下した (図 4)。本研究では、2 種類の神経細胞に共通して、ZIP14 の発現を抑制すると、Mn²⁺ 細胞内取り込み効率は低下することを明らかにした。よって神経細胞では、DMT1 のみならず、ZIP14 がマンガン輸送に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

図4. HT22細胞のMn取り込みに対するZIP14/ZIP8 siRNAの影響



結論

本研究において、亜鉛輸送体 ZIP8 および ZIP14 が脳神経系においてマンガン輸送に関与するかどうかを検討した結果、神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) において DMT1 のみならず ZIP14 を発現抑制すると Mn²⁺ 取り込み効率が低下することを見出した。しかし、実際の神経細胞においても同様に亜鉛輸送体の ZIP14 がマンガン輸送に関与しているのかは不明である。また、ZIP14 は IL-6 に応答して発現上昇することが知られているが、様々な脳神経系疾患の進展に伴って、ZIP14 の発現が変化するののかも不明であるため、今後神経細胞における ZIP14 の発現制御についても検討が必要である。

近年、原発性パーキンソン病患者および複数の脳神経疾患において鉄やマンガンの脳内への蓄積が見られ、鉄やマンガンの代謝異常がこれらの脳疾患の増悪因子になっている可能性が考えられる。脳疾患において鉄やマンガンの代謝異常を引き起こす因

子が何であるか、現在のところよくわかってないが、鉄、亜鉛のみならず、マンガン動態とその制御機構を解析することは極めて重要である。マンガン毒性の標的組織である脳におけるマンガン輸送について解析し、亜鉛および鉄の代謝との関係を明らかにする上で、ZIP14 のマンガン輸送への関与は重要な知見であると考えられた。

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 6 件)

1. Matsumoto, K., Fujishiro, H., Satoh, M., Himeno, S. (2010) DNA microarray analysis of the liver of mice treated with cobalt chloride. *J. Toxicol. Sci.* 35(6), 935-939. 査読有.
2. Fujishiro, H., Himeno, S. (2011) Involvement of Multiple Metal Transporters in Cadmium Transport. *Biomed. Res. Trace Elements.* 22(1), 1-6. 査読有.
3. Fujishiro, H., Kubota, K., Inoue, D., Inoue, A., Yanagiya, T., Enomoto, S., Himeno, S. (2011) Cross-resistance of cadmium-resistant cells to manganese is associated with reduced accumulation of both cadmium and manganese. *Toxicology* 280(3), 118-125. 査読有.
4. Shimizu, Y., Fujishiro, H., Matsumoto, K., Sumi, D., Satoh, M. and Himeno, S. (2011) Chronic exposure to arsenite induces S100A8 and S100A9 expression in rat RBL-2H3 mast cells. *J. Toxicol. Sci.* 36(1), 135-139. 査読有.
5. Fujishiro, H., Doi, M., Enomoto, S., Himeno, S. (2011) High sensitivity of RBL-2H3 cells to cadmium and manganese: an implication of the role of ZIP8. *Metallomics* 3(7), 710-718. 査読有.
6. Fujishiro, H., Yano, Yu., Takada, Y., Tanihara, M., Himeno, S. (2012) Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1 in transport of cadmium and manganese in mouse kidney proximal tubule cells. *Metallomics*, in press. 査読有.

[学会発表] (計 22 件)

1. Establishment and characterization of manganese- and cadmium-resistant RBL-2H3 cells. Hitomi FUJISHIRO, Miwako Doi, Seiichiro HIMENO. 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 徳島, 2010 年 6 月 25 日

2. Effect of bicarbonate on cellular uptake of cadmium and manganese. **Hitomi FUJISHIRO**, Miwako Doi, Ai Miyoshi, Seiichiro HIMENO. ミニシンポジウム, 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 徳島, 2010 年 6 月 25 日
3. RBL-2H3 細胞におけるカドミウム、マンガン感受性と輸送機構. ○**藤代瞳**, 土肥美和子, 姫野誠一郎. ミニシンポジウム, 第 21 回微量元素学会, 京都, 2010 年 7 月 4 日.
4. RBL-2H3 細胞におけるカドミウム、マンガン輸送機構. ○**藤代瞳**, 土肥美和子, 姫野誠一郎. 第 5 回トランスポーター研究会, 東京, 2010 年 7 月 10 日.
5. Interaction of cadmium and manganese in cellular uptake and toxicity. ○姫野誠一郎, 土肥美和子, **藤代瞳**, VII International Congress of Toxicology (バルセロナ), 2010 年 7 月.
6. 腎臓近位尿細管由来の不死化細胞 (PT3) におけるカドミウム輸送. ○**藤代瞳**, 矢野悠, 三好亜依, 姫野誠一郎. フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 東京. 2010 年 9 月 9 日.
7. The role of ZIP8 in bicarbonate-dependent transport of cadmium and manganese in RBL-2H3 cells. **Hitomi FUJISHIRO** and Seiichiro HIMENO. 第 60 回藤原セミナー, 大阪, 2010 年 10 月 29 日.
8. カドミウムの排泄に関与する輸送体の探索. ○井上敦仁, **藤代瞳**, 姫野誠一郎. 第 2 回メタロキス研究フォーラム, 京都, 2010 年 11 月 2 日.
9. Interferon-beta の産生抑制を介した亜ヒ酸による NO 産生阻害機構. 第 16 回ヒ素シンポジウム, ○津山博匡, 角大悟, **藤代瞳**, 姫野誠一郎, 旭川, 2011 年 2 月 5 日.
10. カップ培養系を用いた腎臓近位尿細管細胞におけるカドミウム輸送機構の検討. 日本薬学会 131 年会, ○矢野悠, **藤代瞳**, 姫野誠一郎, 静岡, 2011 年 3 月 30 日.
11. Cadmium transport in proximal tubule cells derived from mouse kidney. ○Yu YANO, **Hitomi FUJISHIRO**, and Seiichiro HIMENO. 第 21 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 千葉, 2011 年 5 月 30 日.
12. Screening study of low-molecular-weight compounds for the modulation of cellular cadmium transport. ○ **Hitomi FUJISHIRO**, Yukari ATSUMI, Atsuhito INOUE, and Seiichiro HIMENO. 第 21 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 千葉, 2011 年 5 月 30 日.
13. RBL-2H3 細胞由来マンガン耐性細胞の性状解析. ○大橋俊直, **藤代瞳**, 姫野誠一郎, 第 22 回微量元素学会, 京都, 2011 年 7 月 1 日.
14. 神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞におけるマンガン輸送機構の検討. ○中野佑香, **藤代瞳**, 姫野誠一郎, 第 22 回微量元素学会, 京都, 2011 年 7 月 1 日.
15. RBL-2H3 細胞由来カドミウム耐性細胞、マンガン耐性細胞の性状解析. ○**藤代瞳**, 大橋俊直, 角大悟, 姫野誠一郎, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 横浜, 2011 年 7 月 11 日.
16. 腎臓近位尿細管細胞へのカドミウム輸送における亜鉛輸送体の役割. ○**藤代瞳**, 矢野悠, 姫野誠一郎, フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 金沢. 2011 年 10 月 27 日.
17. 神経細胞へのマンガン輸送における亜鉛輸送体の役割. ○**藤代瞳**, 中野佑香, 姫野誠一郎, フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 金沢. 2011 年 10 月 27 日.
18. マンガンおよびカドミウム耐性 RBL-2H3 細胞の性状解析. ○**藤代瞳**, 大橋俊直, 詫間美紀, 姫野誠一郎, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 名古屋. 2011 年 12 月 8 日.
19. 神経細胞におけるマンガン取り込みに関与する輸送体の探索. ○**藤代瞳**, 中野佑香, 吉田真梨, 角大悟, 姫野誠一郎, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 名古屋. 2011 年 12 月 8 日.
20. 腎臓近位尿細管細胞へのカドミウム輸送における ZIP8, ZIP14, DMT1 の役割. ○**藤代瞳**, 矢野悠, 高田侑那, 姫野誠一郎, メタロチオネインおよびメタルバイオサイエンス研究会 2011, 名古屋. 2011 年 12 月 8 日.
21. 腎臓近位尿細管細胞におけるカドミウム輸送および金属輸送体の発現. ○矢野悠, 高田侑那, **藤代瞳**, 姫野誠一郎, 日本薬学会 132 年会, 北海道. 2012 年 3 月 31 日.
22. 神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞における亜鉛輸送体 ZIP14 の役割. ○吉田真梨, 中野佑香, **藤代瞳**, 姫野誠一郎, 日本薬学会 132 年会, 北海道. 2012 年 3 月 31 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤代 瞳 (FUJISHIRO HITOMI)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：10389182

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：