

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590133
 研究課題名（和文） 亜鉛による神経細胞アポトーシスにおける細胞内カルシウム・ホメオスタシスの役割
 研究課題名（英文） Involvement of calcium homeostasis in the apoptotic neuronal death induced by zinc
 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：

亜鉛によるアポトーシスのメカニズムを解明するために、視床下部神経細胞由来の細胞株である GT1-7 細胞を用いて研究を行った。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す。これは、L 型 Ca^{2+} チャネルブロッカーによって抑制されることが明らかになった。さらに、細胞内 Ca^{2+} イメージングを行った結果、亜鉛が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を引き起こすことから、 Ca^{2+} ホメオスタシスの関与が示唆された。また、さらに亜鉛による神経細胞死を抑制する物質を探索した結果、カルノシン、ヒスチジン、クエン酸などが抑制することが明らかになった。そこで、DNA マイクロアレイアナリシスにより亜鉛による神経細胞死の過程で発現している遺伝子群を探索した結果、MT-2、ZnT-1 などの金属結合蛋白等に加えて、さまざまな遺伝子群等の発現が増加していることが判明した。RT-PCR を用いて、これらの遺伝子の亜鉛による発現パターン、カルノシン等の抑制物質の影響を観察した結果、小胞体ストレス関連遺伝子群の発現が大きく関与していることが明らかになった。

さらに、このような亜鉛のホメオスタシスに影響する因子を検討した結果、銅・亜鉛結合蛋白であるプリオン蛋白に着目し、プリオン蛋白の神経毒性に及ぼす金属の影響を検討した結果、亜鉛キレーターである TPEN がプリオン蛋白によるアポトーシスを増強することが明らかになり、プリオン病発症における金属の関与を示唆する結果が得られた。

本研究により、虚血時の亜鉛が関与する神経細胞死に、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの異常が誘起する小胞体ストレスが関与することを示唆する重要な結果が得られた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

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、アルツハイマー病などの様々な神経疾患にも影響することが最近の研究から判明してきており、特に脳血管性認知症との関連が注目されている。脳血管性認知症は、老年性認知症の一種であり、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、この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。Choiらのグループは、亜鉛が虚血時に300 μM 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や、変性した神経細胞に蓄積することを報告している。

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。

これまでの研究では、NMDA型グルタミン酸受容体の関与とピルビン酸を基質とするエネルギー産生系の関与とが報告されている。しかしながら、これらの実験に用いられているラット大脳皮質・海馬初代培養神経細胞系では、グルタミン酸自体も神経細胞死を起こすため、亜鉛による神経細胞死メカニズムとの切り分けが困難であった。

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. KUHW* (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。予備的な研究結果から、亜鉛による神経細胞死には、これまで知られていない、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスが関係した未知のメカニズムが関与している可能性が考えられた(Konoha et al., *J. Health Sci.* (2006))。

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、遺伝子発現、薬理学実験、細胞内 Ca^{2+} イメージング、細胞内 Zn^{2+} イメージングなどの方法を総合的に駆使し、特に、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに注目して研究を行う。

神経細胞死のメカニズム解明においては、毒性抑制物質が対照として有用である。申請者らは、脳血管性認知症予防薬の探索を目的として、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い、その結果、マンゴー果実抽出液などに顕著な抑制活性が存在することを見いだしている(Sadakane et al. *Trace Nutr. Res.* (2005))。この過程で、カルノシン(carnosine; アラニル-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た(Konoha et al., *Trace Nutr. Res.* (2006))。カルノシンは、水溶性ジペプチドであり、脳内でも嗅球神経細胞および脳の他の部位のグリア細胞に局在している。また、グリア細胞内で生合成され、グルタミン酸刺激により細胞外に放出され、しかも亜鉛がその放出を増強することが報告されている。カルノシンは亜鉛とキレートすることが広く知られているが、申請者らの予備の実験では、その抑制メカニズムには亜鉛とのキレートは関与しておらず、未知の抑制メカニズムが関与している可能性が考えられる。従って、カルノシンは亜鉛神経細胞死メカニズムを解明する上での良いツールとなり得ると考えられる。さらに、嗅球は亜鉛含量が高いにも関わらず神経細胞の脱落は生じ難いことを考え合わせると、カルノシンの生理的役割は未だ明らかではないが、図のようなフィードバック抑制により内在性の亜鉛毒性保護物質として働いている可能性が考えられる(図参照)。従って、カルノシンをツールとして用いて、細胞死抑制メカニズムを明らかにすると共に、カルノシンの生理的役割を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛によるアポトーシスの初期過程の変化を観察する系統的な方法の確立(木葉)

GT1-7細胞やラット海馬初代培養神経細胞の培養系を確立しており、これを用いて亜鉛投与後の細胞生存率をWST-1法あるいはLDH法により定量解析を行い、亜鉛投与後短時間で生じるアポトーシスの初期過程の変化を観察する系統的な方法を確立した。また、神経細胞死に重要な働きを示すフリーラジカル産生、細胞の形態変化についても、蛍光染色、免疫抗体染色などにより観察を行った。

(2) 薬理学的実験(木葉)

ERからのCa²⁺放出を抑制するthapsigargin、様々なタイプのCa²⁺チャネルブロッカーなどを投与して、Ca²⁺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caspaseの阻害剤を前投与することによって、アポトーシスの経路を明らかにした。

(3) 細胞内Ca²⁺イメージング(木葉、川原)

既に、fura-2を用いる細胞内Ca²⁺イメージングシステムは確立しており、これを用いて、亜鉛が投与後5~10分後に顕著な細胞内Ca²⁺濃度の増加をGT1-7細胞、ラット海馬初代培養神経細胞において引き起こすことを見出した。そこで、亜鉛による細胞内Ca²⁺濃度上昇について、その濃度依存性、時間経過について詳細に検討した。さらに、様々なCa²⁺チャネルブロッカーやthapsigargin、毒性抑制物質などを投与し、亜鉛による細胞内Ca²⁺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(定金)

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。

4. 研究成果

(1) 亜鉛によるアポトーシスメカニズムの検討

視床下部神経細胞由来の細胞株であるGT1-7細胞を用いて、亜鉛によるアポトーシスのメカニズムを検討した。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、L型Ca²⁺チャネルブロッカーによって抑制されることが明らかになった。さらに、細胞内Ca²⁺イメージングを行った結果、亜鉛が細胞内Ca²⁺濃度の上昇を引き起こすことや、亜鉛神経毒性を抑制するAl³⁺によって亜鉛による細胞内Ca²⁺流入が阻害されることなどから、Ca²⁺ホメオスタシスの関与が示唆された(Kawahara, Biomed. Res. Trace Elem. (2007))。さらに亜鉛による神経細胞死を抑制する物質を探索した結果、カルノシン、ヒスチジン、クエン酸などが抑制することが明らかになった(Sadakane et al. Trace Nut Res (2007), (2008))。そこで、脳内カルノシ

ンの定量解析等を行った。

(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をDNAマイクロアレイ解析の結果、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、Ca²⁺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。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、カルノシン等の抑制物質の影響を観察した結果、小胞体ストレス関連遺伝子群(GADD34, p8等)の発現が大きく関与してい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。

さらに、このような亜鉛のホメオスタシスに影響する因子を検討した結果、銅・亜鉛結合蛋白であるプリオン蛋白に着目し、プリオン蛋白の神経毒性に及ぼす金属の影響を検討した。その結果、銅や亜鉛が細胞毒性を限弱させることが判明した(Kawahara et al., Neuroscience 2008, Soc. Neurosci. Abst. 179, 2008)。また、これらの金属がプリオン蛋白のconformation変化に関与することも明らかになった。これらの結果は、脳内での金属のホメオスタシスと神経疾患との関連について新たな手がかりとなりうる。

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 14 件)

1) 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)

2) Kato-Negishi M and Kawahara M: Neurosteroids block the increase in intracellular calcium level induced by Alzheimer's beta-amyloid protein in long-term cultured rat hippocampal neurons, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4: 209-218 (2008). (査読有)

3) Sadakane Y, Konoha K, Nagata T, Kawahara M: Improvement of screening for protective substances against zinc-induced neuronal cell death. *Trace Nutrient Res.* 25, 59-63(2008). (査読有)

4) Kawahara M: Neurotoxicity of trace

- elements and the pathogenesis of senile-type dementia, Biomed. Res. Trace Elements 19, 25-33(2008). (査読有)
- 5) 川原正博: 宮崎の特産物から認知症のくすりを創る、みやぎん経済研究所 調査月報, 3月号, 2-6 (2008) (査読無)
- 6) 川原正博: アミロイド蛋白質の多量体化と pore 形成による神経細胞死, 臨床病理, vol. 56, No.2, 130-136 (2008). (査読無)
- 7) Sadakane Y., Konoha K., Nagata T., Kawahara M.: Protective activity of the extracts from Japanese eel (*Anguilla japonica*) against zinc-induced neuronal cell death: Carnosine and an unknown substance. Trace Nutrient Res. 24: 98 - 105 (2007). (査読有)
- 8) Kawahara M., Konoha K., Nagata T., Sadakane Y.: Aluminum and human health: its intake, bioavailability and neurotoxicity, Biomed. Res. Trace Elements 18:111-120 (2007). (査読有)
- 9) Konoha K., Nagata T., Sadakane Y., Kawahara M.: Neurotoxicity of aluminum hydroxyl polymer on primary cultured neurons of rat cerebral cortex, Biomed. Res. Trace Elements 18: 395-399 (2007). (査読有)
- 10) Kawahara M., Konoha K., Nagata T., Sadakane Y.: Protective substances against zinc-induced neuronal death after ischemia: carnosine a target for drug of vascular type of dementia, Recent Patents on CNS Drug Discovery, 2, 145-149 (2007). (査読有)
- 11) Kawahara M., Konoha K., Sadakane Y.: Neurotoxicity of zinc: the involvement of calcium homeostasis and carnosine, Biomed. Res. Trace Elements 18:26-34 (2007). (査読有)
- 12) 川原正博: アルツハイマー病の病理・病態 危険因子としての非遺伝的要因アルミニウム 「アルツハイマー病 - 基礎研究から予防・治療の新しいパラダイム - 」, 日本臨床 66:205-210 (2007). (査読無)
- 13) 川原正博: アルミニウム製剤の投与と副作用、日本医事新報, No. 4341, 97-98 (2007). (査読無)
- 14) 川原正博: アルミニウムの生体への影響、金属、77:279-285(2007). (査読無)

[学会発表](計 26 件)

- 1) 川原 正博, 永田 哲也, 大塚 功, 木葉 敬子, 定金 豊, 横山 祥子: 微量元素の神経毒性と老年性認知症の発症メカニズム、日本薬学会シンポジウム「金属の関与する生命科学() トキシコメタロミクス研究の新展開~最新分析法開発から創薬、診断、

- 治療へのアプローチ」(2009年3月27日)
- 2) 木葉敬子, 定金 豊, 永田哲也, 川原正博: HPLC によるラット脳内カルノシンの定量、日本薬学会第129回年会(2009年3月26-28日、京都)
- 3) 鳥や尾 篤, 宮越 辰則, 渡邊暁子, 坂本正徳, 木葉敬子, 定金 豊, 川原正博, 山崎哲郎: 環状 L-carnosine 誘導体の合成とその生物学的評価、日本薬学会第129回年会(2009年3月26-28日、京都)
- 4) 宮越辰則, 鳥や尾 篤, 渡邊暁子, 坂本正徳, 木葉敬子, 定金 豊, 川原正博, 山崎哲郎: 中枢神経保護作用を目的とした L-carnosine 誘導体の合成、日本薬学会第129回年会(2009年3月26-28日、京都)
- 5) 大塚 功, 永田哲也, 木葉敬子, 定金 豊, 川原正博, 横山 祥子: プリオン蛋白断片ペプチド PrP106-126 のコンフォーメーションの違いによる細胞膜中における糖脂質認識能について 原子間力顕微法による直接観察、日本薬学会第129回年会(2009年3月26-28日、京都)
- 6) 宮越 辰則, 鳥や尾 篤, 渡邊 暁子, 坂本正徳, 木葉 敬子, 定金 豊, 川原 正博, 山崎 哲郎 2008年12月5-6日、L-Carnosine 誘導体の合成と生理作用について 第25回日本薬学会九州支部大会(延岡)
- 7) 大塚 功, 永田 哲也, 木葉 敬子, 定金 豊, 川原 正博, 横山 祥子 2008年12月5-6日、プリオン断片蛋白 PrP106-126 のコンフォーメーションの違いによるGM1への認識能の変化-原子間力顕微法による直接観察 第25回日本薬学会九州支部大会(延岡)
- 8) 川原正博: アミロイド形成タンパクの高次構造変化と神経毒性に及ぼす金属の影響、第1回メタロミクス研究フォーラム(2008.11.28-29、東京)
- 9) M. KAWAHARA, T. NAGATA, OHTSUKA, K. KONOHA, Y. SADAKANE, S. YOKOYAMA Effects of trace elements on prion-induced neurotoxicity of primary cultured hippocampal neurons, Neuroscience 2008 (Washington D.C., U.S.A. 2008.11.19)
- 10) 木葉敬子, 定金 豊, 永田哲也, 川原正博 2008年8月6-8日、亜鉛による神経細胞死を抑制する成分: 魚介類バイオマスからの単離と同定 第21回バイオメディカル分析科学シンポジウム(札幌)
- 11) 永田哲也, 木葉敬子, 定金 豊, 川原正博 2008年7月3-4日、プリオン蛋白による培養神経細胞に対する亜鉛および銅の影響 第19回日本微量元素学会(東京)
- 12) 定金 豊, 木葉敬子, 永田哲也, 川原正博 2008年6月5-6日 GT1-7 マウス神経株化細胞を用いた亜鉛による神経細胞死メカニズムの解明 第18回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(京都)

- 13) 定金 豊、木葉敬子、永田哲也、川原正博 2008年5月30日、魚介類水抽出液からの脳血管認知症予防物質の単離と同定 日本微量栄養素学会第25回学術集会 (京都)
- 14) 定金 豊、木葉敬子、永田哲也、川原正博、2008年3月27日、亜鉛による神経細胞死：クエン酸の抑制活性とそのメカニズムについて 日本薬学会第128年会 (横浜)
- 15) 木葉敬子、永田哲也、定金 豊、川原正博、2008年3月27日、亜鉛による培養神経細胞死に対する金属イオンの阻害メカニズムの検討 日本薬学会第128年会 (横浜)
- 16) 永田哲也、定金 豊、木葉敬子、川原正博、2008年3月27日、プリオン蛋白による培養神経細胞に対する毒性メカニズムの検討 日本薬学会第128年会 (横浜)
- 17) 川原正博：農産物・魚介類中に認知症の治療予防薬を探索する、薬学フォーラム in 東京 2008、(2008.03.14、東京)
- 18) 川原正博：脳血管性認知症予防物質の農産物・魚介類由来バイオマス中におけるスクリーニングと構造解析、日本学術会議九州・沖縄地区会議学術講演会(2008.01.22、宮崎)
- 19) 定金 豊、木葉敬子、永田哲也、川原正博：クエン酸による神経細胞死抑制活性とその作用機構の解明、第24回日本薬学会九州支部大会(福岡2007年12月14-15日)
- 20) 川原正博：老年性認知症予防・治療薬の探索系の開発とその応用、野口賞受賞講演会(2007.11.27、延岡)
- 21) 川原正博：アミロイド蛋白質の多量体化とpore形成による神経細胞死、第54回日本臨床検査医学会および第47回日本臨床化学会連合大会シンポジウム“アミロイドーシス”(2007.11.22-25、大阪)
- 22) M. Kawahara, K. Konoha, T. Nagata, Y. Sadakane: Zinc-induced apoptosis of GT1-7 cells are protected by mango (*Mangifera indica* L.) fruit: a candidate for treatment of neurodegeneration after ischemia, Neuroscience 2007 (Society for Neuroscience, San Diego (U.S.A.), 2007年11月2-8日)
- 23) 木葉敬子、定金 豊、川原正博：アルミニウムのラット大脳皮質培養神経細胞に対する毒性の化学形態による比較、第18回日本微量元素学会(福井、2007年7月5-6日)
- 24) 川原正博：「微量元素の神経毒性と老年性認知症発症に関する研究」、第18回日本微量元素学会研究学術賞(浜理薬品賞)受賞講演(2007.07.06、福井)
- 25) 木葉敬子、永田哲也、定金 豊、川原正博：亜鉛による培養神経細胞死メカニズムの検討、第17回金属の関与する生体関連反応シンポジウム(京都、2007年6月21-22日), *Yakugaku Zasshi*, 127, suppl2, 35 (2007).
- 26) 川原正博、木葉敬子、永田哲也、定金豊：

農産物・魚介類中における脳血管性認知症予防物質の探索と単離・構造解析、第24回微量栄養素研究会シンポジウム(京都、2007年6月7日)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

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：特願2008-098675

出願年月日：2008年4月4日

国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：「脳血管性認知症の予防または治療用飲食物、その包装または容器ならびに脳血管性認知症の予防または治療薬」

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2007-314467

取得年月日：2007年12月11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)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：40224828

木葉 敬子 (KONOHAKI KEIKO)

九州保健福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：00369175

永田 哲也 (NAGATA TETUSYA)

九州保健福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：00454942

(3) 連携研究者

なし